



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO-UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



ÍTALA CAROLINE PEREIRA DUARTE LÔBO

**EFICIÊNCIA *in vitro* e *in vivo* DE EXTRATOS DE DUAS PLANTAS FORRAGEIRAS
(*Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii*) SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAS DE
CAPRINOS.**

CHAPADINHA-MA

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

PEREIRA DUARTE LÔBO, ÍTALA CAROLINE.

EFICIÊNCIA in vitro e in vivo DE EXTRATOS DE DUAS PLANTAS FORRAGEIRAS *Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii* SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAS DE CAPRINOS / ÍTALA CAROLINE PEREIRA DUARTE LÔBO. - 2016.

44 p.

Orientador(a): LIVIO MARTINS COSTA JÚNIOR.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, CHAPADINHA, 2016.

1. *Acacia mearnsii*, Tanino condensado. 2. Caprinos, Endoparasitos. 3. *Gliricidia sepium*, Compostos secundários. I. MARTINS COSTA JÚNIOR, LIVIO. II. Título.

ÍTALA CAROLINE PEREIRA DUARTE LÔBO

**EFICIÊNCIA *in vitro* e *in vivo* DE EXTRATOS DE DUAS PLANTAS FORRAGEIRAS
(*Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii*) SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAS DE
CAPRINOS.**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, para obtenção do grau de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Lívio Martins Costa Júnior

CHAPADINHA-MA

2016

ÍTALA CAROLINE PEREIRA DUARTE LÔBO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, para obtenção do grau de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas.

Aprovado em ____/____/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr.º Lívio Martins Costa Júnior
Universidade Federal do Maranhão

Ms. Carolina Rocha e Silva
Universidade Federal do Maranhão

Dra.º Naylene Carvalho Sales da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho a Nossa Senhora que me ajudou a chegar até aqui, e a todas as pessoas que ela me proporcionou conhecer durante toda a pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu maior mestre, meu amigo, meu pai, meu defensor.

A Nossa Senhora mãe de Deus e minha, meu exemplo, minha intercessora, minha maior incentivadora e amiga.

Ao meu orientador Prof. Dr. Livio Martins Costa Júnior, pela oportunidade em ser sua aprendiz, pela paciência, pelo zelo em educar e transmitir a todos seu amor pelo que faz, por ser justo e amigo.

Aos meus pais Higina Maria Pereira Duarte e Erinaldo Soares Lôbo, pelo exemplo, por todo o amor, pela ética, pelo seu companheirismo, seu cuidado, pelo incentivo e levante, pela fé e alegria que me passaram, pela pessoa que me tornei.

A minha irmã Shelre Emile Pereira Duarte Lôbo, pela paciência e dedicação em me tornar melhor do eu sou, minha amiga, minha incentivadora, minha alegria.

Ao meu namorado Rodrigo Conceição dos Santos, meu amor, pela força, parceria, pela torcida, pelo cuidado, pela confiança, pela sua ajuda, pelo seu amor que me impulsiona, meu amigo, meu presente.

Aos colegas que se tornaram amigos, do Laboratório de Parasitologia Animal, Suzana Gomes, Giselle Cutrim, Aldilene da Silva, Lilyan Bruna, Sebastião, José Gracione, Iara, Joseane Rodrigues, Jorgianne Furtado, Luciana Trasel e Melise especialmente pela dedicação sem murmuros, pelas conquistas, pelos sorrisos, sonhos e vida compartilhada.

A Universidade Federal do Maranhão juntamente com todos os professores do curso de Ciências Biológicas, pelo amor que carregam em ensinar, pela paciência e valorosos conhecimentos morais e científicos.

A FAPEMA e ao CNPq, pelo apoio financeiro da minha bolsa e projetos de pesquisa.

“É justo que muito custe aquilo que muito vale!”

Santa Teresa D`ávila.

LISTA DE GRÁFICOS, FOTOS E TABELAS

Figura 1: Ciclo Biológico dos Nematoides gastrointestinais pertencentes à família Trichostrongyloidea 16

ARTIGOS

GRÁFICO 1- Percentual de perda cuticular nas concentrações de 600µg/ml, 1200µg/ml, 1200µg/ml + PVPP analisados de 10 -60min..... 30

FIGURA 1- Fotos dos nematoides adultos 38

FIGURA 2- Fotos tiradas durante a contagem dos ovos das fêmeas endoparasitas..... 39

TABELA 1. Média da quantidade de helmintos por animal divididos por grupo de tratamento 38

TABELA 2. Média da quantidade de ovos por fêmeas 39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DMSO - Dimetilsulfóxido

μl - Microlitro

ATH – Anti-helmíntico

TC- Tanino Condensado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Caprinocultura	15
2.2. Nematoides Gastrointestinais	15
2.3. CONTROLE E RESISTÊNCIA DOS NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS	17
2.4. ALTERNATIVAS DE CONTROLE	18
CAPÍTULO 1	26
EFICIÊNCIA <i>in vitro</i> DE EXTRATOS DE <i>Gliricidia sepium</i> SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAS DE CAPRINOS ARTIFICIALMENTE INFECTADOS.	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1. Coleta de plantas e preparação dos extratos (Makkar et al, 1999)	29
2.2. Quatificação de Taninos	29
2.3. Coprocultura	29
2.3. TESTES <i>IN VITRO</i>	29
2.3.1 Teste de inibição da eliminação da cutícula larvar.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4. CONCLUSÃO.....	31
REFERENCIAS	32
CAPÍTULO 2	35
EFICIÊNCIA <i>in vivo</i> DE EXTRATOS DE <i>Acacia mearnsii</i> SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAS DE CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS.	35
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1. Localização do experimento, seleção de ruminantes.....	38
2.2. Divisão dos grupos e extração do tanino	38
2.3. Abate dos caprinos, recuperação e catalogação de endoparasitos.....	38
2.4. Contagem de ovos	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4. CONCLUSÃO.....	42
REFERENCIAS	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44

ABSTRACT

The great weaknesses caused by endoparasites to goats of the national herd become more and more recurrent every day. Currently the use of bioactive plants has been the subject of studies regarding the control of the parasitic load present in small ruminants, this effect is added to the presence of secondary compounds, such as condensed tannin. Thus, this work was based on the analysis of two forages, *Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii*. The study was divided in two chapters which present extractions of the compound in question, methodology in the management of animals, collections of nematodes, and tests of the activity of the plants on the nematodes. It was developed with *G. sepium* in vitro and in vivo tests with *A. mearnsii* from different parts of plants and the results obtained were demonstrated from graphs, photos and tables. The efficacy of forage on nematodes was concluded.

Key words: Goats, Endoparasites, *Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii*, Tannin condensed.

RESUMO

As grandes debilidades causadas por endoparasitos a caprinos do rebanho nacional tornam-se cada dia mais recorrentes. Atualmente o uso de plantas bioativas tem sido alvo de estudos no que se refere ao controle da carga parasitária presente nos pequenos ruminantes, este efeito é agregado à presença de compostos secundários, como o tanino condensado. Assim, este trabalho fundamentou-se na análise de duas forrageiras, *Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii*. O estudo foi dividido em dois capítulos os quais apresentam extrações do composto em questão, metodologia no manejo de animais, coletas de nematoides, e testes da atividade das plantas sobre os nematoides. Desenvolveu-se com *G. sepium* testes *in vitro*, e *in vivo* com *A. mearnsii*, de partes diferentes das plantas e os resultados obtidos foram demonstrados a partir de gráficos, fotos e tabelas. Concluiu-se a eficiência das forrageiras sobre nematoides.

Palavras- chave: Caprinos, Endoparasitos, *Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii*, Tanino condensado.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as atividades da agropecuária a caprinocultura tem se destacado com um rebanho efetivo de 8,779 milhões de animais. A maior parte das criações está presente no Nordeste (91,4%), onde os rebanhos de caprinos tem apresentado crescimento considerável e a caprinocultura tornou-se umas das principais atividades desenvolvidas na região (PPM, 2013). A produção de pequenos ruminantes no Brasil, em especial no Nordeste é uma atividade de importância social, pois gera oportunidades de emprego e renda.

Esse sistema produtivo vem sofrendo com doenças parasitárias ocasionadas por nematoides gastrointestinais, afetando a criação de caprinos e ovinos. O principal parasito patogênico que afeta esses animais é o *Haemonchus contortus*, sendo responsáveis por elevadas perdas na produção, devido ao subdesenvolvimento, redução do consumo de alimentos, diminuição da produção de leite e carne, baixa fertilidade dos animais, e em alguns casos alta taxa de mortalidade (LESSA et al., 2004; GENNARI, 2006; LIMA, et al., 2010). A perda econômica também pode ser visto com compra de medicamentos para o controle deste nematoide, gasto com mão-de-obra e instalações.

O controle do *H. contortus* tem sido realizado exclusivamente com anti-helmintico sintético, porém o uso descontrolado e de forma inadequada de anti-helminticos tem acelerado o processo de resistência de cepas de *H. contortus* a todas as bases químicas utilizadas para o controle (THOMAZ-SOCCOL et al., 1996; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011). Estudos tem buscado o uso de alternativas para o controle desta espécie de nematoide, como a utilização de compostos ativos oriundo de plantas. A utilização de produtos naturais pode apresentar vantagens em seu uso por ser ecologicamente viável e menos tóxico para o animal e ambiente (OLIVEIRA, 2013).

Estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrados efeitos anti-helminto de produtos como os taninos e outros polifenóis sobre nematoides gastrointestinais (HOSTE et al., 2012). Os taninos são polifenóis encontrados no metabolismo de muitas espécies de plantas, em diferentes partes da planta e são categorizados dentro de duas classes: os taninos condensados e hidrolisáveis. Os taninos condensados são constituídos de oligômeros ou polímeros de catequina (Flavan-3-ol) (Bruneton, 1999).

A espécie de planta *Gliricidia sepium* é uma leguminosa com alto teor proteico utilizado por pequenos produtores para suplementação animal de ruminantes. Esta espécie é encontrada em regiões com ambientes áridos, como México, America Central e America do Sul (RANGEL et AL., 2011).

Acacia mearnsii é uma planta conhecida como acácia negra, encontrada em regiões tropicais, considerada uma espécie com alto teor de taninos em sua composição (SCHNEIDER et AL., 1999). O tanino extraído da casca desta planta é muito utilizado em indústrias de celulose e usando para recuperação de solos (PERRANDO; CORDER, 2006). Estudo realizado com taninos presente em *Acacia mearnsii* tem demonstrado o efeito anti-helmíntico sobre nematoides gastrointestinais (Minho et al., 2008).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Caprinocultura

O rebanho nacional de caprinos no Brasil compreende cerca de 8.851.879 cabeças, sendo 8.109.672 cabeças na Região Nordeste (91,6%). O país concentra hoje o 22º rebanho mundial de caprinos e o 18º maior rebanho de ovinos no planeta. (FAO, 2015; IBGE, 2015). O sistema de produção de caprinos representa uma atividade de grande importância social e econômica, principalmente para a região do Nordeste, no qual esse sistema é exercido por pequenos produtores para uso em sua subsistência, com poucos custos e mantidos por membros da família (WANDER et al., 2003; IBGE, 2015).

Entretanto, a criação de caprinos tem crescido se tornando um grande potencial econômico para esses produtores, principalmente ao uso de raças de caprinos resistentes ao clima do Nordeste e a ampliação do mercado para os produtos oriundo da caprinocultura, como a carne, leite e pele (NOGUEIRA-FILHO; KASPRZYKOWSKI, 2006; SALEM, 2010; GUIMARÃES; HOLANDA, 2002; ALVES, 2002).

Contudo, esse sistema de produção tem sofrido perdas por causa de parasitos de grande importância sanitária como: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides spp.*, *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum*. A patogenia causada pelo parasito hematófago *Haemonchus contortus*, torna-o a espécie responsável pelas maiores perdas econômica, isso porque ele realiza diminuição considerável no volume globular ocasionando anemia, muitas vezes progressiva, o que pode levar a morte do hospedeiro (BOWMAN et al., 2003).

2.2. Nematoides Gastrointestinais

A carga parasitária de rebanho de caprinos aumentou provavelmente através do processo de domesticação dos animais, havendo um numero maior de animais por área aumentando a chance de re-infecção com os nematoides (CHIEJINA, 2001; SOUTELLO et al., 2002; BIZIMENYERA et al., 2006).

Nematoides Gastrointestinais estão classificados dentro da classe de Nematoda, Cestoda e Trematoda. Contudo, os animais podem ser parasitados por uma ou mais espécies de parasitos, no entanto os parasitos da família Trichostrongylidae (*Haemonchus*, *Trichostrongylus*) são os mais patogênicos para os ruminantes de pequeno porte (AMARANTE, 2004; SANTOS, 2004; VIEIRA, 2005).

O ciclo evolutivo dos nematoides envolve uma fase de vida livre no ambiente, e outra parasitária no hospedeiro (ruminante) o que é semelhante em todos os trichostrongilídeos, sendo um ciclo do tipo monoxeno. Inicia-se a fase de vida livre com a eliminação de ovos nas fezes dos animais no ambiente. Em condições ambientais favoráveis, os ovos se desenvolvem eclodindo e liberando larvas L1, estas se alimentam de bactérias e permanecem no bolo fecal para mudar para L2 sendo rhabditiformes. Em condições ambientais favoráveis a L2 muda para L3, esta apresenta uma cutícula de proteção a fatores ambientais, no qual também a impedem de se alimentar.

As larvas L3 apresentam geotropismo positivo permanecendo em gramíneas, o animal ao se alimentar, ingeri larvas L3 sendo a forma infectante. As larvas desembainhada vão para o abomaso ou intestino, sofrendo duas mudas diferenciando-se em machos e fêmeas adultos (figura 1) (MELO, 2005; TAYLOR et al, 2009; MINHO, et al 2014).

No trato gastrointestinal, dependendo da carga parasitária os nematoides podem causar infecções de grande relevância à saúde dos pequenos ruminantes, enfermidades que resultam na perda de peso, crescimento tardio e redução da produção leite, ocasionando grandes prejuízos econômicos. Porém, as tentativas de recuperar a sanidade dos animais têm sido desenvolvidas por meio de tratamentos repetidos, desencadeando no surgimento de populações de parasitos resistentes aos princípios ativos utilizados no mercado (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008).

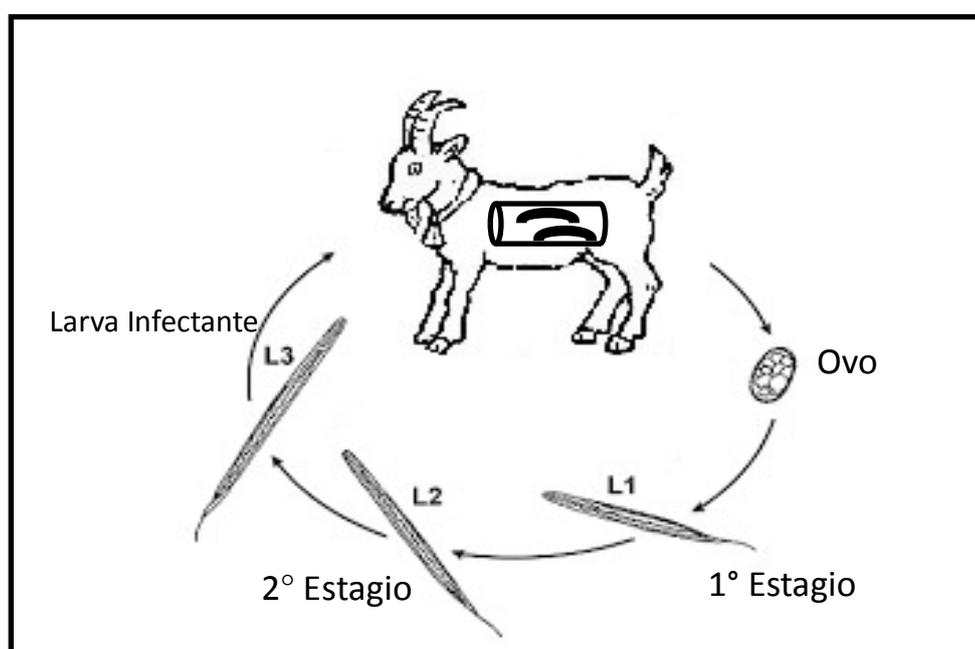


Figura 1: Ciclo Biológico dos Nematoides gastrointestinais pertencentes à família Trichostrongyloidea.

2.3. CONTROLE E RESISTÊNCIA DOS NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS

Para o controle efetivo dos nematódeos gastrointestinais é necessário levar em consideração dois pontos importantes, primeiro melhorar a resistência, resiliência e redução da carga parasitaria no hospedeiro e segundo trabalhar no ambiente, reduzindo o numero de parasitos infectantes na pastagem (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). O controle dos parasitas nematódeos gastrointestinais é feito quase que exclusivamente com o uso de anti-helmínticos sintéticos. Diferentes classes químicas estão disponíveis no mercado tendo como as maiores classes os benzimidazóis, imidazóis e lactonas Macrocíclicas (NUNES, 2012).

Entretanto o uso extensivo e desordenado tem ocasionado à aceleração da resistência em populações de nematódeos gastrointestinais as bases químicas de anti-helmíntico disponíveis (MELO; BEVILAQUA, 2002; PAIVA; NEVES, 2009). A resistência é detectada em uma população quando uma parte destes parasitos tolera a dose do anti-helmíntico recomendado que elimina a maioria dos indivíduos de uma população suscetível da mesma espécie (PRICHARD et al., 1980; TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). Estudos indicam que os parasitos de pequenos ruminantes são resistentes a mais de uma base química de anti-helmínticos (PUSPITASARI et al., 2016). Registros de resistência foram relatados em distintas partes do mundo (COELHO et al., 2010).

Para ajudar a prolongar a vida útil desses anti-helmínticos tem se utilizado de tratamentos alvos e tratamentos seletivos (KENYON; JACKSON, 2012). O tratamento alvo é realizado em momentos de maior infecção, levando em consideração a susceptibilidade da cepa aos anti-helmínticos, garantindo a existência de refugia entre os animais, reduzindo o numero de tratamentos dentro da propriedade, assim mantendo parasitos susceptíveis dentro do rebanho e passando para as próximas gerações de parasitos os genes susceptíveis (KENYON et al., 2009; GABA et al., 2010).

O tratamento seletivo é feito com método FAMACHA, no qual consiste em selecionar os animais que provavelmente estejam com a carga parasitaria maior. Desta forma reduzindo o numero de animais tratados e numero de aplicações do anti-helmíntico (CHAGAS et al., 2007). Este tratamento é feito em base em sinais clínicos, OPG e desempenho de peso (VAN WYK; BATH, 2002; TORRES-ACOSTA et al., 2012; CHARLIER et al, 2014).

2.4. ALTERNATIVAS DE CONTROLE

Alguns métodos alternativos para auxiliar no controle dos nematoides gastrointestinais têm sido relatados, como uso de raças de animais geneticamente resistentes, fungos hematófagos e produtos naturais (MINHO et al., 2010a ; MINHO, 2014).

Devido a grande preocupação da população com os resíduos químicos deixados nos produtos de origem animal, percebe-se hoje uma tendência crescente de uma agricultura orgânica e de uma agricultura sustentável (OLIVEIRA, 2013). Os produtos naturais usado na medicina popular têm sido explorado como uma possível alternativa para o controle de nematoides gastrointestinais (NERY et al., 2009). O uso de produtos naturais para tratamento de algumas enfermidades tem sido muito utilizado por populações em áreas urbanas e rurais, em formas de chás e xaropes (MINHO, 2014).

Dentre os metabólicos presentes nas plantas os taninos representam um grande potencial para atividade anti-helmíntica (MINHO et al., 2008; MINHO, 2014). Os taninos condensados são compostos de polifenóis que tem alta afinidade por proteínas e polissacarídeos. Os taninos podem apresentar diferenças em suas propriedades dependendo da estação de coleta, tipo de planta, parte da planta e idade da planta (BRUNETON, 1999; HOSTE et al., 2006).

Os taninos são classificados dentro de duas classes de acordo com sua estrutura química em taninos condensados e hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis consumidos por ruminantes podem ser tóxicos para eles, enquanto que os condensados não tem esse efeito (BRUNETON, 1999). Os taninos condensados são polifenóis de alto peso molecular, constituído de oligômeros de catequina (Flavan-3-ol), comumente conhecido como proantocianidinas (BRUNETON, 1999; MINHO, 2006). Os taninos condensados tem a habilidade de se complexar com proteínas formando um complexo (tanino-proteína) (HOSTE et al., 2006).

Estudos tem demonstrado o uso de taninos condensados para o controle de Nematoides gastrointestinais. Extratos de *Havardia albicans* e *Acacia gaumeri* demonstrou redução de migração de larvas de *H. contortus* (Alonso-Díaz et al., 2011). Extrato de *Acacia pennatula* e *Leucaena leucocephala* reduziu a taxa de migração das L3 (ALONSO-DÍAZ et al., 2008). Extrato de *Acacia mearnsii* demonstrou efeito sobre L1 de *H. contortus* (MINHO et al., 2008).

Plantas da espécie *Acacia mearnsii* e *Gliricidia sepium* são plantas forrageiras alvos para o uso no controle de Nematoides gastrointestinais. *Acacia mearnsii* é uma planta

nativa da Austrália, conhecido popularmente como acácia negra. Na África do Sul, ela é cultivada em larga escala para produção de tanino (SHERRY, 1971). No Brasil é muito utilizada para reflorestamento devido ter grandes impactos econômicos (Schneider et al., 1999). Esta espécie de planta tem uma grande capacidade de ser fixadora de nitrogênio no solo, além de incorporar material orgânico no solo (Schumacher et al., 2003). *A. mearnsii* também tem sido descrito com atividade hemolítica, anti-inflamatória e atividade sobre cianobactéria (AVOSED et al., 2014; LIU et al., 2015; PINTO et al., 2016). Os taninos encontrados em *A. mearnsii* já foram descritos com atividade anti-helmíntica sobre nematoides gastrointestinais *in vitro* e *in vivo* (MINHO et al., 2008; MINHO; GENNARI, 2010; COSTA-JUNIOR et al., 2014).

O extrato de *A. mearnsii* em uma dose de 1,6 g/Kg administrados em ovinos foi capaz de agir sobre a carga parasitária e eclosão de ovos de *H. contortus* e *T. colubriformis* (MINHO et al., 2008, 2010).

A espécie *Gliricidia sepium* é uma planta altamente rica em proteínas pertencente à família Fabaceae (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al. 2012). É nativa da América Central, mas introduzida em regiões tropicais (CASTREJÓN-PINEDA et al., 2015). É conhecida popularmente como gliricidia e mata ratón. A *G. sepium* é muito utilizado por pequenos produtores para plantação como cerca viva e suplementação animal pelo valor proteico da forragem (CARVALHO FILHO et al., 1997). Esta planta tem sido descrita com atividade anti-histamínico, antipirético, expectorante, diurético e antifúngico (STEWART, 1996). Além de nutritiva a *Gliricidia sepium* apresenta-se como excelente fonte de metabólitos secundários, estes têm demonstrado efeitos anti-helmínticos principalmente sobre *Haemonchus contortus* (ROJAS et al., 2006).

Compostos ativos de plantas como uso em atividades anti-helmínticas tem sido cada vez utilizado em experimentos *in vivo* e *intro*, podendo se torna uma fonte natural com menos toxicidade ao animal e o homem para o controle do *H. contortus*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-helmíntico de extratos de *Gliricidia sepium* e *Acacia mearnsii* para o controle de nematoides gastrointestinais de caprinos. Assim esta monografia esta dividida em dois capítulos:

- Capítulo 1: EFICIÊNCIA *in vitro* DE EXTRATOS DE *Gliricidia sepium* SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAS DE CAPRINOS ARTIFICIALMENTE INFECTADOS. Este capítulo será submetido ao periódico da revista **Brasileira de parasitologia Veterinária**.

- Capítulo 2: EFICIÊNCIA *in vivo* DE EXTRATOS DE *Acacia mearnsii* SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAS DE CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS. Este capítulo será submetido ao periódico da revista **Brasileira de parasitologia Veterinária**.

BIBLIOGRAFIA

ALVES, F. S. F. O leite de cabra é tão nutritivo quanto os leites de vaca e materno? **Revista Ciência Hoje**, 32, 20-26, 2002.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; AGUILARCABALLERO, A. J.; HOSTE, H. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 153, 3-4, 313-319, 2008.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two in vitro assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2-4, p. 360-364, 2011.

AMARANTE, A.F.T. **Controle de endoparasitoses dos ovinos**. 2004. Disponível em:

< <http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/repman4.htm> > Acesso em 25 de out. de 2014.

AVOSEH, O.N.; OYEDEJI, O.O.; AREMU, K.; NKEH-CHUNGA, B.N.; SONGCA, S.P.; OLUWAFEMI, S.O.; OYEDEJI, A.O. Chemical composition and anti-inflammatory activities of the essential oils from *Acacia mearnsii* de Wild. **Natural Product research**, 29(12):1184-8, 2015

BRUNETON, J. Tanins. In *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales* (3rd edn), pp 370–404, Tec and Doc, 1999.

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

CHIEJINA, S. N. The epidemiology of helminth infections of domesticated animals in the tropics with emphasis on fascioliasis and parasitic gastroenteritis. In: Chowdhury, N., Tada, I. (Eds.), **Perspectives on Helminthology**. Science Publishers Inc., Enfield, p. 41-87. 2001.

CHAGAS, A.C.S.; VERISSIMO, C.J. Principais enfermidades e manejo sanitário de ovinos. 1ed, São Carlos, Embrapa Pecuária Sudeste, 2008.

COELHO, W.DC.; AHID, S.M.N.; VIEIRA, L.S.; FONSECA, Z.A.A.S. SILVA, I.P. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró. **Ciência Brasileira**, 1, 3, 589-599, 2010.

CHARLIER, J. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. **Vet Rec.**, 175, 250-255, 2014.

CASTREJÓN-PINEDA, F.A.; MARTÍNEZ-PÉREZ, P.; CORONA, L.; CERDAN, J.L. V.; MENDONZA G.V. Partial substitution of soybean meal by *Gliricidia sepium* or *Guazuma ulmifolia* leaves in the rations of growing lambs. **Tropical Animal Health Production**, 2015.

COSTA-JUNIOR, L.M.; COSTA, J.S.; LÔBO, I.C.P.D.; SOARES, A.M.S.; ABDALA, A.L.; CHAVES, D.P.; BATISTA, Z. S.; LOUVANDINI, H. Long-term effects of drenches with condensed tannins from *Acacia mearnsii* on goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, 205,725–729, 2014.

FAO. **FAOSTAT Statistics Division** 2015. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

GUIMARÃES FILHO, C.; HOLANDA JR., E.V. A caprinocultura com alternativa de uso sustentado dos recursos do semi-árido: proposições para o desenvolvimento integrado da zona caprinícola do semi-árido baiano. In: Seminário Internacional Sociedades e Territórios no Semi-Árido Brasileiro: em busca da sustentabilidade. Campina Grande, 2002. Editora UFCG, 2002.

GENNARI S. M.; AMARANTE A. F. T. Helminhos de ovinos e caprinos. **Biológico**, 67, 13-17, 2006.

- GABA, S. et al.. Experimental and modeling approaches to evaluate different aspects of the efficacy of Targeted Selective Treatments of anthelmintics against sheep parasite nematodes. **Veterinary Parasitology**, 171, 254–262, 2010.
- HOSTE, H.; Jackson, F.; Athanasiadou, S.; Thamsborg, S.M.; Hoskin, S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, 22, 6, 2006.
- HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, 180, 144-154, 2011.
- HOSTE, H.; MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVALCASTRO, C.A. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary parasitology**, 186, 18–27, 2012.
- IBGE, **Censo Agropecuário**. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2015. Disponível em: < www.ibge.gov.br > Acesso em: 24 fev. 2017.
- KENYON, F. et al. The role of target selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, 164, 3-11, 2009.
- KENYON, F., JACKSON, F. Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. **Veterinary Parasitology**, 186, 10-17, 2012.
- LESSA, C.S.S. et al. Avaliação de segurança de uma formulação injetável de nitroxil 34% em caprinos (*Capra hircus*) no Rio de Janeiro, Brasil. **A Hora Veterinária**, 138, 42-5, 2004.
- LIMA, W.C. et al. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30, 12, 1002-1009, 2010.
- LIU, Z.; ZHOU, L.; LIU, D.; ZHU, Q.; CHEN, W. Inhibitory mechanisms of *Acacia mearnsii* extracts on the growth of *Microcystis aeruginosa*. **Water Science Technology**, 71, 856-861, 2015.
- OLIVEIRA, L.D.R. Plantas Medicinais como Alternativa para o Controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes in vitro e in vivo. Dissertação de mestrado, 2013.

MELO, A. C. F. L., BEVILAQUA, C. M. L., Resistência anti-helmíntica em nematódeos de pequenos ruminantes: Uma revisão, **Ciência animal**, 12, 1, 35-45, 2002.

MINHO, A.P. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrointestinais em ovinos. Tese, 2006.

MINHO, A.P., BUENO, I.C., GENNARI, S.M., JACKSON, F., ABDALLA, A.L. In vitro effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, 17, 147–151, 2008.

MINHO, A. P.; FILIPPSEN, L. F.; AMARANTE, A. F. T.; ABDALLA, A. L. Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on 16 ENDOPARASITOSSES DE OVINOS: Conhecer para Combater the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. **Ciência Rural**, 40, 6, 1360-1365, 2010a.

Minho, A.P.; Gennari, S.M. Anthelmintic effects of condensed tannins on *Trichostrongylus colubriformis* in sheep experimentally infected. *Seminário ciência Agraria*, 31, 1009–1016, 2010.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R., LÓPEZ-ORTIZ, S., ORTEGA-CERRILLA, M. E., SORIANO ROBLES, R., HERRERA-HARO, J. G., LÓPEZ-COLLADO, J., ORTEGA JIMÉNEZ, E. Preference, consumption, and weight gain of sheep supplemented with multinutritional blocks made with fodder tree leaves. **Livestock Science**, 149, 185–189, 2012.

MINHO, A.P. Endoparasitoses de ovinos: conhecer para combater. Circular Técnico. 2014.

NOGUEIRA-FILHO, A.; KASPRZYKOWSKI, J.W.A. **O agronegócio da caprinoovinocultura no Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2006. 56p.

NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, 11, 3, 330-338, 2009.

NUNES, R.L. Análise genética de isolados do *Haemonchus* sp isolados de ruminantes domésticos para identificação da resistência ao anti-helmíntico Benzimidazol. Dissertação de mestrado. 2012.

OLIVEIRA, L.D. R. PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DE *Haemonchus contortus* EM OVINOS: TESTES IN VITRO E IN VIVO. Dissertação de mestrado, 2013.

PRICHARD R K, HALL C A, KELLY J D, MARTIN I C A AND DONALD D A. (1980). The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, 56, 239– 250, 1980.

PERRANDO, E.R., CORDER, M.P.M., 2006. Rebrotas de cepas de *Acacia mearnsii* em diferentes idades, épocas do ano e alturas de corte. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 555–562, 2006.

PAIVA, L. J. M.; NEVES, M. F., Controle orgânico de parasitoses, *Revista Científica de Eletrônica de Medicina Veterinária* – ISSN 1679-7353, Ano XII, n.12, 2009.

PUSPITASARI, S.; FARAJALLAH, A.; SULISTIAWATI, E.; MULADNO. Effectiveness of Ivermectin and Albendazole against *Haemonchus contortus* in Sheep in West Java, Indonesia. **Tropical Life Sciences Research**, 27, 135–144, 2016.

PINTO, F.G.R.; SILVA, F. C.F.; BARBOSA, A.P. Evaluation of Phytochemical Profile and Haemolytic Activity of *Acacia mearnsii*. **British Journal of Pharmaceutical Research**, 14, 1-6, 2016.

SHERRY, S. P. *The Black Wattle (Acacia mearnsii)*. Pietermaritzburg: University of Natal Press, 1971. 402 p.

STEWART, J.L.; ALLISON, G.E.; SIMONS, A.J. *Glicidia sepium: genetics resources for farms*. Oxford, Forestry Institute, University of Oxford, 1996.

SCHNEIDER, P.R.; CAMILLO, S.B.A; FINGER, C.A.G.; FRIZZO, S.M.B. Determinação de equações da produção de tanino de acácia negra, *Acacia mearnsii* De Wild. *Ci. Fl.* 9,103-113, 1999.

SOUTELLO, R.V. G. et al. Seleção de bovinos de corte resistentes a verminose. **Ciências Agrárias**, 2, 2, 53-56, 2002.

SCHUMACHER, M.V.; BRUN, E.J.; RODRIGUES, L.M.; SANTOS, E.M. Retorno de nutrientes via deposição de serrapilheira em um povoamento de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild.) no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Árvore**, 27, 791- 798, 2003.

SANTOS, A. C. G. et al. Estudo preliminar do parasitismo por helmintos gastrintestinais em ovinos deslanados da Baixada Maranhense. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, 13, 262, 2004.

THOMAZ-SOCCOL, V. T. et al. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, 139, 17, 421-2, 1996.

TAYLOR, M.A. et al. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, 103, 3, 183-94, 2002.

TORRES-ACOSTA, J. F. L.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro intestinal parastism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, 77, 2, 159-173, 2008.

TORRES-ACOSTA J.F.J. et al.. Nutritional manipulation of sheep and goats for the controlo f gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. **Small Rumnant Research**, 103, 28-40, 2012.

VAN WYK, J.A.; BATH, G.F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, 33, 509-529, 2002.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral: EMBRAPA CAPRINOS, 2005.

WANDER, A.E. et al. A caprino-ovinocultura como alternativa de geração de emprego e renda no Nordeste do Brasil. Sobral. Encontro Estadual de caprino-ovinocultura, 1. Ceará. **Anais...** Sobral, 2003.

CAPÍTULO 1

EFICIÊNCIA *in vitro* DE EXTRATOS DE *Gliricidia sepium* SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAS DE CAPRINOS ARTIFICIALMENTE INFECTADOS.

Artigo será submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

RESUMO

De várias formas a forrageira *Gliricidia sepium* tem sido utilizada com bastante eficácia na agropecuária, seu uso se estende ao combate a endoparasitos de ruminantes. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* da leguminosa *Gliricidia sepium* sobre a perda da cutícula larvar de caprinos artificialmente infectados. As larvas foram obtidas pelo método de coproculturas, mantidas refrigeradas e o teste de eliminação seguindo o método de Bahuaud et al, 2006. Para o processo de desembainhamento artificial foi utilizado hipoclorido de sódio 1%. Três concentrações (mg/ml) do extrato das folhas de Gliricídia (600; 1200; 1200 + PVPP; Controle) realizados em triplicata foram utilizadas para analisar atividade sob o desembainhamento de larvas dos nematoides, desenvolvido em placas de 24 poços. Os resultados obtidos demonstrados em gráfico revelam que nas concentrações de 600µg/ml, 1200µg/ml e 1200µg/ml + polivinilpoli-pirrolidona (PVPP) o percentual de perda cuticular dos grupos tratados permaneceu abaixo de 15 %, logo, houve ação na inibição do desembainhamento larvar, porém sem eficácia do tanino condensado.

Palavras- chave: Caprinos, *Gliricidia sepium*, Compostos secundários.

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura é um setor produtivo importante em termos socioeconômico, porém este sistema tem sido prejudicado pelo parasitismo com nematoides gastrointestinais (RODRIGUES et al., 2007). A verminose é ocasionada por várias espécies de helmintos, representando o principal problema de manejo sanitário aos pequenos ruminantes, provocando grandes perdas econômicas, como diminuição da produção de leite e carne, efeitos no desenvolvimento do animal, gastos com anti-helmínticos e morte (TAYLOR et al., 2007; MOLENTO et al., 2013).

O controle dos nematoides gastrointestinais é realizado com anti-helmínticos químicos, entretanto o uso inadequado tem acelerado a resistência entre populações de nematoides gastrointestinais (MOTTIER & PRICHARD, 2008; KUMSA & ABEBE 2009; DEBELA et al., 2012). Produtos ativos de plantas tem sido uma possível alternativa para o controle de nematoides gastrointestinais (GITHIORI et al., 2006). Os taninos condensados encontrados em plantas forrageiras tem sido explorado como uma possível alternativa para o controle de nematoides gastrointestinais (DEBELA et al., 2012). O consumo de plantas com taninos condensados por pequenos ruminantes tem interferido na biologia de diferentes espécies de vermes (NIEZEN et al., 2002a, b). No entanto, o modo de ação dos taninos condensados permanece pouco compreendido (HOSTE et al., 2006; MUELLER-HARVEY, 2006).

Estudos tem demonstrado efeito de taninos condensados sobre nematoides gastrointestinais em caprinos infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus* (PAOLINI et al., 2003). Taninos condensados demonstrou redução significativa de ovos de nematoides gastrointestinais em caprinos (LANDAU et al. 2010). *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud, nomeada vulgarmente no Brasil como Gliricídia, é nativa do México. Com alto valor proteico (variando de 20 a 30% de proteína bruta), a leguminosa vem sendo explorada como forrageira para bovinos, ovinos, suínos, caprinos, aves e coelhos e tem demonstrado resultando no aumento de produção (ABDULRAZAK et al., 1997; CARVALHO FILHO et al., 1997).

Além de nutritiva a *Gliricidia sepium* apresenta-se como excelente fonte de metabólitos secundários, estes têm demonstrado efeitos anti-helmínticos principalmente sobre *Haemonchus contortus* (ROJAS et al., 2006). Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de folhas de Gliricídia sobre a perda da cutícula larvar de helmintos gastrintestinais a partir de testes *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta de plantas e preparação dos extratos (Makkar et al, 1999)

Coletadas na Vila União, no município de Chapadinha, estado do Maranhão, as folhas de *Gliricídia* foram secas à sombra e trituradas em moinho. Ao material vegetal triturado, foi adicionado acetona 70% e o conteúdo foi sonicado por 20 minutos, o extrato foi rotaevaporado à 48°C e lavado quatro vezes com 500 mL de diclorometano, para remoção de clorofila e lipídios, seguido de secagem (40°C) e mantido sob refrigeração a 4°C.

2.2. Quatificação de Taninos

A quantificação de fenóis totais e taninos totais se realizou pelo método Folin-Ciocalteu (MAKKAR et al., 2003), enquanto que a quantificação de taninos condensados foi desenvolvida segundo o método butanol – HCl, descrita por PORTER et al. (1986).

2.3. Coprocultura

Para obtenção de larvas do 3º estágio (L3) foram coletadas fezes de caprino sem vermifugação a mais de 60 dias, em que sua carga parasitária foi analisada pelo método de centrífugo-flutuação. As fezes dos animais foram coletadas diretamente da ampola retal e posteriormente realizadas coproculturas de acordo com ROBERTS & O'SULLIVAN (1950). Após 15 dias, L3 foram devidamente coletadas e mantidas refrigeradas a 4°C. As larvas obtidas foram das seguintes espécies de nematoides gastrintestinais: *H. contortus*, *Trichostrongylus columbriformes* e *Oesophagostomum columbianum*.

2.3. TESTES IN VITRO

2.3.1 Teste de inibição da eliminação da cutícula larvar

Para garantir a integridade do teste analisou-se antes a viabilidade das larvas a partir da técnica de Baermann com algumas modificações, assim as larvas foram retiradas do meio refrigerado e colocadas em cálices de sedimentação que tinham em seu topo peneiras cobertas com gases, e em seu interior mantinham água com temperatura aproximada de 38 °C. Após 4 horas as larvas que migravam da superfície da gaze para água morna no interior do cálice (hidrotropismo + termotropismo) eram coletadas para análise microscópica e posterior contagem de larvas viáveis para dar início ao teste.

Seguindo o método de BAHUAUD et al. (2006), foram incubadas 1200 L3 a 27°C, durante 3h, para cada concentração do extrato testado em triplicata (diluído em DMSO 3%). Os testes foram realizados com concentrações de 1200 e 600µg/ml de extrato e mais

1200µg/ml de extrato + polivinilpoli-pirrolidona (PVPP). O PVPP é um polímero sintético que apresenta alta afinidade com tanino formando complexos, precipitando-os e minimizando seus efeitos, assim, sua utilização teve por objetivo saber se a ação da planta sob nematoides gastrintestinais está relacionada a compostos fenólicos, como taninos. As larvas foram lavadas e centrifugadas quatro vezes com PBS (0,1M fosfato de sódio; 0,05M NaCl; pH 7,2), evitando assim qualquer interferência do meio.

As larvas foram colocadas em placas de 24 poços (100 L3/poço) e submetidas a processos artificiais de perda cuticular, com auxílio de hipoclorito de sódio (1%). Assim foi observado com auxílio do microscópio invertido o percentual de desembainhamento das larvas dos quatro grupos em estudo. As placas foram analisadas com a contagem das larvas com bacia e sem bacia de cada poço de 10 em 10 minutos até completar 60 minutos, das quatro repetições de cada grupo. Dos resultados obtidos foi tirado o percentual de larvas desembainhadas de todos os grupos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coproculturas realizadas apresentaram as seguintes espécies de nematoides gastrintestinais: *H. contortus*, *Trichostrongylus columbriformes* e *Oesophagostomum columbianum*.

Os resultados demonstraram no controle desembainhamento gradual, em 60 minutos com aproximadamente 100% das larvas desembainhadas. Entretanto, o extrato na concentração de 1200 e 600 mg/ml demonstrou interferência na perda cuticular das larvas, com percentual de perda abaixo de 20% (figura 1). O extrato com PVPP demonstrou que impediu a perda cuticular dos nematoides gastrintestinais, com percentual também abaixo de 15% (gráfico 1).

O efeito do tanino condensado (compostos fenólicos), encontrado nas mais variadas espécies de plantas, tem sido alvo de muitos estudos no combate a nematoides gastrintestinais, por apresentarem capacidade de interferir nos processos biológicos dos parasitas, como reguladores de crescimento e também no comportamento alimentar (CHAGAS, 2004; HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011).

Na literatura encontram-se eficiências comprovadas deste composto a partir da ação das folhas de *Gliricidia sepium* sobre *H. contortus* (ROJAS et al., 2006). *Gliricidia sepium* testada sobre larvas L3 de *H. contortus* foi capaz de interferir no desembainhamento das larvas com 73% de atividade, além de interferir na migração larvar de *H. contortus* em

concentrações de 1,200; 600; 300 e 150 $\mu\text{g/ml}$ (FERNEX et al., 2012), e ainda sobre o comportamento alimentar (ÁLVAREZ et al., 2012).

O PVPP tem a habilidade de se ligar ao tanino condensado bloqueando a ação do composto fenólico e assim impossibilitando os compostos fenólicos de agir sobre os nematoides gastrointestinais (ATHANASIADOU et al., 2001; MOLAN et al., 2003). A partir desses resultados sugere-se que o tanino condensado não agiu sobre a perda cuticular dos nematoides gastrointestinais, no qual possivelmente outros compostos presentes no extrato podem ter agido e possibilitado ter o efeito de perda cuticular das larvas.

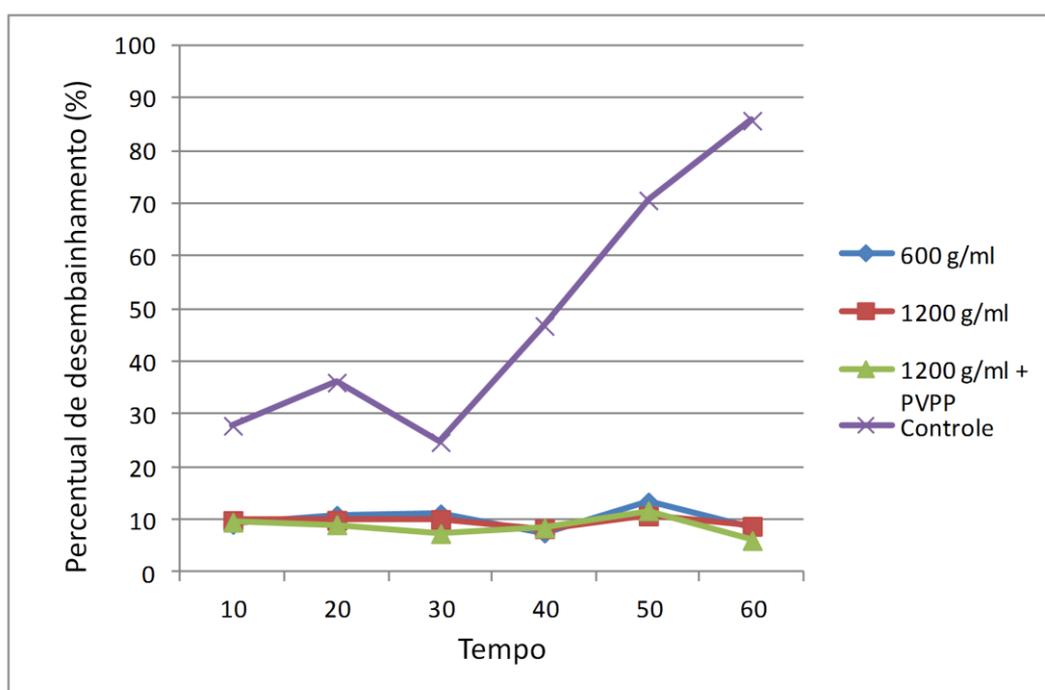


Gráfico 1- Percentual de perda cuticular nas concentrações de 600 $\mu\text{g/ml}$, 1200 $\mu\text{g/ml}$, 1200 $\mu\text{g/ml}$ + PVPP analisados de 10 -60min.

4. CONCLUSÃO

A forrageira Gliricídia apresenta efeito sobre a perda da cutícula de nematoides gastrintestinais, porém a ação da leguminosa sobre nematoides não se direciona a taninos condensados.

REFERENCIAS

- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol* 2001; 99 (3):205-219.
- Álvarez LR, Jackson F, Greer A, Bartley Y, Grant G, Huntley JF. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet Parasitol* 2012; 186:390-398.
- Bahuaud D. et al. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitol* 2006; 132(4): 45-554.
- Chagas ACS. Ação ovicida de produtos a base de eucalipto sobre helmintos de caprinos. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13(1): 268.
- Debela E, Tolera A, Eik LO, Salte R. Condensed tannins from *Sesbania sesban* and *Desmodium intortum* as a means of *Haemonchus contortus* control in goats. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44:1939–1944.
- Githiori JB, Athansiadou S, Thamsborg SM. Use of plants novel approaches for control of gastro Intestinal helminths in livestock with emphasis-on small ruminants. *Vet. Parasitol* 2006; 139:308–320.
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 2006; 22: 253–261.
- Kumsa B, Abebe G. Multiple anthelmintic resistances on a goat farm in Hawassa (Southern Ethiopia). *Tropical Animal Health and Production* 2009; 41: 655–662.
- Landau S, Azaizeh H, Muklada H, Glasser T, Ungar ED, Baram H, Abbas N, Markoviccs A. Anthelmintic activity of *Pistacia lentiscus* foliage in two Middle Eastern breeds of goats differing in their propensity to consume tannin-rich browse. *Veterinary Parasitol* 2010; 173: 280–286.
- Makkar HPS. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 2003; 49: 241-256.

- Molan AL, Meagher LP, Spencer PA, Sivakumara S. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. Int J Parasitol 2003; 33(14):1691-1698.
- Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. J. Sci. Food Agric 2006; 86: 2010–2037.
- Mottier ML, Prichard RK. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. Pharm Genomics 2008;18 (2):129-140.
- Molento MB, Verissimo CJ, Amarante AT, Wyk JAV, Chagas ACS, Araújo JV, Borges FA. Alternativas para o Controle de Nematoides Gastrointestinais de Pequenos Ruminantes. Arq. Inst. Biol., São Paulo 2013; 80(2): 253-263.
- Niezen JH, Charleston WAG, Robertson HA, Shelton D, Whaghorn GC, Green R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. Vet Parasitol 2002a; 105: 229–245.
- Niezen JH, Charleston WAG, Robertson HA, Shelton D, Whaghorn GC, Green R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. Vet Parasitol 2002b; 105: 229–245.
- Niezen JH, Whaghorn GC, Graham T, Carter JL, Leathwick DM. The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. Vet Parasitol 2002; 105: 269–283.
- Paolini V, Bergeaud JP, Grisez C, Prevot F, Dorchies PH, Hoste H. 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 2003; 113: 253–261.
- Roberts FHS, O'Sullivan PJ. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. Aust J Agric Res 1950;1:99-102.
- Rojas DK, López J, Tejada I, Vázquez V, Shimada A, Sánchez D, Ibarra F. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian

gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. *Anim Feed Sci Technol* 2006; 128: 218-228.

Rodrigues AB, Athayde ACR, Rodrigues OG, Silva WW, Faria EB. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesq. Vet. Bras* 2007; 27(4):162-166.

Son-de Fernex EV, Alonso-Díaz MA, Valles-de la Mora B, Capetillo-Leal CM. In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp Parasitol* 2012; 131: 413–418.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Veterinary parasitology*. 3.ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 874p.

CAPÍTULO 2
EFICIÊNCIA *in vivo* DE EXTRATOS DE *Acacia mearnsii* SOBRE NEMATOIDES
GASTRINTESTINAS DE CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS.

Artigo será submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

RESUMO

Acacia mearnsii tem sido foco de vários estudos, e demonstrado eficiência no controle da parasitose gastrintestinal de caprinos, por ação do tanino condensado. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vivo* de *Acacia mearnsii* sobre nematoides adultos e quantidade de ovos das fêmeas parasitas. No experimento 24 cabritos foram divididos em três grupos (Controle não tratado; Tratado com anti-helmíntico Levamisole e Albendazole; Tratado com tanino) e dispostos em local com pastagem *Andropogon gayanus*, suplementados com milho, soja, proteína bruta, água e sal mineral à vontade. O grupo tratado com tanino recebia 4g via sonda do extrato de Acácia semanalmente. Após tratamento de 192 dias ocorreu o abate, e dos caprinos recolheu-se direto do abomaso e intestinos um total de 17.936 parasitos e algumas fêmeas foram selecionadas para contagem de ovos. Para identificação dos endoparasitos foi utilizado a chave de acordo com Ueno; Gonçalves (1998), e a partir deste, os resultados obtidos mostraram uma diminuição considerável na carga parasitária no grupo tratado com tanino, porém não influenciou na produção de ovos.

Palavras- chave: Caprinos, *Acacia mearnsii*, Tanino condensado.

1. INTRODUÇÃO

Nematoides Gastrointestinais são parasitos de pequenos ruminantes causadores de grandes perdas econômicas no mundo (SON-De FERNEX et al., 2012). Os prejuízos econômicos são retardo no desenvolvimento dos animais, diminuição de carne e leite, gastos com anti-helmínticos e mortalidade (TAYLOR et al., 2007). Anti-helmínticos convencionais é o principal controle desses parasitos de pequenos ruminantes (HERNÁNDEZ-VILLEGAS et al., 2012). Problemas com resistência aos anti-helmínticos e o crescimento de exigências por produtos sem resíduos químicos tem se buscado alternativas para o controle de nematoides gastrointestinais (JACKSON & MILLER, 2006; TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008).

O uso de plantas ou etnoveterinária como alternativa tem sido cada vez mais viável para o controle de nematoide gastrointestinal (TARIK et al., 2009). Taninos condensados têm sido estudado para o possível uso no controle de nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes (PAOLINI et al., 2003). Os taninos são polifenóis de alto peso molecular constituídos de polímeros de catequina e classificados como proantocianidinas e prodelfinidinas (HOSTE et al., 2006).

O tanino pode ser extraído da espécie de planta *Acacia mearnsii*, que tem sido utilizados para diversos fins (COSTA-JUNIOR et al., 2014). Esta espécie de planta tem uma grande capacidade de ser fixadora de nitrogênio no solo, além de incorporar material orgânico no solo (SCHUMACHER et al., 2003). É uma espécie de planta encontrada na Austrália, África e outras regiões tropicais (SHERRY, 1971). *Acacia mearnsii*, mais comumente conhecida como Acácia negra, está entre as espécies que compõem o sistema silvicultural. A leguminosa é utilizada como fonte de matéria prima para indústria coureira e de celulose além serem consideradas recuperadoras de solos. (PERRANDO; CORDER, 2006).

Estudos apontam registros de taninos condensados em sua casca e seu efeito anti-helmíntico contra nematoides gastrintestinais em testes *in vivo* (MINHO et al., 2010) e *in vitro* (MINHO et al., 2008). Animais tratados com taninos encontrados na *A. mearnsii* foi capaz de reduzir a carga parasitária dos animais entre 150 e 192 dias de experimentos (COSTA-JUNIOR et la., 2014). Assim o objetivo deste trabalho foi testar *in vivo* a ação do tanino condensado oriundo da casca de *Acacia mearnsii* sobre helmintos gastrintestinais e sobre o número de ovos presentes nas fêmeas endoparasitas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Localização do experimento, seleção de ruminantes

Realizado no Estado do Maranhão, Brasil, nas dependências do município de Brejo, e em paralelo na Universidade Federal do Maranhão, na cidade de Chapadinha. Foram selecionados 24 cabritos híbridos da raça Anglo-Nubiana, entre três e cinco meses de idade, e desparasitados com doses anti-helmínticas de Closantel e Cloridrato de Levamisole. Despostos em local com pastagem *Andropogon gayanus* infectada por nematoides gastrintestinais e suplementados com 70% de milho, 30% de soja e 18% de proteína bruta.

2.2. Divisão dos grupos e extração do tanino

Durante 192 dias os animais foram divididos em 3 grupos, sendo: Grupo controle não tratado; Grupo tratado com anti-helmíntico comercial no dia 120 do experimento (Levamisole e Albendazole); e Grupo tratado com tanino (4g de *A. mearnsii* por animal administrado semanalmente via sonda). O tanino provindo da casca da *A. mearnsii* foi extraído de acordo com o método butanol – HCl, descrita por PORTER et al, (1986). O pó continha 16,7% de tanino condensado.

2.3. Abate dos caprinos, recuperação e catalogação de endoparasitos

Os animais foram submetidos ao abate e deles retirou-se os intestinos e o abomaso. A recuperação dos nematoides ocorreu a partir da lavagem do material removido e com auxílio de estereomicroscópio os parasitos foram despostos em meio formalina 10% (formol) para conservação e posterior contagem e identificação.

O método utilizado para clarificar e diafanizar os vermes foi descrito por UENO; GONÇALVES (1998). Logo, todos foram retirados do formol e colocados sobre lâminas contendo meio de Hoyer's. A identificação por espécie ocorreu com auxílio de microscópio óptico de acordo com UENO; GONÇALVES (1998).

2.4. Contagem de ovos

Do total dos endoparasitos gastrintestinais encontrados, selecionou-se 45 fêmeas, sendo a escolha feita igualmente entre as espécies para observação e contagem da quantidade de ovos presentes. Logo foram analisadas 15 fêmeas de *H. contortus*, 15 fêmeas de *T. columbiformes* e 15 fêmeas de *O. columbianum*.

Após seleção, a contagem dos ovos ocorreu com auxílio de microscópio invertido (ZEISS) para análise do interior das fêmeas. Ao microscópio ZEISS foi acoplado uma câmera para a realização da contagem no próprio microscópio, facilitando assim o processo tanto de fotografia quanto de percentual na quantidade de ovos. O teste estatístico foi Kruskal Wallis foi utilizado para definir se houve ou não diferença significativa. Para confirmar a ação do tratamento admite-se neste teste um valor crítico de “p” menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$ ou $p = 0,05$), que corresponde a 95 % de chance de ser eficiência do tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 17.936 helmintos parasitando os animais do experimento sendo as espécies: *Haemonchus sp*, *H. contortus*, *T. columbriformis*, *T. axei*, *Oesophagostomum sp*, *O. columbianum*, *Trichuris sp*, *Cooperia sp* (figura 1). A média de helmintos adultos variou entre os grupos experimentais sendo que no grupo controle foi encontrada uma média de 1123,0 helmintos/animal. No grupo tratado com anti-helmíntico (ATH) e tanino condensado (TC) foi observada uma média de 828,7 e 450,1 helmintos/animal (Tabela 1), respectivamente. *H. contortus* representou uma média de 1097,9 no grupo controle, e uma variação na média dos tratados 764,7 do grupo ATH e 375,3 do grupo TC.

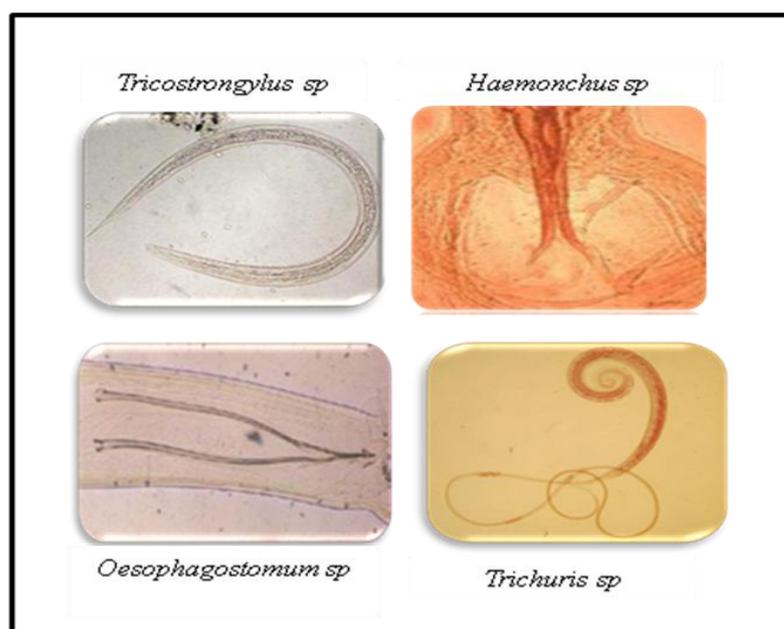


Figura 1. Fotos dos nematoides adultos.

	Controle	ATH	TC
Helmintos/animal	1123,0	828,7	450,1

Tabela 1. Média da quantidade de helmintos por animal divididos por grupo de tratamento

Na análise da contagem dos ovos dispostos em tabela 2, obteve-se para *Haemonchus* spp., no grupo controle uma média por fêmea de 247 ovos, no grupo tratado com tanino média de 295 ovos e 219 ovos no grupo tratado com anti-helmíntico. Para *Trichostrongylus* spp., a média por fêmea foi de 25 ovos no grupo controle, 24 ovos no grupo tratado com tanino e 23 ovos no grupo tratado com anti-helmíntico. Para *O. columbianum* a média foi de 409 ovos por fêmea no grupo controle, 323 no grupo tratado com tanino e 273 ovos no grupo tratado com anti-helmíntico (Figura 2).

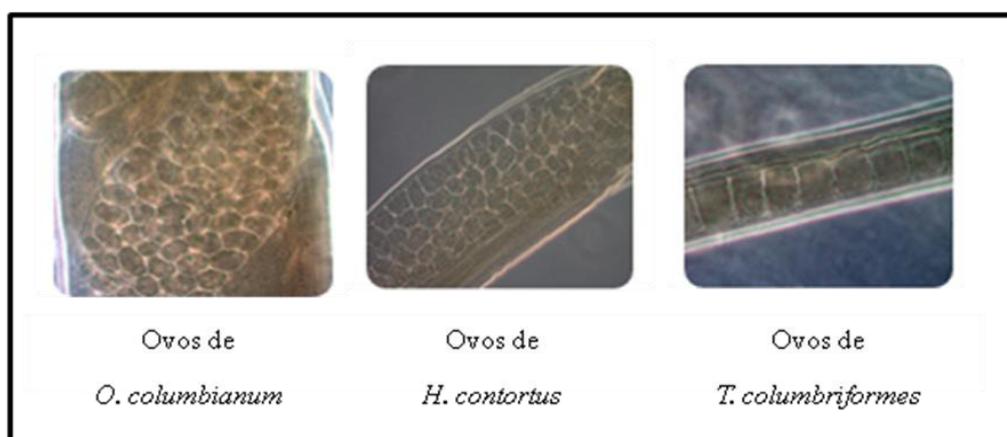


Figura 2: Ovos de nematoides gastrointestinais de caprinos infectados artificialmente

Espécie/Grupos	Controle	TC	ATH
<i>Haemonchus</i> spp	247	295	219
<i>Trichostrongylus</i> spp	25	24	23
<i>O. columbianum</i>	409	323	273

Tabela 2. Média da quantidade de ovos por fêmeas

Dentre os parasitos de grande importância sanitária estão: *H. contortus*, *T. colubriformis*, *Strongyloides spp.*, *Cooperia curticei* e *O. columbianum*. O nematoide *H. contortus* apresentam-se em destaque pelos prejuízos observados nos hospedeiros durante sua infecção, que podem ser de anemia, hipoproteinemia (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011), e que pode levar a morte (BOWMAN et al., 2003).

Atualmente, tem-se feito uso dos testes *in vitro* para a análise da ação ovicida e larvicida de extratos vegetais, por serem métodos rápidos, possibilitando a avaliação preliminar da existência de propriedades anti-helmínticas, sendo considerado o primeiro passo para caracterização dos possíveis compostos ativos presentes nos extratos vegetais (COSTA et al., 2006). O efeito do tanino condensado (metabólito secundário), encontrado nas mais variadas formas de plantas, tem sido alvo de muitos estudos no combate a nematoides gastrintestinais (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011).

O mecanismo de ação dos taninos condensados sobre os nematoides gastrointestinais ainda é pouco conhecido, no entanto acredita-se que os taninos pode afetar diretamente no estabelecimento, alimentação, fecundidade, reprodução além de se ligar e afetar a cutícula dos nematoides (NIEZEN et al., 1995; ATHANASIADOU et al., 2000a). Os taninos por se ligar a proteínas são reportados por reduzir o número de ovos e aumentar a expressão de respostas imunes do hospedeiro aos parasitos (BOWN et al., 1986; COOP & HOLMES, 1996).

A ação *in vitro* da casca de *A. mearnsii* apresenta-se eficiente contra a carga de nematoides gastrintestinais (MINHO et al., 2008), sendo que a maioria dos testes *in vivo* é feito com ovinos, com resultados satisfatórios no combate ao endoparasitas de ruminantes (MINHO et al., 2010). Neste trabalho a ação da casca de *A. mearnsii* sobre nematoides adultos apresentou redução na carga parasitária, isso leva a afirmar sua eficiência também contra os endoparasitos de caprinos, porém são necessários mais estudos ligados a este controle na caprinocultura.

Com relação a quantidade de ovos presentes nas fêmeas, não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) na quantidade de ovos presentes no útero de *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, e *O. columbianum* do grupo tratado e controle.

4. CONCLUSÃO

A administração via sonda de tanino condensado oriundo da casca da *A. mearnsii* ocasiona uma diminuição considerável na carga parasitária adulta de caprinos, porém não influenciou a produção de ovos no útero das fêmeas endoparasitas.

REFERENCIAS

- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. Effects of short term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Rec* 2000a; 146:713–734.
- Bown MD, Poppi DP, Sykes AR. The effect of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in lambs. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod* 1996; 46: 27–30.
- Bowman DD, Georgi JR, Lynn RC. *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. 8 ed., Missouri: Saunders Publishing Company, 2003. 422 p., 2003.
- Coop, R.L., Holmes, P.H., 1996. Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* 26, 951–962.
- D'Mello, J.P.F., 1992. Chemical constraints to the use of tropical legumes in animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38, 237–261
- Costa CTC, Bevilaqua CML, Maciel MV, Camurça Vasconcelos ALF, Morais SM, Monteiro MVB, Farias VM, Silva MV, Souza MMC. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol* 2006; 137:306-310.
- Costa-Junior LM, Costa J S, Lôbo ICPD, Soares AMS, Abdala AL, Chaves DP. Long-term effects of drenches with condensed tannins from *Acacia mearnsii* on goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2014; 205:725–729.
- Hoste H, Jackson F, Athanasiado S, Thamsborg SM, Hoskin SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol*; 22(6):253-261.
- Hoste H, Torres-Acosta JFJ. Non chemical control of helminthes in ruminnats: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Vet Parasitol*; 180(1):144-154.
- Hernández-Villegas MM, Borges-Argáez A, Rodríguez-Vivas RI, Torres-Acosta JFJ, Méndez-González M, Cáceres-Farfán M. In vivo anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. *Vet Parasitol* 2012; 189: 284–290.
- Jackson F, Miller JE. Alternative approaches to control – Quo vadis. *Vet. Parasitol* 2006; 139:371–384.

- Minho AP, Bueno IC, Gennari SM, Jackson F, Abdalla AL. In vitro effect of condensed tannin extract from acácia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. *Rev Bras Parasitol vet* 2008;17:147-151.
- Minho AP, Filippesen LA, Amarante AFT, Abdalla AL. Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformes* in sheep. *Cienc. Rural* 2010; 40: 1360-1365.
- Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WAG, Waghorn GC, 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either Lucerne (*Medicago sativa*) or Sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *J. Agric. Sci* 1995; 125:281–289.
- Paolini V, Bergeaud JP, Grisez C, Prevot F, Dorchie PH, Hoste H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2003; 113: 253–261.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BC. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding an delphinidin. *Phytochem* 1986; 25: 223-230.
- Perrando ER, Corder MPM. Rebrotas de cepas de *Acacia mearnsii* em diferentes idades, épocas do ano e alturas de cortes. *Pesq. Agrop. Bras* 2006; 41: 555-562.
- Sherry SP. *The Black Wattle (Acacia mearnsii)*. Pietermoritzburg: University of Natal Press, 1971. 402 p.
- Schumacher MV, Brun EJ, Rodrigues LM, Santos EM. Retorno de nutrientes via deposição de serrapilheira em um povoamento de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild.) no estado do Rio Grande do Sul. *Rev Árv* 2003; 27(6):791-798.
- son-de Fernex EV, Alonso-Díaz MA, Valles-de la Mora B, Capetillo-Leal CM. In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp Parasitol* 2012; 131: 413–418.
- Ueno H, Gonçalves PC. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. *J Int Cooperation Agency* 1998:143.
- Taylor, M.A.; Coop, R.L.; wall, R.L. *Veterinary parasitology*. 3.ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 874p.
- Torres-Acosta JFJ, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rumin Res* 2008; 77:159–173.
- Tarik KA, Chishti MZ, Ahmad F, Shawl AS. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Vet Parasitol* 2009; 160: 83–88.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os produtos ativos encontrados em plantas das espécies de *Acacia mearnsii* e *Gliricidia sepium* como os taninos condensados apresentaram um efeito sobre perda cuticular de larvas e produção de ovos de nematoides gastrointestinais de caprinos, porém estudos detalhados do modo de ação dos taninos sobre o comportamento, fisiologia e biologia dos nematoides gastrointestinal deverão ser realizado em trabalhos futuros.