

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO E ENSAIO
TOXICOLÓGICO EM *Artemia salina* DE PLANTAS PRESENTES NO
ECÓTONO AMAZÔNIA E CERRADO: *Leucaena leucocephala*,
Parkia platycephala e *Senna alata***

Benta Natânia Silva Figueiredo

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins.

Área de concentração: Produção Animal

ARAGUAÍNA

2014

BENTA NATÂNIA SILVA FIGUEIREDO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO E ENSAIO
TOXICOLÓGICO EM *Artemia salina* DE PLANTAS PRESENTES NO ECÓTONO
AMAZÔNIA E CERRADO: *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e
*Senna alata***

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins.

Área de concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof. Dr^a Viviane Mayumi Maruo

ARAGUAÍNA

2014

BENTA NATÂNIA SILVA FIGUEIREDO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO E ENSAIO
TOXICOLÓGICO EM *Artemia salina* DE PLANTAS PRESENTES NO ECÓTONO
AMAZÔNIA E CERRADO: *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e
*Senna alata***

Dissertação aprovada como requisito para a
obtenção do título de Mestre, tendo sido julgada
pela Banca Examinadora formada pelos
professores e profissionais:

Presidente: Prof. Dr^a Viviane Mayumi Maruo- Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS-UFT

Membro: Prof. Dr. Joseilson Alves Paiva
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS-UFT

Membro externo: Prof. Dr^a Ana Patricia Yatsuda-Natsui
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- USP

Araguaína, 26 de Fevereiro de 2014

Dedico a minha mãe Maria José, as minhas irmãs Janaina, Janaize, Karoline e Pâmela, a meu afilhado Luís Honorino e a meu pai Honorino (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas, principalmente pela dádiva da vida e capacidade de superar as dificuldades e conquistar vitórias.

Agradeço aos meus pais, Honorino A. Figueiredo (*in memoriam*) e Maria José S. Figueiredo, pelo amor e incentivo para realizar meus sonhos, paciência e acima de tudo, o respeito em todas as situações. Pelos princípios morais e éticos que contribuíram para minha formação.

Às minhas irmãs, Janaina, Janaize, Karolline e Pâmela por me apoiar e aconselhar em todas as decisões, pelo carinho e cumplicidade. E ao meu afilhado Luís Honorino que tanto me alegrou nos momentos que precisava.

À Professora Viviane Mayumi Maruo pela orientação, apoio, incitamento e confiança em mim. Obrigada!

Aos meus familiares, tios, primos e amigos por estarem sempre me apoiando.

A todos os professores, colegas e servidores que contribuíram para realização de mais uma etapa na minha vida.

Aos professores Dr. Joseilson Paiva, Dr. Alberto Yim Jr, Dr^a Clarissa Cordova, Dr^a Héciléia D. Santos e Dr. Marcello O. Sato pelos ensinamentos e contribuição para realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Elis Regina, Gilzele e Gleison pela atenção e ajuda prestada. Obrigada!

Às minhas colegas de laboratório e amigas Daiene, Obede, Nahúria, Mayara, Nádia, e em especial a Laiane que tanto me ajudou nesta reta final. MUITÍSSIMO obrigada meninas.

Aos alunos de iniciação científica Glads e Antonio.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical, da Universidade Federal do Tocantins, pelo aperfeiçoamento de minha formação profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE QUADROS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO.....	14
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.2.1 Helmintoses.....	16
1.2.2 Quimioterápicos e Resistência Parasitária	17
1.2.3 Fitoterapia.....	18
1.2.4 <i>Leucaena leucocephala</i>	20
1.2.5 <i>Parkia platycephala</i>	21
1.2.6 <i>Senna alata</i>	22
REFERÊNCIAS.....	24

CAPÍTULO II - Estudo fitoquímico e ensaio toxicológico em *Artemia salina* de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*

RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	29
2.1 INTRODUÇÃO.....	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.2.1 Material vegetal.....	31
2.2.2 Estudo Fitoquímico.....	32
2.2.2.1 Obtenção do extrato bruto (EB).....	32
2.2.2.2 Particionamento por polaridade de solventes para a obtenção do extrato hexânico (EH), acético (EA), butanólico (EBu) e aquoso (EAq).....	32
2.2.2.3 Prospecção fitoquímica.....	33
2.2.2.3.1 Teste para Taninos e Fenóis.....	34
2.2.2.3.2 Teste para Saponinas.....	34
2.2.2.3.3 Teste de Cianidina ou Shinoda.....	34
2.2.2.3.4 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides.....	34
2.2.2.3.5 Teste para Alcaloides.....	35
2.2.3. Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	35
2.3. RESULTADOS.....	36
2.3.1 Estudo fitoquímico.....	36
2.3.2 Avaliação da toxicidade em <i>Artemia Salina</i>	39
2.4 DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	46

CAPÍTULO III- Avaliação da atividade anti-helmíntica de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*, plantas presentes no ecótono Amazônia e Cerrado

RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	51
3.1 INTRODUÇÃO.....	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.1 Obtenção dos extratos.....	54
3.2.2 Testes parasitológicos.....	54
3.2.3 Coprocultura	55
3.2.4 Atividade ovicida.....	55
3.2.5 Atividade larvicida.....	56
3.2.5.1 Cultivo <i>in vitro</i>	56
3.2.5.2 Teste de sensibilidade.....	56
3.3 RESULTADOS.....	57
3.4 DISCUSSÃO.....	60
4 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I – Revisão de Literatura

- Figura 1** – *Leucaena leucocephala* coletada no município de Araguaína-TO..... 21
Figura 2 – *Parkia platycephala* coletada no município de Araguaína-TO..... 22
Figura 3 – *Senna alata* coletada no município de Araguaína-TO..... 23

Capítulo II - Estudo fitoquímico e ensaio toxicológico em *Artemia salina* de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*

- Figura 1** – Fluxograma para obtenção do extrato hexânico (EH), acetático (EA), butanólico (EBu) e aquoso (EAq)..... 33
Figura 2 – *L. leucocephala*. Tubo 1 contendo EA e tubo 2 contendo EA reagindo com HCl + Mg..... 38
Figura 3 – Teste qualitativo para taninos e fenóis. Tubo 1 observa-se reação positiva para taninos hidrolisados no EA de *P. platycephala*, tubo 2 contendo água destilada e FeCl₃..... 38
Figura 4 - EBU das folhas de *S. alata* foi positivo para fenóis (A) e flavonoides (B). EA- *S. alata* (folha) positivo flavonoides (C) e chalconas e auronas e fenóis (D)..... 39
Figura 5 - Teste positivo para chalconas e auronas (A) e positivo para fenóis (B) no EA das flores de *S. alata*; Teste qualitativo para flavonas, flavonóis e xantonas foi positivo no EBU (C); EH positivo para flavononóis (D)..... 39
Figura 6 - Taxa de mortalidade de *Artemia salina* 24 horas após à exposição a várias concentrações de extrato bruto (EB), hexânico (EH), acetático (EA), butanólico (EBu) e aquoso (EAq) das folhas de *L. leucocephala* (A), folhas de *S. alata* (B), flores de *S. alata* (C), e folhas de *P. platycephala* (D). As concentrações estão apresentadas em log..... 41

Capítulo III - Avaliação da atividade anti-helmíntica de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*, plantas presentes no ecótono Amazônia e Cerrado

Figura 1- Ovinos do Departamento de ovinocultura. Animais caridados em sistema semiconfinado..... 54

LISTA DE QUADROS

Capítulo II - Estudo fitoquímico e ensaio toxicológico em *Artemia salina* de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*

- Quadro 1** - Número de extrações por solvente durante o particionamento dos extratos brutos..... 33
- Quadro 2** - Tabela de cores observados com a variação de pH do material..... 35
- Quadro 3** - Prospecção dos constituintes químicos dos extratos bruto (EB), hexânico (EH), acético (EA), butanólico (EBu) e aquoso (EAq)..... 37

LISTA DE TABELAS

Capítulo II - Estudo fitoquímico e ensaio toxicológico em *Artemia salina* de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*

Tabela 1 - Rendimento dos extratos obtidos a partir dos extratos brutos.....	36
Tabela 2 - Concentrações letais de 50% (CL ₅₀) dos extratos testados de <i>L. leucocephala</i> , <i>Senna alata</i> e <i>Parkia platycephala</i>	40

Capítulo III - Avaliação da atividade anti-helmíntica de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*, plantas presentes no ecótono Amazônia e Cerrado

Tabela 1 - Médias de ovos por grama de fezes (opg) e prevalência de gêneros de Tricostromgilídeos em amostras fecais de ovinos naturalmente infectados.....	57
Tabela 2 - Percentual médio de eclosão de ovos de Tricostromgilídeos submetido a diferentes concentrações de extrato bruto de plantas.....	58
Tabela 3 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto das folhas <i>Leucaena leucocephala</i>	58
Tabela 4 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto das folhas <i>Parkia platycephala</i>	59
Tabela 5 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto das folhas de <i>Senna alata</i>	59
Tabela 6 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto de flores de <i>Senna alata</i>	59

RESUMO

As afecções causadas por parasitas gastrintestinais são responsáveis por grandes prejuízos econômicos na criação de pequenos ruminantes. O controle das helmintoses é realizado principalmente por fármacos, entretanto, tais produtos vêm sendo administrados de forma indiscriminada promovendo a seleção de linhagens resistentes. Nesse sentido, a fitoterapia vem se destacando, entretanto, pouco se conhece sobre o real potencial tóxico e terapêutico das plantas, dessa forma faz-se necessário estudos que verifiquem esses efeitos. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o perfil fitoquímico das folhas de *Leucaena leucocephala* e *Parkia platycephala*, e folhas e flores de *Senna alata*, assim como, verificar a toxicidade em *Artemia salina* e efeitos nematicidas. O material vegetal foi seco, macerado e concentrado em evaporador rotativo à temperatura de 45°C para obtenção do extrato bruto, a partir do qual, foi submetido ao particionamento por polaridade de solventes e, assim, obtidos as frações hexânicas, acetáticas, butanólicas e aquosas para análise fitoquímica e determinação das CLs50 através de ensaios de toxicidade em *A. salina*, *in vitro*. Para avaliação da atividade ovicida e larvicida foram utilizados os extratos brutos. No teste de inibição de eclosão, a suspensão de ovos foi distribuída em microtubos com o EB diluídos em solução de Tween 80 a 3% nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL, em triplicata. Após aplicação dos extratos, as placas foram incubadas a 26 ±1 °C por 48 horas, e após esse período realizado as leituras. Para avaliar a ação lavicida, os EBs foram diluídos em solução de Tween 80 a 1% e testados sobre larvas desembainhadas, nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL, em triplicata. As leituras foram realizadas a cada 24 horas por 4 dias, começando a partir do D0. O estudo das folhas de *L. leucocephala* revelou a presença de fenóis, taninos condensados, flavonoides e saponinas. Os testes das folhas de *P. platycephala* revelaram presença de taninos hidrolisados e saponinas. Os testes fitoquímicos com as folhas de *S. alata* foi positivo para fenóis chalconas e auronas, flavonas, flavonóis e xantonas, e saponinas. Já as flores foram positivas para fenóis, chalconas e auronas, flavonas, flavonóis e xantonas, e flavononóis. Os extratos que apresentaram as CLs mais tóxicas foram os das folhas de *L. leucocephala* e *S. alata*, enquanto que os extratos das folhas de *P. platycephala* e flores de *S. alata* demonstraram baixa toxicidade sobre *A. salina*. A mortalidade observada pode ser atribuída à atividade dos metabólitos secundários identificados nos testes fitoquímicos. Os extratos brutos das folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, e folhas e flores de *S. alata* promoveram efeito significativo sobre a inibição de desenvolvimento de ovos, *in vitro*. O estudo demonstrou ainda que as folhas de *P. platycephala* e *S. alata* possuem ação anti-helmíntica sobre larvas infectantes de tricostrongíldeos.

Palavras-chaves: controle parasitário; plantas do cerrado; plantas taníferas;

ABSTRACT

The diseases caused by gastrointestinal parasites are responsible for great economic losses in small ruminants breeding. The control of helminths is accomplished primarily by synthetic anthelmintic medicines. However, these drugs have been administered indiscriminately, promoting the selection of resistant strains of worms. On the other hand, herbal medicines have been proposed as an alternative way for treatment of small ruminants infected by these parasites. However, little is known about of both toxic and therapeutic potentials of plants that could control these helminths in small ruminants. Therefore, additional studies are required to verify the possible effects of these plants. In this context, the aim of this study was to evaluate the phytochemical profile of the leaves of *Leucaena leucocephala* and *Parkia platycephala*, and leaves and flowers of *Senna alata*, as well as verify toxicity in *Artemia salina* and their nematicides effects. The plant material was dried, concentrated and homogenized in a rotoevaporator at 45°C to obtain the crude extract (CE). After this procedure, this material was subjected to solvent partitioning polarity and was obtained hexanic, acetatic, butanolic and aqueous fractions. These fractions were used for phytochemical analysis and CL50 determination through toxicity testing in vitro. Crude extracts were used to evaluate their ovicidal and larvicidal properties. In the hatching inhibition test, the egg suspension was distributed in microtubes with CE diluted in a solution containing 3% Tween 80 at concentrations of 0.05 , 0.1, 0.5, 1.0 and 1, 5 mg/ml, in triplicate. After administration of the extract, the plates were incubated at 26 ± 1 ° C during 48 hours and thereafter read. To assess their larvicida action, CEs were diluted in a Tween 80 in 1% solution and tested on larvae at concentrations of 1.0, 2.5, 5.0 and 7.5 mg/ml, in triplicate. Readings of the samples were taken every 24 hours for 4 consecutive days, starting from D0. The analysis of the leaves of *L. leucocephala* revealed the presence of phenols, condensed tannins, flavonoids and saponins. The tests of the sheets *P. platycephala* hydrolysates revealed the presence of tannins and saponins. Phytochemical tests on the leaves of *S. alata* were positive for phenols, auronas chalcones, flavones, flavonols, xanthones, and saponins. Moreover, the flowers were positive for phenuronas, chalcones, flavones, flavonols, xanthones and flavononois. The extracts that showed the most toxic effects on *A. salina* were the leaves of *L. leucocephala* and *S. alata*, while extracts from leaves of *P. platycephala* and flowers of *S. alata* showed low toxicity. The mortality rate can be due to the activity of the secondary metabolites identified in phytochemical tests. Extracts from the leaves of *L. leucocephala*, *P. platycephala*, and leaves and flowers of *S. alata* promoted significant effect on inhibition of egg development in vitro. The study also showed that the leaves of *P. platycephala* and *S. alata* have anthelmintic action on infective larvae Trichostrongylidae.

Keywords: parasite control; cerrado plants; tanniferous plants;

Capítulo I – Revisão de Literatura

1.1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais e no tratamento de doenças remonta aos primórdios da humanidade (NEWMAN; CRAGG, 2007). A comprovação da eficácia farmacológica de plantas com uso popular e a busca por novos compostos com propriedades farmacêuticas tem sido objetivo de estudos nos últimos anos. Esse interesse é perceptível tanto em âmbito nacional como internacional, visto o grande potencial terapêutico e econômico desses produtos para indústria farmacêutica (BARREIRO; BOLZONI, 2009).

Diversas doenças têm sido alvo de pesquisas que envolvem plantas, dentre as quais estão as nematodioses gastrintestinais, que são responsáveis por prejuízos econômicos em rebanhos comerciais das várias regiões do Brasil (CARMUÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

A busca por formas de controle alternativo tem se intensificado em vista do surgimento de resistência aos anti-helmínticos convencionais (FURTADO, 2008). Outro fator que contribui para o desenvolvimento desses estudos é o alto custo para pesquisa de novas bases químicas. Assim, o uso popular de plantas no tratamento de enfermidades vem sendo objetivo de estudos como uma alternativa para substituir medicamentos convencionais, de alto custo e causadores de resistência parasitária, por medicamentos de origem natural (OLIVER et al., 2006).

Plantas taníferas possuem efeitos comprovados sobre o controle de nematoides gastrointestinais, por meio da inibição da eclosão de ovos e paralisia larvar (MOLAN et al., 2003). *Leucaena leucocephala* e *Parkia platycephala* são leguminosas perenes, que apresenta altos níveis de proteínas e taninos. A última é conhecida popularmente como faveira, fava-de-bolota ou visgueira; espécies desse gênero vêm sendo estudadas como possível agente antimicobriano (OW; STUPANS, 2003).

Senna alata, conhecida popularmente como fedegação ou mata-pasto, é uma planta que pertence à família Fabaceae e vem sendo utilizada popularmente no tratamento de verminoses intestinais (RODRIGUES et al., 2010).

A utilização de fármacos derivados de plantas e a fitoterapia na medicina científica só poderá ocorrer se estes produtos cumprirem os critérios de eficácia e segurança, para que possa ser garantida que sua administração a organismos vivos ocorra sem riscos à saúde (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil fitoquímico das folhas de *Leucaena leucocephala* e *Parkia platycephala*, e folhas e flores de *Senna alata*, assim como, verificar a toxicidade e efeitos nematocidas.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Helmintososes

A pecuária mundial tem enfrentado nos dias atuais uma série de empecilhos de caráter econômico em decorrência das perdas causadas por doenças de origem parasitária. Nos países em desenvolvimento, as helmintososes gastrintestinais representam um dos principais fatores limitantes à exploração de pequenos ruminantes (NUNES et al., 2013).

As gastrenterites causadas por nematódeos geram perda de peso, diminuição do rendimento de carcaça, anemia e edema de mucosas. Outras perdas significativas estão relacionados a casos extremos como mortalidade de animais, especialmente jovens e fêmeas ovinas no peri-parto (ALMEIDA et al., 2005). Amarante e Sales (2007) afirma que praticamente 100% dos ruminantes domésticos são portadores de pelo menos uma espécie de endoparasita.

Entre os parasitas que infectam os ruminantes estão os chamados tricostrongilídeos, pertencentes à família Trichostrongylidae, são vermes pequenos e capilariformes, e tem como principais agentes causadores de prejuízos os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia* (FONSECA et al., 2011).

O ciclo de vida da maioria dos nematódeos apresenta duas fases distintas: a fase de vida parasitária e a fase de vida livre. A fase parasitária ocorre no organismo do hospedeiro, onde a larvas infectantes (L3), após serem ingeridas pelo animal, desenvolvem-se até a fase adulta, se reproduzem, e então o animal passa a eliminar os ovos pelas vezes, e a fase de vida livre, que ocorre na pastagem, e que vai do ovo, passando por L1, L2, até chegar a L3 (BASSETO et al., 2009). Os animais ao ingerirem as larvas infectantes (L3) presentes na pastagem passam a apresentar a parasitose. As larvas podem sobreviver de seis meses a mais no ambiente, dependendo das condições climáticas (DAVID et al., 2007).

Fatores como a umidade relativa do ar, incidência de radiação solar e temperatura, podem afetar tanto a resposta do organismo animal, como também o comportamento de alguns parasitas durante a fase de vida livre. Em regiões tropicais, sob à necessidade de condições de criação intensiva, a ocorrência de

endoparasitas é maciça levando ao controle da infestação por meio do uso de anti-helmínticos a cada três a quatro semanas (DAVID et al., 2007).

1.2.2 Quimioterápicos e Resistência Parasitária

A principal forma de controle das helmintoses gastrointestinais é através de quimioterápicos (MOLENTO et al., 2013).

A resistência anti-helmíntica é um fenômeno pelo qual parasitas conseguem sobreviver a doses de um fármaco que são letais para uma população susceptível. É determinada quando a eficácia do fármaco decresce a níveis inferiores a 95% de redução da carga parasitária (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011).

Os parasitas, na sua maioria, são homozigotos susceptíveis (SS), alguns são indivíduos heterozigotos (SR e/ou RS) e uma parcela mínima de homozigotos resistentes (RR), chegando a percentuais 0,01% de indivíduos RR ou dominantes o que predispõe início do processo de seleção, logo após o primo contato com um composto antiparasitário. Quando a eficácia a um determinado medicamento é diminuída em decorrência de resistência do parasita ao químico, muda-se a base e inicia-se então o tratamento dos animais com um novo produto, gerando um segundo processo de seleção independente. Desta forma, após certo período de tempo, a população será composta por indivíduos que apresentam resistência múltipla, ou seja, resistência a todas as famílias de fármacos, resultando no esgotamento de todos os fármacos disponíveis (MOLENTO, 2005).

Um dos fatores que contribuem para o agravamento da resistência é o fato de que, em virtude do alto custo dos produtos anti-helmínticos convencionais, a maioria dos produtores não promove o tratamento adequado dos seus rebanhos, usando subdosagens ou periodicidade inadequada, o que conseqüentemente, leva ao desenvolvimento da resistência por parte dos parasitas (FORTES; MOLENTO, 2013) Além disso, há o inconveniente efeito residual sobre os produtos de origem animal ou a excreção destes princípios ativos para o meio ambiente, acarretando na poluição do mesmo (FURTADO, 2008).

Segundo Chagas (2004) a vulnerabilidade dos produtos químicos diante da capacidade de sobrevivência dos parasitas, faz com que eles tenham tempo de uso pré-determinado.

Em decorrência das grandes perdas na criação de ruminantes associadas às parasitoses e a não elucidação completa dos mecanismos de desenvolvimento de resistência parasitária aos anti-helmínticos, preconiza-se a associação de métodos alternativos e a utilização correta dos anti-helmínticos para controlar as infecções (MOLENTO, 2004).

1.2.3 Fitoterapia

As plantas são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas. Elas sintetizam uma grande variedade de moléculas que são responsáveis pela sua sobrevivência e desenvolvimento. Nas plantas, os compostos responsáveis pelas funções vitais são denominados metabólitos primários, enquanto que os secundários estão envolvidos com a adaptação da planta ao meio (HARAGUCHI; GÓRNIK, 2008).

Sabe-se que, muitos dos fármacos produzidos são derivados de produtos naturais ou foram desenvolvidos por síntese química a partir destes (BARREIRO; BOLZONI, 2009). Estima-se que 25 a 30% das drogas produzidas tem origem natural (SOUSA et al., 2008).

A fitoterapia consiste no uso de plantas no tratamento de enfermidades, onde as raízes, cascas, folhas, frutos e sementes são utilizados no preparo de extratos ou infusões para serem consumidos. A Organização Mundial da Saúde já reconhece a fitoterapia como uma alternativa viável e importante às populações dos países em desenvolvimento, uma vez que seu custo é reduzido e vem sendo comprovado cientificamente como eficaz no tratamento de algumas enfermidades (OMS, 2000).

O emprego da fitoterapia como método alternativo, associado a fármacos anti-helmínticos, visa à sustentabilidade, à minimização do impacto ambiental das práticas agropecuárias e a redução do uso excessivo do controle químico das parasitoses (CEZAR; BATISTA; BIANCHIN, 2008). Entretanto, o uso de plantas com fins terapêuticos, sem orientação apropriada, é fator de preocupação que deve ser considerado, dada a incidência de espécies com registro de toxicidade e contraindicações de uso (TOMAZZONI; NEGRELLE, CENTA, 2006).

Um levantamento, realizado no Estado do Pará, demonstrou que a maioria das pessoas entrevistadas desconhece o efeito tóxico das plantas locais. O estudo

permitiu verificar ainda, que 25% dos casos de intoxicação por plantas relatados se deve à utilização com fins medicinais (VASCONCELOS; VIEIRA; VIEIRA, 2009).

O controle de helmintoses por meio de extratos de ervas é hábito comum na população. Pesquisas realizadas nas universidades brasileiras já identificaram mais de 350 mil espécies vegetais, o que permite uma ampla variedade aos possíveis usos medicinais. Segundo Furtado (2008), 106 espécies de plantas foram registradas possuindo algum efeito vermífico, pertencentes a 83 gêneros e 40 famílias, onde as famílias que apresentaram maior número de espécies com alguma atividade antiparasitária foram: Asteraceae (17 spp), Fabaceae (15 spp), Lamiaceae (10 spp) e Meliaceae (5 spp). A infusão de folhas é principal forma de preparo dos produtos medicinais, com 23,6% das citações; seguida de frutos com 10,4% de indicações e sementes (9,4%). Outras partes vegetais são usadas com menor frequência, tais como: cascas, flores, seiva, raízes, partes aéreas, brotos, bulbos, troncos, água de tronco e polpa. Do levantamento realizado apenas 17,9% das plantas eram indicadas para tratamento de parasitas encontrados em ruminantes, sendo o restante de uso contra diversas espécies de parasitas, ou não especificou contra quais parasitas eram eficazes.

Testes “*in vitro*” vêm sendo realizados para avaliar o potencial antiparasitário de metabólitos secundários de plantas. Dentre as plantas medicinais que apresentam ação sobre vermes destacam-se o melão de São Caetano (*Mormodica charantia* L.), a batata de purga (*Operculina hamiltonii*) e a semente de jerimum (*Cucurbita pepo* L.), dos quais são utilizadas as folhas e, às vezes, os talos e os frutos. Segundo Almeida et al. (2007), em condições experimentais as plantas acima citadas apresentaram eficácia na redução de helmintoses gastrintestinais de caprinos.

Chenopodium ambrosioides, conhecida como mastruço, mastruz, erva-de-santa-maria, chá-do-méxico, erva-formigueira e quenopódio, é outra planta de aplicação fitoterápica sobre vermes, que pertence à família Chenopodiaceae. Os hidrocarbonetos terpênicos (cimeno, limoneno e terpineno) e o ascaridiol, onde efeito nematicida vem sendo atribuído a este princípio (SANTOS; CORREA, 2006).

Em estudos realizados com extrato metanólico e aquoso de *Euphorbia helioscopia*, *in vitro*, sobre larvas de *Haemonchus contortus* foi verificado morte após 8 horas de exposição. Os extratos também promoveram redução significativa na de eclosão de ovos (LONE et al., 2012).

A ação terapêutica de alguns extratos vegetais está associada a metabólitos secundários, os quais têm função aparente na defesa a eventuais predadores (CHAGAS, 2004).

As forrageiras leguminosas da família Fabaceae são pesquisadas, uma vez que são ricas em taninos (CEZAR; BATISTA; BIANCHIN 2008). Os taninos podem exercer ação anti-helmíntica por meio da redução de eclosão, desenvolvimento e desembainhamento larvar e motilidade de adultos (OLIVEIRA et al., 2011).

As saponinas, outro metabólito secundário, possuem importante papel no sistema de defesa das plantas, e estão presentes principalmente nos tecidos mais vulneráveis ao ataque de parasitas. A atividade de proteção ocorre devido à interação das saponinas com os esteroides de membrana do parasita (WINA; MUETZEL; BECKER, 2005).

Assim, esses metabólitos podem apresentar algum potencial terapêutico no controle de verminoses.

O Norte do Estado do Tocantins caracteriza-se como uma zona de transição Amazônia e Cerrado, possuindo uma grande variedade de plantas. Pouco se conhece sobre o efeito terapêutico das plantas presentes nesta região. *L. leucocephala*, *P. platycephala* e *S. alata* são espécies nativas (RODRIGUES et al., 2010), que podem apresentar potencial terapêutico contra nematoides em decorrência da presença de seus metabólitos.

1.2.4 *Leucaena leucocephala*

Leucaena leucocephala (Figura 1) é considerada uma leguminosa de alta qualidade, pertencente a família Fabaceae, sendo encontrada nos trópicos e subtropicais. É bastante nutritiva e palatável (ALMEIDA et al., 2006), possuindo altos níveis de proteína e taninos condensados (D'MELLO; ACAMOVIC, 1989). Em decorrência do seu teor proteico, que varia de 22 a 25%, é bastante utilizada na alimentação de ruminantes (ARAÚJO; ALBUQUERQUE, FILHO, 2006).

Plantas taníferas tem sido objeto de estudo para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes, visto que, os taninos provenientes de plantas possuem efeito antiparasitário, agindo de forma a inibir a eclosão de ovos e promovendo a paralisia larvar (MOLAN et al., 2003). A redução da carga parasitária de nematoides foi verificada em ovinos alimentados com plantas taníferas (MINHO,

et al., 2008). Assim, a presença de taninos na planta justifica estudos sobre um possível potencial nematicida.



Figura 1- *Leucaena leucocephala* coletada no município de Araguaína-TO.

1.2.5 *Parkia platycephala*

Parkia platycephala, conhecida popularmente como faveira, fava-de-bolota ou visgueira, é planta arbórea da família Fabaceae, subfamília *Mimosoideae*, que também é usada suplementação alimentar de ruminantes (SILVA et al., 2012).

Não existem relatos do uso da planta para fins medicinais, entretanto vários estudos vem sendo realizados com espécies do gênero para tratamento de distúrbios gastrointestinais, como antioxidante (FERNANDES, et al., 2010) e antimicrobiano (OW; STUPANS, 2003). Segundo Fernandes, et al. (2010), triterpenos e lupeol, isolados da *P. pendula*, vêm sendo investigado como gastroprotetor.

Já o extrato aquoso de *P. biglobosa* (Jacq.) apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (EL-MAHMOOD; AMEH, 2007).

Em investigações, as folhas de *P. platycephala* apresentaram saponinas (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010), um metabólito presente nas plantas, que estar envolvido diretamente no sistema de defesa contra parasitas. Assim, *P. platycephala* pode apresentar potencial para o controle de verminos gastrointestinais.



Figura 2 - *Parkia platycephala* coletada no município de Araguaína-TO.

1.2.6 *Senna alata*

Senna alata (L.) Roxb, conhecida popularmente como fedegoso ou mata pasto, pertencente à família Fabaceae, é uma planta perene, com propriedade arbustiva, com crescimento vegetativo extremamente rápido e tendência à formação de estandes puros (RODRIGUES, et al., 2009).

O período de maior floração coincide com o período de maior pluviosidade e maiores temperaturas (AGUIAR, 1992). A temperatura, a umidade relativa e o fotoperíodo podem influenciar a produção e o desenvolvimento de botões, flores e frutos (MARQUES; OLIVEIRA, 2004). O seu extrato possui propriedades terapêuticas e vem sendo utilizado na medicina popular como antimicrobiano, anticatarral, hipoglicemiante, diurético e analgésico (ORDOÑEZ et al., 2004). A planta vem sendo utilizada como vermífida em humanos e animais, na forma de infusão das flores. As pessoas relatam sentir vantagens ou melhoras em relação ao desconforto ou distúrbios causados pelos endoparasitos (VIANA et al., 2008), porém, deve ser ministrada com cuidado, pois pode apresentar efeitos tóxicos aos rins e causar abortos (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009).

Segundo o mesmo, espécies do gênero *Senna* são ricas em flavonoides, antraquinonas e polissacarídeos. Também já foram relatados para esse gênero esteroides, alcaloides piperidínicos, isoquinolinas, cromonas, lactonas, estilbenos e

triterpenos. Na espécie a presença de cumarinas, flavonoides e ácidos graxos podem ser encontrados em todos os pontos da planta.



Figura 3 – *Senna alata* coletada no município de Araguaína-TO.

Atualmente, a busca por formas de controle alternativo de helmintoses tem estimulado estudos que visam verificar a ação antiparasitária de plantas. Entretanto, além de se comprovar potencial terapêutico, faz-se necessário avaliar toxicidade destas para determinar segurança e eficácia. Dessa forma, no presente trabalho avaliou-se o perfil fitoquímico, toxicidade e efeito nematicida de *L. leucocephala*, *P. platycephala* e *S. alata*, plantas presentes na região de transição Amazônia e Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. R. M. **Fenologia, sistema de reprodução, ecologia da polinização e dispersão de *Senna alata* (Caesalpinioideae, Leguminosae)**. 1992, 144p. Dissertação de Mestrado, Universidade de Campinas, Brasil, 1992.
- ALMEIDA, A. P. M.G; KOMMERS, G. D.; NOGUEIRA, A. P. A.; JÚNIOR, L. G. B.; MARQUES, B. M. F. P.; LEMOS, R. A. A. Avaliação do efeito tóxico de *Leucaena leucocephala* (Leg Mimosidae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p.190-194, 2006.
- ALMEIDA, L. R.; CASTRO. A. A.; SILVA. J. F.; FONSECA, A. H. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes, na estação seca da Baixada Fluminense, RJ. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.14, n.3, p89-94, 2005.
- ALMEIDA, V. F.; SILVA, M. L. C. R.; FARIAS, E. B. DE; ATHAYDE, A. R.; SILVA, W. W. Avaliação de plantas medicinais em caprinos da região do semiárido paraibano naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais. **Caatinga**, v.20, n.3, p.01-07, 2007.
- AMARANTE, A.F.T.; SALES, R.O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade**, v. 1, n. 2, 2007. Disponível em:< <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/44> >. Acesso em 29 de jan de 2014.
- ARAÚJO, G.G.L DE; ALBUQUERQUE, S.G.DE; FILHO, C.G. Opções no uso de forrageiras arbustivo-arbóreas na alimentação animal no semi-árido do nordeste. In: **Simpósio Brasil**, 2006. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB886.pdf > Acesso em: 29 jan. 2014.
- BARREIRO, E. J. BOLZONI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BASSETTO, C.C.; SILVA, B. F. DA; FERNANDES, S; AMARANTE, A. F. T.; Contaminação da pastagem com larvas infectantes de nematoides gastrintestinais após o pastejo de velhas resistentes ou susceptíveis à verminose. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 63-68, out.-dez. 2009.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F; MORAIS, S.M; SANTOS, L. F. L; ROCHA, M. F.G; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Medicina**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.
- CEZAR, A. S.; BATISTA, J.; BIANCHIN,C. I.; Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v.38, n.7, out, 2008.
- CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.156-160, 2004.

COSTA, V. M.M, SIMÕES S. V.D; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 65-71, 2011.

DAVID, R. O.; ALMEIDA, R. D.; SOUZA, W. A.; MOÇO, H. F. Resistência de larvas de helmintos em pastagens com ovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 08, 2007.

D'MELLO, J.P.F.; ACAMOVIC, T. *Leucaena leucocephala* in poultry nutrition- A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 28, p. 01-28, 1989.

EL-MAHMOOD, A. M; AMEH, J. M. *In vitro* antibacterial activity of *Parkia biglobosa* (Jacq.) root bark extract against some microorganisms associated with urinary tract infections. **African Journal Biotechnology**, v. 06, n. 11, 2007.
Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57441>. Acesso em: 29 jan. 2014.

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

FERNANDES, H.B.; SILVA, F.V.; PASSOS, F.F.B.; BEZERRA, R.D.S.; CHAVES, M.H.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C.M. Gastroprotective effect of the ethanolic extract of *Parkia platycephala* Benth. leaves against acute gastric lesion models in rodents. **Biological Research**, v.43, p. 451-457, 2010.

FONSECA, Z.A.A.S.; BEZERRA, A.C.A.; AVELINO, D.B.; NASCIMENTO, J.O.; MARQUES, A.S.C.; VIEIRA, L.S.; AHID, S.M.M. Relação sexual do parasitismo por *Haemonchus contortus* em Caprinos (*Capra hircus*). **PUBVET**, v. 5, n. 31, 2011.

FURTADO, S.K. Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes de eclodibilidade *in vitro* e testes de eficácia *in vivo*. **Biblioteca da Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2008. Disponível em:
<<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=ad&id=533938&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22FURTADO,%20S.%20K.%22&qFacets=autoria:%22FURTADO,%20S.%20K.%22&sort=&paginaAtual=1>> Acesso: 28 jan. 2014.

HARAGUCHI, M.; GÓRNIAC, S., L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. Baurueri: Manole, 2008. 14, p. 365-414.

LONE, B.A.; CHISHTI, M.Z.; BHAT, F.A.; TAK, H.; BANDH, S.A. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of *Euphorbia helioscopia* L. **Veterinary Parasitology**, v.189, p.317-321, 2012.

MARQUES, M. C. M.; OLIVEIRA, P. E. A. M. Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas florestas de restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.713-723, 2004.

- MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S.M.; ABDALLA, A.L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 172-181, 2008.
- MOLAN, A.L., MEAGHER, L.P., SPENCER, P.A., SIVAKUMARAN., S. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*, **International Journal for Parasitology**, v.33, n.14, p.1691-8, 2003.
- MOLENTO, M. B. Resistência de Helmitos em Ovinos e Caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, 2004.
- MOLENTO, M.B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo **Ciência Rural**, v.35, n.6, 2005.
- MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; VAN WYK, J. A.; CHAGAS, A. C. S.; ARAÚJO, J. V. DE; BORGES, F. A. Alternativas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.2, p.253-263, 2013.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.
- OLIVEIRA, L.M.B. DE; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M. DE; CAMURÇA-VASCONCELOS; A.L.F.; MACEDO, I.T.F. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v.41, n.11, 2011.
- OLIVER, E. A.; PRADO, H.A.S.; RODRÍGUEZ, F.I.P.; ESCANDÓN, M.C.C.; GONZÁLEZ, M. A. A. Actividade antihelmíntica in vitro de extractos de *Azadirachta indica*, *A. juss*, *Momordica charantia* e *Chenopodium (Teloxys) ambrosioides*. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v.7, n.11, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>> Acesso em: 29 jan. 2014.
- OMS - **Organización Mundial De La Salud**. Situación regulamentaria de los medicamentos: una resena mundial. Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, 2000, 62p.
- ORDOÑEZ, M.G.; GOVÍN, S.; BLANCO, E.G.; ANGELES, M.; Atividade antimicrobiana de *Senna alata* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, v. 9, n.1, 2004.
- OW Y.Y., STUPANS I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, Jun, v.4(3), p. 241-8, 2003. **Resumo**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769668?dopt=Abstract>> Acesso em: 19 dez 2013.

NUNES, R. L.; SANTOS, L. L.DOS; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A.; BRASIL, B. S. A. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 548-553, 2013.

RODRIGUES, I.M.C; SOUZA-FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A.; DEMUNER, A.J. Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 1-12, 2010.

RODRIGUES, I.M.C., SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

SANTOS, S. G.; CORREA, R. X. Diversidade genética de *Chenopodium ambrosioides* da região cacauzeira da Bahia com base em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.161-164, 2006.

SILVA, N. L. A. DA; MIRANDA, F. A. A; CONCEIÇÃO, G. M. DA. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**. 2010.

SILVA, R.L.F.; ALVES, A.Z.; VASCONCELOS, V.R.; NASCIMENTO, H.T.S.; MOREIRA-FILHO, M.A. Nutritive value of diets containing pods of faveira (*Parkia platycephala* Benth.) for confined finishing sheep. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.4, p.1065-1069, 2012.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 642-654, 2008.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & contexto - enfermagem**. v.15, n.1, p.115-121, 2006.

VASCONCELOS, J.; VIEIRA, J.G.P; VIEIRA, E.P.P. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v. 07, n.1, 2009.

VIANA, M. G.; ALBUQUERQUE, C.C.; MEDEIROS, E.V.; VIANA, F.A.; Kathia Maria Barbosa e SILVA, K.M.B.; Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monospartacus cannonballus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p.1387-1393, 2008.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production - A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8093–8105, 2005. Disponível: <<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf048053d>> Acesso em: 20 jan. 2014

**Capítulo II - Estudo fitoquímico e ensaio toxicológico em *Artemia salina* de
Leucaena leucocephala, *Parkia platycephala* e *Senna alata***

Estudo fitoquímico e ensaio toxicológico em *Artemia salina* de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*

Phytochemical studies and toxicological assay in *Artemia salina* of *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* and *Senna alata*

RESUMO

As verminoses gastritestinais geram grandes perdas à produção de pequenos ruminantes. A busca por formas de controle alternativo de helmintoses tem estimulado estudos que visam verificar a ação antiparasitária de plantas. O Estado do Tocantins caracteriza-se como uma área de transição Amazônia e Cerrado, possuindo uma grande diversidade de plantas detentoras de propriedades medicinais. Entretanto, faz-se necessário avaliar toxicidade destas para determinar segurança e eficácia. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil fitoquímico dos extratos das folhas de *Leucaena leucocephala* e *Parkia platycephala*, folhas e flores de *Senna alata*, plantas presentes no ecótono Amazônia e Cerrado, e verificar a toxicidade dos mesmos em *Artemia salina*. As plantas foram coletadas no município de Araguaína-TO. O material vegetal foi submetido à secagem, macerado e concentrado em rotaevaporador à temperatura de 45°C para obtenção do extrato bruto, a partir do qual, foi submetido ao particionamento por polaridade de solventes e, assim, obtidos as frações hexânicas, acetáticas, butanólicas e aquosas para análise fitoquímica e determinação das CL₅₀ através de ensaios de toxicidade *in vitro*. O estudo revelou a presença de taninos condensados, flavonoides e saponinas nas folhas de *L. leucocephala*; taninos hidrolisados e saponinas nas folhas de *P. platycephala*; fenóis, chalconas e auronas, flavonas, flavonóis e xantonas, e saponinas nas folhas de *S. alata*; e fenóis, chalconas e auronas, flavononóis, flavonas, flavonóis e xantonas nas flores de *S. alata*. Todos os extratos das plantas apresentaram baixa toxicidade sobre *A. salina*. Desta forma, pode-se concluir que as plantas podem ser eventualmente estudadas para avaliar potencial terapêutico no controle de verminoses gastrintestinais de ovinos, haja vista sua baixa toxicidade e à presença de taninos, saponinas e flavonoides, classes de metabólicas secundárias associadas à ação antiparasitária.

Palavras-chave: concentração letal 50%; ecótono Amazônia e Cerrado; metabólitos secundários;

ABSTRACT

The gastrointestinal worms generate large losses for the small ruminants breeding. The search for alternative ways to control helminthic infections has stimulated studies aimed to verify antiparasitic action of plants. The State of Tocantins is characterized as a transition area between Amazon and Brazilian savannah (Cerrado), having a great diversity of plants possessing medicinal

properties. However, it is required to assess toxicity of these plants to determine their safety and efficacy. Therefore, this study aimed to evaluate the phytochemical profile of both *Leucaena leucocephala* and *Parkia platycephalam* leaves and *Sena.alata* flowers found in the Amazon and Brazilian savannah (Cerrado) ecotone, that were collected in Araguaína –TO, to verify the same toxicity in *Artemia salina*. The plant material was subjected to drying mash and concentrated in a rotoevaporator at a temperature of 45°C to obtain crude extract. After this, the crude extract was subjected to solvent partitioning polarity to obtain hexanic, acetatic, butanolic and aqueous fractions for phytochemical analysis and CLs50 determination through toxicity testing *in vitro*. The study revealed the presence of condensed tannins, flavonoids and saponins in the leaves of *L. leucocephala*; hydrolyzed tannins and saponins in the leaves of *P. platycephala*, phenols, auronas and chalcones, flavones ,flavonols and xanthonas , and saponins in the leaves of *S. alata* , and phenols, chalcones and auronas, flavononois, flavones, flavonols and xanthonas in the flowers of *S. alata*. All plant extracts showed low toxicity on *A. saline*. Thus, this study suggests that some plants can eventually be studied to evaluate therapeutic potential in the control of gastrointestinal worms of small ruminantes, due to their low toxicity and the presence of tannins, saponins and flavonoids, classes of secondary metabolic associated with antiparasitic action.

Keywords: lethal concentration 50%; Amazon and Cerrado ecotone, secondary metabolites.

2.1 INTRODUÇÃO

As gastrenterites causadas por nematódeos representam os maiores prejuízos à criação de pequenos ruminantes, principalmente quando se refere a infecções subclínicas (RAMOS et al., 2004), que levam a prejuízos econômicos em grande escala.

A principal forma de controle das helmintoses dar-se através de produtos químicos, entretanto, o uso de forma indiscriminada e sem critérios epidemiológicos vem proporcionando o aparecimento de resistência. Assim, a fitoterapia tem recebido destaque visando desestimular o uso excessivo de anti-helmínticos convencionais no controle de parasitoses e dessa forma, minimizar o impacto dessas práticas errôneas (FURTADO, 2008; OLIVER et al., 2006;).

O Brasil é um país com um grande potencial em relação à biodiversidade nativa, abrigando inúmeras plantas detentoras de propriedades medicinais, sendo ainda desconhecidos os princípios ativos e possíveis efeitos terapêuticos da maior parte destas (MAIOLE-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007).

Plantas taníferas vêm sendo objetivo de estudo da fitoterapia por possuírem ação sobre o controle de nematoides gastrointestinais (MOLAN et al., 2003). *Leucaena leucocephala*, conhecida popularmente como leucena, e *Parkia platycephala*, conhecida por faveira ou fava-de-bolota, são plantas perenes, pertencentes à família Fabaceae, e que apresentam altos níveis de proteínas e taninos (ARAÚJO; ALBUQUERQUE; FILHO, 2006; D'MELLO; ACAMOVIC, 1989; SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010). Não há relatos do uso popular dessas plantas com fins medicinais, entretanto, faz-se necessário estudos sobre o possível potencial terapêutico no controle de verminoses de pequenos ruminantes.

Senna alata (L.) Roxb, conhecida popularmente como fedegão ou mata pasto, é uma planta perene da família Fabaceae (VIANA et al., 2008), arbustiva, com crescimento vegetativo extremamente rápido e tendência à formação de estandes puros (RODRIGUES et al., 2010). Popularmente, ela vem sendo utilizada na medicina popular como antimicrobiano, anticatarral, hipoglicemiante, diurético, analgésico (ORDOÑEZ et al., 2004) e como endoparasiticida na forma de infusão das flores (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009).

O Estado do Tocantins caracteriza-se como uma área de transição Amazônia e Cerrado, possuindo uma grande diversidade de ecossistemas. O clima predominante da região é tropical úmido, com duas estações bem definidas, seca e chuvosa, e temperatura variando de 26 a 32° C (TOCANTINS, 2012). *L. leucocephala*, *P. platycephala* e *S. alata*, são plantas nativas dessa região, entretanto, pouco se conhece sobre o real potencial tóxico e terapêutico destas.

O grande número de plantas utilizadas no tratamento de enfermidades sem comprovação científica e a busca por novas bases terapêuticas justificam o desenvolvimento de estudos com esse fim. Para tanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil fitoquímico dos extratos das folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, folhas e flores de *S. alata*, plantas presentes no ecótono Amazônia e Cerrado, e verificar a toxicidade dos mesmos em *Artemia salina*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

As folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, folhas e flores de *S. alata* foram coletadas no município de Araguaína/TO, entre dezembro de 2012 e janeiro de 2013. Uma exsicata foi depositada no Herbário-TO da Universidade Federal do Tocantins sob os seguintes registros *L. leucocephala* HTO 9339, *P. platycephala* HTO 9144 e *S. alata* HTO 9618.

2.2.2. Estudo Fitoquímico

2.2.2.1 Obtenção do extrato bruto (EB)

As folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, folhas e flores de *S. alata* foram pesadas e submetidas à pré-secagem em temperatura de 55 °C por 96 horas em estufa ventilada até obter o peso constante do material vegetal. As folhas de *P. platycephala*, folhas e flores de *S. alata* secas foram peneiradas, submetidas à pesagem e maceração em etanol 99,5 °GL por 120 horas, e as folhas de *L. leucocephala* em metanol PA por 48 horas e após esse período filtradas. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes. O filtrado foi submetido à secagem em evaporador rotativo (Fisatom® Mod. 801), sob pressão reduzida à temperatura de 45°C até a eliminação do solvente, formando o extrato bruto (EB). Em seguida, o EB foi pesado em balança analítica e teve o percentual de rendimento calculado.

2.2.2.2 Particionamento por polaridade de solventes para a obtenção do extrato hexânico (EH), acetático (EA), butanólico (EBu) e aquoso (EAq).

Os extratos brutos foram submetidos ao particionamento com solventes em gradiente crescente de polaridade (FALKEMBERG; SANTOS; SIMÕES, 2006; MATOS, 1997). O material foi pesado e ressuspenso em 40 mL de água destilada e particionado com hexano. Separada a fração hexânica, a fase aquosa foi submetida à partição com acetato de etila. Obtida a fração acetática, procedeu-se nova partição da fase aquosa restante com butanol saturado em água, resultando na fração butanólica e na fração aquosa. Cada partição era realizada com 40mL de solvente e o número de lavagens estão descritos no Quadro 1. Após o particionamento, as frações hexânica, acetática, butanólica e aquosa foram secas totalmente sob pressão reduzida em rotaevaporador, com temperatura controlada de 45° C, dando

origem aos extratos hexânico (EH), acetático (EA) e butanólico (EBu) e extrato aquoso (EAq). O fluxograma do particionamento está esquematizado na Figura 1.

Quadro 1-Número de extrações por solvente durante o particionamento dos extratos brutos.

	Hexano	Acetato de etila	Butanol PA
<i>L. leucocephala</i>	05	06	04
<i>S. alata (flores)</i>	04	03	03
<i>S. alata (folhas)</i>	03	03	02
<i>P. platycephala</i>	03	03	03

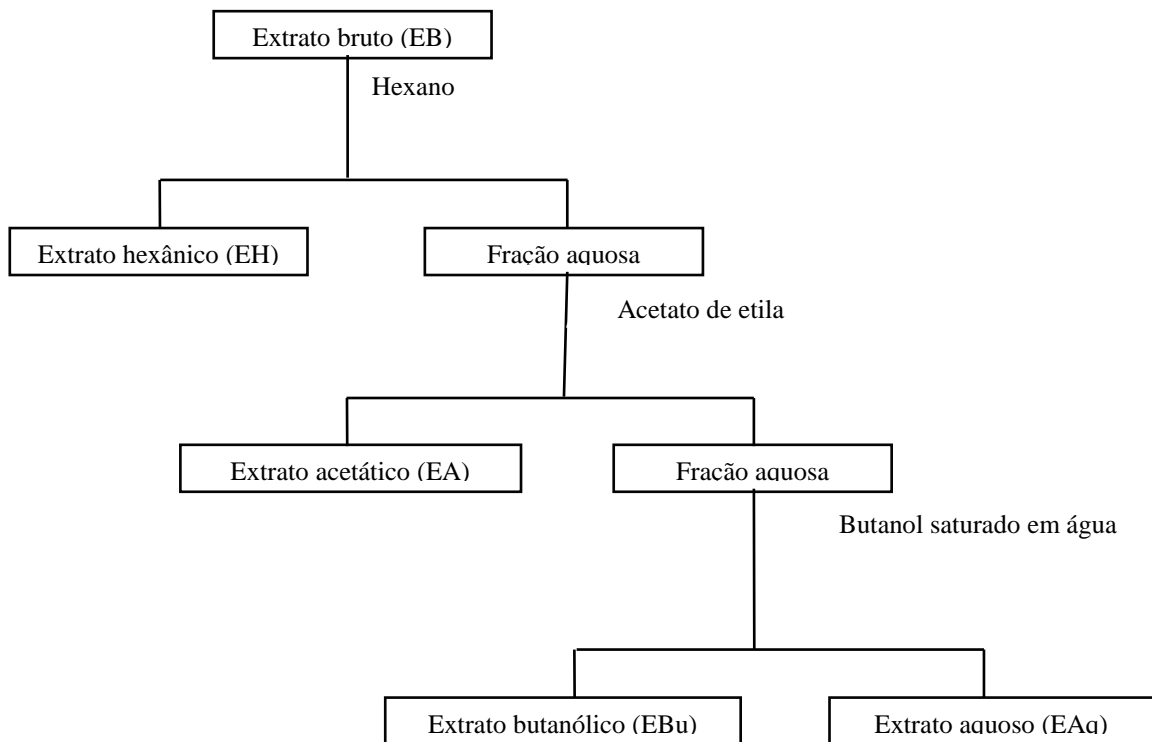


Figura 1- Fluxograma para obtenção do extrato hexânico (EH), acetático (EA), butanólico (EBu) e aquoso (EAq).

2.2.2.3 Prospecção fitoquímica

Todos os extratos foram submetidos à análise fitoquímica para verificar a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: fenóis, taninos, saponinas, flavonoides e alcaloides por meio de reações químicas que resultam no

desenvolvimento de coloração/precipitado característico para cada classe de substância de acordo com metodologia descrita por Matos (1997).

2.2.2.3.1 Teste para Taninos e Fenóis

Num tubo de ensaio contendo 4 mL de solução hidroalcoólica de extrato foram adicionados três gotas de solução de cloreto férrico a 10%. Um teste em branco também foi preparado com água destilada e cloreto férrico para comparações. A presença de fenóis ou taninos foi determinada de acordo com o aparecimento da coloração caracterizada para cada substância ou a formação de precipitado escuro. Coloração variável entre o azul e o vermelho indicou a presença de fenóis. Precipitado escuro com tonalidade azul, presença de taninos hidrolisáveis, e coloração verde, taninos condensados.

2.2.2.3.2 Teste para Saponinas

Para esse teste, 2 mL de solução de extrato foi ressuspenso com 2 mL de clorofórmio e diluído com 4 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi filtrada para um tubo de ensaio e agitada por 3 minutos. A presença de espuma persistente a abundante indicou a presença de saponinas.

2.2.2.3.3 Teste de Cianidina ou Shinoda

Em um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução de extrato foi adicionado 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado e 0,5 cm de magnésio em fita. O surgimento ou intensificação de uma coloração laranja a vermelha na solução indicou presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas.

2.2.2.3.4 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Foram utilizados 3 tubos contendo 4mL de solução de extrato, o primeiro foi levado a pH 3, o segundo alcalinizado a pH 8,5 e o terceiro a pH 11. O aparecimento de cores diversas indicou a presença de constituintes de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2 - Tabela de cores observadas com a variação de pH do material.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido (pH3)	Alcalino (pH8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpura
Flavononóis	-	-	Vermelho laranja

Fonte: MATOS (1997).

2.2.2.3.5 Teste para Alcaloides

A pesquisa de alcaloides foi realizada nos EB, EH, EA, EBU, EAQ. Para cada extrato foram utilizados três tubos de ensaio, cada um contendo 4 mL do respectivos extratos. No tubo 1 foram adicionadas três gotas de reagente de Dragendorff (iodo-bismutato de potássio). No tubo 2 foram adicionadas três gotas de reagente de Hager (solução saturada de ácido pícrico), e no tubo 3 três gotas do reagente de Meyer. A formação de precipitado floculoso em pelo menos dois tubos é indicativo de alcaloides.

2.2.3. Toxicidade em *Artemia salina*

A avaliação da citotoxicidade frente à *Artemia salina* foi realizada segundo adaptação da metodologia descrita por (McLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998). Inicialmente foi preparado 1L de solução salina a 3%, com sal marinho sintético MarineMix®, para incubação dos ovos de *A. salina* Maramar® (0,1g), que foram expostos à luz artificial (lâmpada incandescente de 60W) durante 24 horas para que houvesse a eclosão.

Para realizar o bioensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina com frações do EB, EH, e EA diluídos em solução aquosa de Tween 80 a 3%, e o EBU e EAQ diluídos em água destilada em concentrações que variaram de 1, 10, 100, 1000 a 10.000µg/mL. Adicionalmente, eram determinadas novas concentrações a fim de se obter pontos representativos para o cálculo da CL50. Um grupo controle também foi preparado nas mesmas condições contendo apenas solução aquosa de Tween 80 a 3%. Os tubos foram mantidos sob luz artificial (lâmpada incandescente de 60W) por

um período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de náuplios mortos e determinado o percentual de mortalidade.

Os percentuais de mortalidade de cada concentração foram utilizados para os cálculos de regressão linear, a partir do qual foi possível determinar a CL50 de cada extrato, em nível de significância crítico de 95%. Os cálculos foram realizados no software GraphPad Prisma v 5.00 para Windows.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Estudo fitoquímico

Durante o processo de secagem, a redução do peso das folhas de *L. leucocephala*, *P. platycephala* e *S. alata* e flores de *S. alata* foram de 72,99%, 44,20%, 71,60% e 85,00%, respectivamente. Os rendimentos dos EBs a partir do material vegetal seco foram de 21,95%, 17,40%, 17,60% e 17,84% para as folhas de *L. leucocephala*, *P. platycephala* e *S. alata* e flores de *S. alata*, respectivamente. Os rendimentos dos extratos particionados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento dos extratos obtidos a partir dos extratos brutos.

Plantas	Rendimentos			
	EH (%)	EA (%)	EBu (%)	EAq (%)
<i>L. leucocephala</i>	12,61	22,36	42,96	22,07
<i>S. alata</i> (folhas)	31,84	16,98	17,35	33,83
<i>S. alata</i> (flores)	24,11	12,92	26,89	36,09
<i>P. platycephala</i>	19,08	34,18	22,01	24,73

O estudo fitoquímico das folhas de *L. leucocephala* revelou presença de fenóis no EH, EA e EAq, taninos condensados no EBU, flavonoides no EA (Figura 2) e saponinas no EBU e EAq (Quadro 3).

Os testes das folhas de *P. platycephala* revelou presença de taninos hidrolisados nos EA (Figura 3) e EBU; e foi positivo para saponinas nos EA, EBU e EAq (Quadro 3).

Os testes fitoquímicos com as folhas de *S. alata* foi positivo para chalconas e auronas no EH, flavonoides (Figura 4-C), chalconas, auronas e fenóis (Figura 4-D)

no EA. O EBU das folhas de *S. alata* foi positivo para fenóis (Figura 4-A), flavonoides (Figura 4-B) e no teste para flavonas, flavonóis e xantonas, e saponinas. Já as flores foram positivas para chalconas e auronas (Figura 5-A) e fenóis (Figura 5-B) no EA, flavonas, flavonóis e xantonas no EBU (Figura 5-C) e flavonóis no EH (Figura 5-D).

Quadro 3 - Prospecção dos constituintes químicos dos extratos bruto (EB), hexânico (EH), acético (EA), butanólico (EBU) e aquoso (EAQ).

Planta	Classe de compostos	EH	EA	EBU	EAQ
<i>L. leucocephala</i>	Taninos condensados	-	-	+	-
	Taninos hidrolisados	-	-	-	-
	Fenóis	+	+	-	+
	Alcaloides	-	-	-	-
	Flavonoides- Shinoda	-	+	-	-
	Saponinas	-	-	+	+
<i>S. alata</i> (folhas)	Taninos condensados	-	-	-	-
	Taninos hidrolisados	-	-	-	-
	Fenóis	-	+	+	-
	Alcaloides	-	-	-	-
	Flavonoides- Shinoda	-	+	+	-
	chalconas e auronas	+	+	-	-
	flavonas, flavonóis, xantonas	-	-	+	-
	Saponinas	-	-	+	-
<i>S. alata</i> (flores)	Taninos condensados	-	-	-	-
	Taninos hidrolisados	-	-	-	-
	Fenóis	-	+	-	-
	Alcaloides	-	-	-	-
	Flavonoides- Shinoda	-	-	-	-
	Chalconas e auronas	-	+	-	-
	flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	+	-
	Flavononóis	+	-	-	-
	Saponinas	-	-	-	-
<i>P. platycephala</i>	Taninos condensados	-	-	-	-
	Taninos hidrolisados	-	+	+	-
	Fenóis	-	-	-	-
	Alcaloides	-	-	-	-
	Flavonoides- Shinoda	-	-	-	-
	Saponinas	-	+	+	+

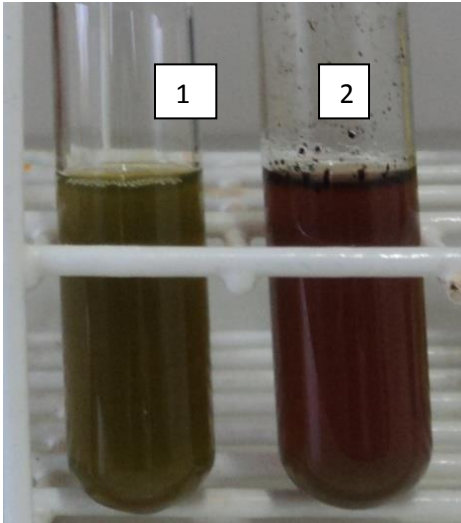


Figura 2 - *L. leucocephala*. Tubo 1 contendo EA e tubo 2 contendo EA reagindo com HCl + Mg (positivo para flavonoide).

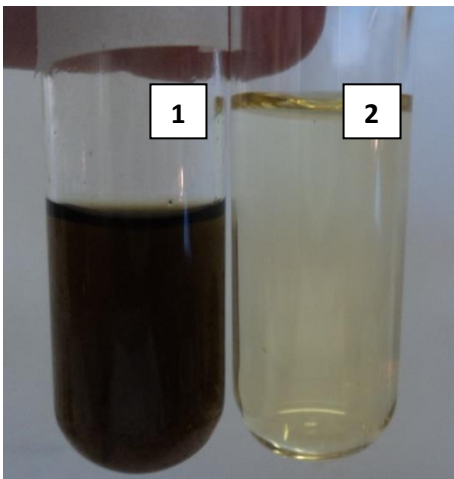


Figura 3 - Teste qualitativo para taninos e fenóis. Tubo 1 observa-se reação positiva para taninos hidrolizados no EA de *P. platycephala*, tubo 2 contendo água destilada e FeCl_3 .

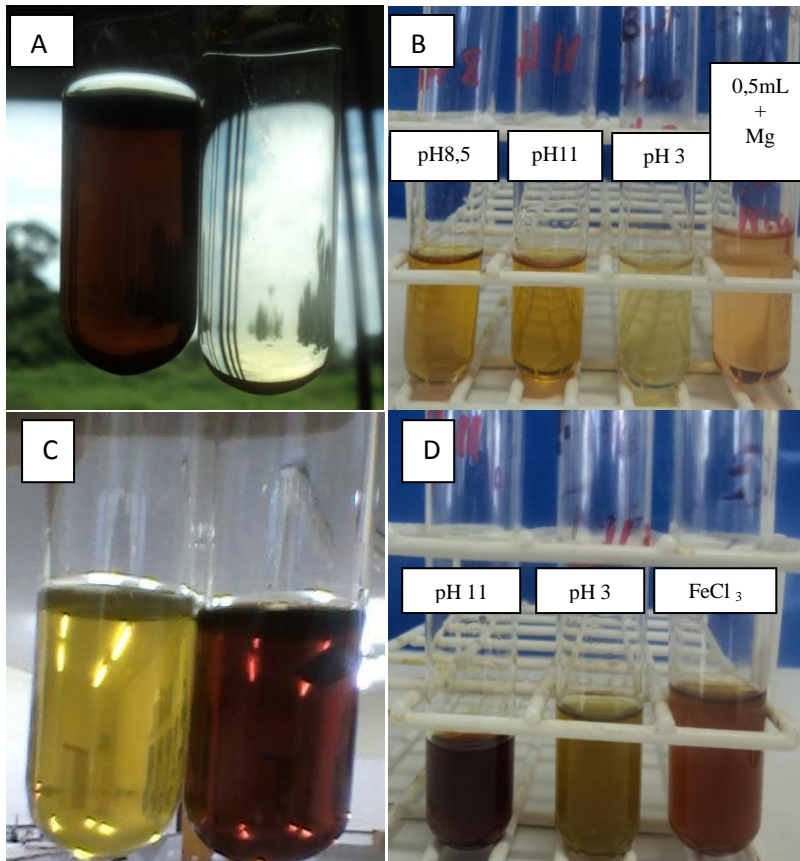


Figura 4 - EBU das folhas de *S. alata* foi positivo para fenóis (A) e flavonoides (B). EA- *S. alata* (folha) positivo flavonoides (C) e chalconas e auronas e fenóis (D).

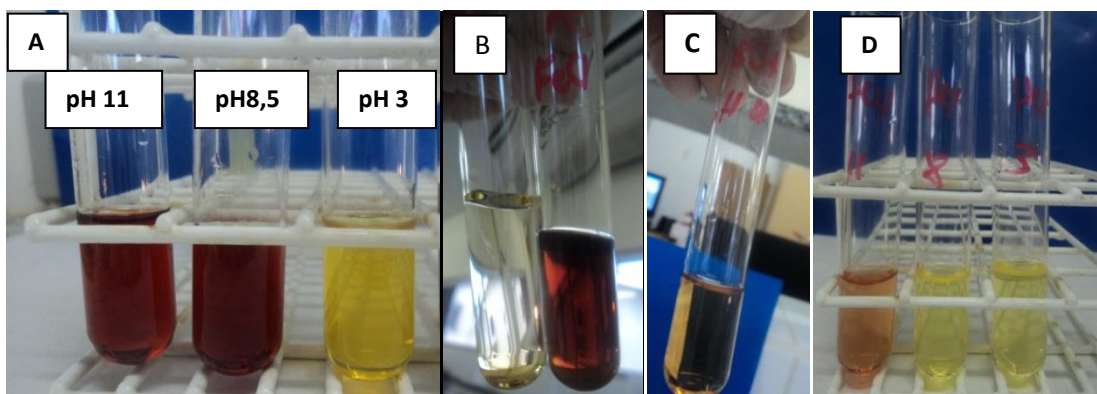


Figura 5- Teste positivo para chalconas e auronas (A) e positivo para fenóis (B) no EA das flores de *S. alata*; Teste qualitativo para flavonas, flavonóis e xantonas foi positivo no EBU (C); EH positivo para flavononóis (D).

2.3.2 Avaliação da toxicidade em *Artemia Salina*

A partir do percentual de náuplios mortos foram calculadas as CL₅₀, por regressão linear, dos extratos brutos e particionados das plantas, que estão

ilustradas na Tabela 2 e Figura 6. A CL50 dos EB, EH, EAc e EBU das folhas de *L. leucocephala* foram de 356,68; 630,56; 726,07 e 2766,27 µg/mL, respectivamente. Para as folhas de *P. platycephala* a CL50 para o EB foi de 1032,98 µg/mL, EAc de 2986,03 µg/mL, EBU de 1825,71 µg/mL e EAq de 2504,89 µg/mL.

Os EB, EH, EAc e EBU das folhas de *S. alata* tiveram CL50 de 409,45; 327,17; 248,93 e 2555,50 µg/mL, respectivamente. Já a concentração letal de 50% dos EB, EH, EAc e EBU das flores da mesma planta foram de 1025, 5; 662,98; 1001,14 e 3947,41µg/mL, respectivamente.

Os extratos aquosos de *L. leucocephala* e *S. alata*, e hexânico da *P. platycephala* não promoveu morte dos náuplios até a concentração de 10.000µg/mL, não sendo possível realizar o cálculo.

Tabela 2 - Concentrações letais de 50% (CL₅₀) dos extratos testados de *L. leucocephala*, *Senna alata* e *Parkia platycephala*.

Planta	Extrato	CL ₅₀ (µg/mL)	Equação da reta	R ²
<i>L. leucocephala</i>	E. bruto	356,68	Y= 0,9193x - 277,9	0,90
	E. hexânico	630,56	Y= 0,7200 x - 404,0	0,93
	E. acetático	726,07	Y= 0,2800x - 153,3	0,92
	E. butanólico	2766,27	Y= 0,0252x - 19,71	0,84
	E. aquoso	*	*	*
<i>S. alata (folhas)</i>	E. bruto	409,45	Y=0,2074x - 34,92	0,85
	E. hexânico	327,17	Y= 0,2440x -29,83	0,80
	E. acetático	248,93	Y= 0,3783x - 44,17	0,84
	E. butanólico	2555,50	Y= 0,03685x - 44,17	0,85
	E. aquoso	*	*	*
<i>S. alata (flores)</i>	E. bruto	1025,50	Y=0,05408x - 5,459	0,85
	E. hexânico	662,98	Y= 0,1267 x - 34,00	0,82
	E. acetático	1001,14	Y= 0,07900 x - 29,09	0,89
	E. butanólico	3947,41	Y = 0,02567 x - 51,33	0,86
	E. aquoso	*	*	*
<i>P. platycephala</i>	E. bruto	1032,98	Y= 0,05136x - 3,054	0,91
	E. hexânico	*	*	*
	E. acetático	2986,03	Y= 0,04867 x - 95,33	0,75
	E. butanólico	1825, 71	Y= 0,04877 x - 39,04	0,86
	E. aquoso	2504,89	Y= 0,04702 x - 67,78	0,92

* CL50% não estabelecida até concentração 10.000µg/mL.

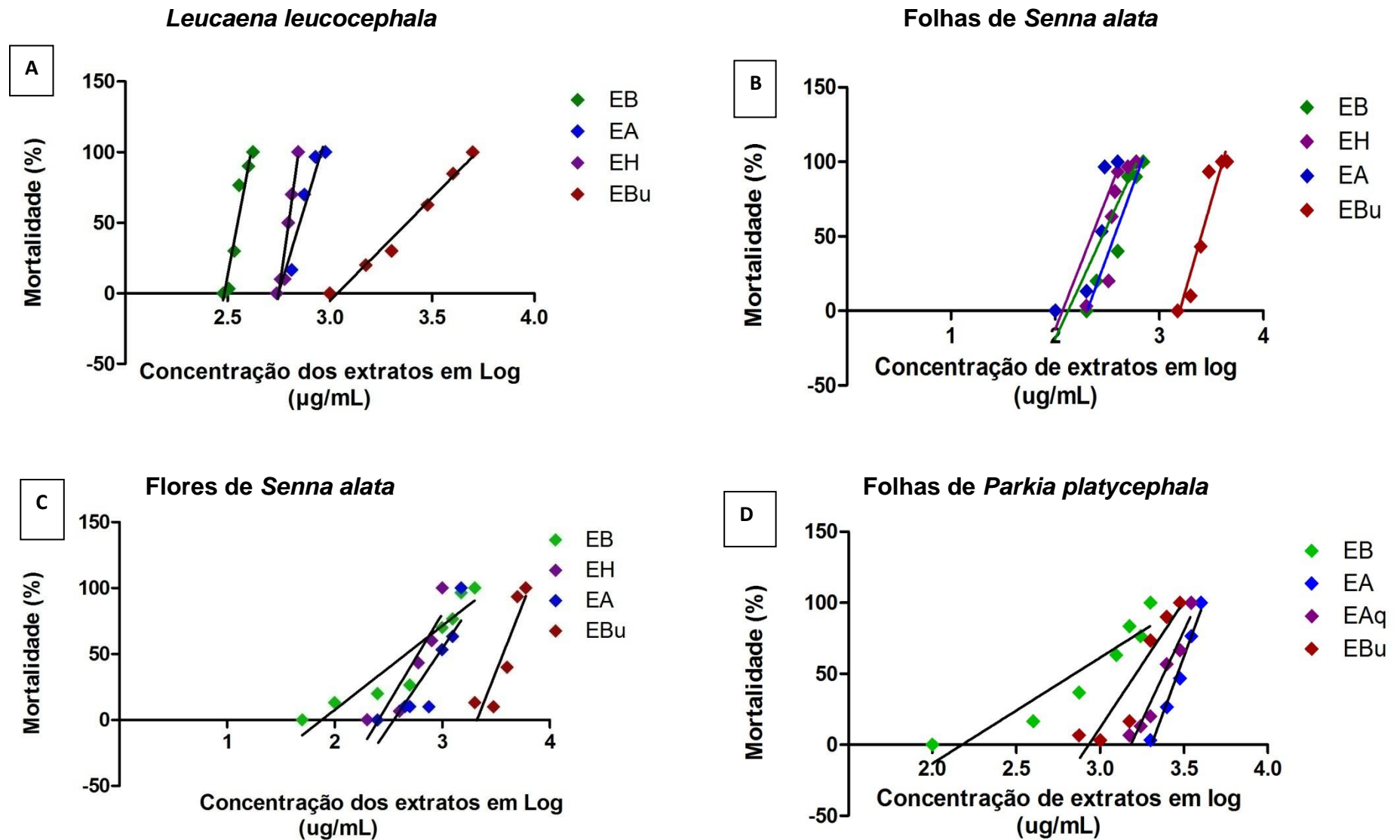


Figura 6 - Taxa de mortalidade de *Artemia salina* 24 horas após à exposição a várias concentrações de extrato bruto (EB), hexânico (EH), acético (EA), butanólico (EBu) e aquoso (EAq) das folhas de *L. leucocephala* (A), folhas de *S. alata* (B), flores de *S. alata* (C), e folhas de *P. platycephala* (D). As concentrações estão apresentadas em log.

2.4 DISCUSSÃO

A avaliação do potencial terapêutico de plantas e de alguns de seus constituintes tem sido objeto de estudos, pois além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, as plantas têm contribuído para a obtenção de vários fármacos, tais como os glicosídeos cardiotônicos (FOGLIO et al., 2006), morfina, a emetina, e a rutina. Assim, muitas substâncias têm grandes possibilidades de serem aproveitadas como agentes medicinais.

Os testes de prospecção preliminar permitem fazer uma abordagem do comportamento químico das plantas, além de fornecer informações relevantes para se chegar ao princípio tóxico e farmacológico (HEINRICH et al., 2004).

Nos estudos fitoquímicos realizados com a *L. leucocephala*, a presença de fenóis totais, taninos condensados, flavonoides e saponinas foram observados resultados que corroboram com descritos por D'Mello e Acamovic (1989). Possivelmente, o teste positivo para fenóis totais deve-se à presença dos taninos, saponinas e flavonoides, visto que os compostos fenólicos são substâncias amplamente encontradas em plantas e inclui uma variedade de classes de metabólitos tais como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas (CARVALHO; GOSMANN; SHENKEL, 2007; TSAO, 2010).

Nos ensaios com *P. platycephala* foi possível revelar a presença de taninos hidrolisados e saponinas. Bezerra e Chaves (2010) verificaram que os taninos hidrolisados presentes nessa espécie são derivados do ácido gálico. Esse é empregado como antioxidante de alimentos e vem sendo estudado como possível agente antimicrobiano e no tratamento de câncer (OW; STUPANS, 2003). A constatação de saponinas corrobora com investigações prévias realizadas com folhas da planta (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

Os testes realizados com as folhas de *S. alata* foram positivos para fenóis, flavonoides do tipo chalconas e auronas, flavonas, flavonóis e xantonas, e para saponinas. A presença de flavonoides é relatada em todas as partes da planta (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009). As flores de *S. alata* também foram positivas para fenóis, chalconas e auronas, flavonóis, flavonas, flavonóis e xantonas. Espécies do gênero *Senna* são ricas em flavonoides, antraquinonas, polissacarídeos (HENNEBELLE et al., 2009), cumarinas e ácidos graxos (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009).

Silva, Miranda e Conceição (2010) observaram a presença de alcaloides e flavonoides nas folhas de *P. platycephala*. Pérez, Jiménez e Pulpeiro (2005) relataram alcaloides e taninos nas folhas de *S. alata*, estes resultados não foram encontrados no presente estudo. A presença e a concentração de um metabólito na planta podem ser influenciadas por fatores ambientais, tais como: o estágio de desenvolvimento, sazonalidade, temperatura, altitude e outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Assim, possivelmente as variações de metabólitos observados nas plantas locais ocorreram em decorrência desses fatores.

Os ensaios de toxicidade com a *A. salina* vem sendo utilizados de forma complementar aos estudos fitoquímicos, por ser um teste simples de triagem de extratos, a fim de prever sua toxicidade geral (COSTA et al., 2009).

O EB das folhas de *L. leucocephala* apresentou a CL_{50} mais baixa dos nossos estudos, de 356,68 $\mu\text{g/mL}$. Possivelmente, a interação de fenóis e flavonoides nos EH e EA e de taninos condensados e saponinas no EBU promoveram toxicidade observada sobre os náuplios (MACIEL; PINTO; VEIGA JR, 2002). Os ensaios com EH (630,56 $\mu\text{g/mL}$) e EA (726,07 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram CL_{50} com moderada toxicidade, já o EBU, apresentou toxicidade relativamente baixa (2766,27 $\mu\text{g/mL}$) quando comparada com as outras frações da planta, provavelmente devido à ação antagônica entre taninos condensados e saponinas identificados nesta fração. Sabe-se que estes compostos estão envolvidos com o sistema de defesa da planta contra parasitas, e que o primeiro possui atividade antiparasitária comprovada contra nematoides de pequenos ruminantes, pois reduz significativamente a carga parasitária desses animais (NOVOBILSK; MUELLER-HARVEYC; THAMSBORG, 2011; MINHO et al., 2008). Cunha, Oliveira e Campos (2003), verificaram que *L. leucocephala* possui atividade antiparasitária sobre o fitonematóide *Panagrellus redivivus*, no qual promoveu mortalidade de 93% dos parasitas. Assim, a planta apresenta potencial antiparasitário em ovinos.

No presente estudo, todos os extratos das folhas de *P. platycephala* apresentaram CL_{50} relativamente alta, acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$, efeito atribuído à presença de taninos hidrolisados e saponinas. As saponinas são metabólitos envolvidos no sistema de defesa da planta contra parasitas, podendo agir através da formação de um complexo com os esteroides do parasita, tornando-os indisponíveis (WINA; MUETZEL; BECKER, 2005) e dessa forma interferir no ciclo biológico do

mesmo. O mecanismo tóxico para fitoparasitas fornece indícios da possível forma de atuação dos metabólitos presentes na planta.

Os EB, EH, EA e EBU das folhas de *S. alata* apresentam CL₅₀ de 409,45; 327,17; 248,93 e 2555,5 µg/mL, respectivamente. O EH e EA foram os mais tóxicos dos extratos da folha planta, possivelmente pela concentração das chalconas e auronas detectadas nos testes fitoquímicos. Já o EBU apresentou uma baixa toxicidade mais baixa das frações sobre os náuplios. A toxicidade observada no EB deve-se à ação sinérgica de todos os metabólitos presentes na planta.

Os extratos das flores da *S. alata* também são caracterizados pela presença de diferentes tipos de flavonoides, o EH (662,98 µg/mL) que apresentou maior toxicidade nas frações das flores, teve seu efeito devido aos flavonóides indetificados na fração. O EA (1001,14 µg/mL) e o EBU (3947,41 µg/mL), apesar de apresentar CL₅₀ maiores, também teve seu efeito por meio da atividade de flavonoides. O resultado do EB foi promovido, possivelmente, pela presença dessas várias classes de flavonoides. No estudo, os flavonoides foram os principais metabólitos encontrados nesta espécie. O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades. Ensaio biológicos revelam que essa classe vêm apresentando atividade contra bactérias, fungos, vírus e endoparasitas (FLAMBÓ, 2013). Silva et al. (2010) verificaram que flavonoides presentes em *A. anthelmia* possuem atividade antiparasitária contra nematoides de camundongos.

A curva concentração-resposta possibilita obter o cálculo da CL₅₀, além de permitir a avaliação da resposta máxima que o fármaco é capaz de produzir. As curvas podem ser consideradas quando desejar realizar um estudo de comparação de toxicidade (BARROS; DAVINO, 2003). Assim, a partir da inclinação das retas observadas na Figura 6 podemos predizer que os compostos presentes nos extratos agiram com mecanismos distintos sobre a mortalidade dos náuplios.

O ensaio com *A. salina* é muito utilizado por apresentar boa correlação com várias atividades biológicas, dessa forma, extratos que mostram atividade devem ser mais explorados para o isolamento e verificação da sua real atividade (SYAHMI et al., 2010).

Parra et al. (2001) demonstraram que há uma boa correlação entre a CL₅₀ obtida pelo ensaio de letalidade em *A. salina* e a DL₅₀ do ensaio de toxicidade oral agudo em camundongos. Neste contexto, todos os extratos do presente estudo

equivaleriam a uma DL acima de 8.000 mg/mL, sendo considerados praticamente atóxico conforme a classificação da OECD (2006).

Dessa forma, podemos concluir que o perfil fitoquímico das plantas do presente estudo é caracterizado pela presença de taninos condensados, flavonoides e saponinas nas folhas de *L. leucocephala*; taninos hidrolisados e saponinas nas folhas de *P. platycephala*; fenóis totais, chalconas e auronas, flavonas, flavonóis e xantonas, e saponinas nas folhas de *S. alata*; e fenóis totais, chalconas e auronas, flavononóis, flavonas, flavonóis e xantonas nas flores de *S. alata*. O presente estudo revelou ainda que todos os extratos das plantas apresentaram baixa toxicidade. Assim, estas podem ser eventualmente estudadas para avaliar potencial terapêutico no controle de verminoses gastrintestinais de ovinos, haja vista sua baixa toxicidade e presença de taninos, saponinas e flavonoides, classes de metabólitos secundários associados à ação antiparasitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, G.G.L DE; ALBUQUERQUE, S.G.DE; FILHO, C.G. Opções no uso de forrageiras arbustivo-arbóreas na alimentação animal no semi-árido do nordeste. In: Simpósio Brasil. **Resumo**. 2006. Disponível em: <http://www.cpsatna.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB886.pdf> Acesso em: 29 jan. 2014.
- BEZERRA, R. D. S.; CHAVES, M. H. Estudo químico da *Parkia platycephala*. In: Seminário de Iniciação Científica / UFPI, 2010, Terezina. **Resumo**. Disponível: <<http://www.ufpi.br/19sic/Documentos/RESUMOS/Exatas/Rooservelt%20Delano%20de%20Sousa%20Bezerra.pdf>> Acesso: 19 dez. 2013.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª. ed. São Paulo: Editora Atheneu; São Paulo: Editora Atheneu São Paulo, 2003. p. 59-67.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENCKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 519-535.
- COSTA, E.S.S.; DOLABELA, M.F.; PÓVOA, M.M.; OLIVEIRA, D.J.; MÜLLER, A.M. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 834-838, 2009.

CUNHA, F.R.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V. P. Extratos vegetais com propriedades nematocidas e purificação do princípio ativo do extrato de *Leucaena leucocephala*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, 2003.

D'MELLO, J.P.F.; ACAMOVIC, T. *Leucaena leucocephala* in poultry nutrition- A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 28, p. 01-28, 1989.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I; SIMOES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. , 2007 p. 229-245.

FLAMBÓ, D.F.A.L.P. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana**, 2013, 43 p. Dissertação. Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2013.

FOGLIO, M.A; QUEIROGA, C.L; SOUSA, I.M.O; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP, 2006.

FURTADO, S.K. Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes de eclodibilidade *in vitro* e testes de eficácia *in vivo*. **Biblioteca da Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2008. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=ad&id=533938&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22FURTADO,%20S.%20K.%22&qFacets=autoria:%22FURTADO,%20S.%20K.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>> Acesso: 28 jan. 2014.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HENNEBELLE, T.; WENIGER, B.; JOSEPH, H.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F. *Senna alata*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 385-393, 2009.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**. Churchill Livingstone, Edinbrugh, 2004, p. 106-129.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, JR.V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25. n. 3, p.429-38, 2002.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V.S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, p. 263-275, 2007.

MATOS, F.J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, p. 141.

McLAUGHLIN, J.L.; ROGERS,L.L.; ANDERSON, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1998.

- MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S.M.; ABDALLA, A.L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 172-181, 2008.
- MOLAN, A.L., MEAGHER, L.P., SPENCER, P.A., SIVAKUMARAN., S. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*, **International Journal for Parasitology**, v.33, n.14, p.1691-8, 2003.
- NOVOBILSK´Y, A.; MUELLER-HARVEYC, I.; THAMSBORG, S.M. Condensed tannins act against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.182, p.213-220, 2011.
- OECD. **Guideline for testing of chemicals: Fish Embryo Toxicity (FET) Test**. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2006.
- OLIVER, E. A.; PRADO, H.A.S.; RODRÍGUEZ, F.I.P.; ESCANDÓN, M.C.C.; GONZÁLEZ, M. A. A. Atividade antihelmíntica in vitro de extractos de *Azadirachta indica*, *A. juss*, *Momordica charantia* e *Chenopodium (Teloxys) ambrosioides*. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v.7, n.11, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>> Acesso: 29 jan. 2014.
- ORDOÑEZ, M.G.; GOVÍN, S.; BLANCO, E.G.; ANGELES, M.; Atividade antimicrobiana de *Senna alata* L. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v.9, n.1, 2004.
- OW Y.Y., STUPANS I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, v. 4, p. 241-8, 2003. **Resumo**. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769668?dopt=Abstract>> Acesso: 19 dez. 2013.
- PARRA, A.L.; YEBRA, R.S., SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.
- RAMOS, C. I.; BELLATO V.; de SOUZA A.P.; de AVILA V. S.; COUTINHO G. C.; DALAGNOL C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no planalto catarinense. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1889-1895, 2004.
- RODRIGUES, I.M.C., SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.
- RODRIGUES, I.M.C; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A.; DEMUNER, A.J. Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 1, p. 1-12, 2010.

SILVA, N. L. A. DA; MIRANDA, F. A. A; CONCEIÇÃO, G. M. DA. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, 2010.

SYAHMI, A.R.M.; VIJAYARATHNA, S.; SASIDHARAN, S.; LATHA, L.Y.; KWAN, Y.P.; LAU, Y.L.; SHIN, L.N.; CHEN, Y. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elais guineenses* Jacq.; (Oil Palm Leaf) methanol extract. **Molecules**, v.15, p. 8111-8121, 2010.

TOCANTINS. Secretária do Planejamento e Meio Ambiente. Mapas e Atlas. **Regionalização Climática**, 2012. Disponível em Internet <http://www.seplan.to.gov.br/seplan/Publicacoes/MAPAS_2012/RegionalizacaoClimatica_TO_2012.pdf> Acesso em 29 jan. 2014

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p.1231-1246, 2010.

VIANA, M. G.; ALBUQUERQUE, C.C.; MEDEIROS, E.V.; VIANA, F.A.; Kathia Maria Barbosa e SILVA, K.M.B.; Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monosparacus cannonballus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p.1387-1393, 2008.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 8093-8105, 2005.

Capítulo III - Avaliação da atividade ovicida e larvicida de *Leucaena leucocephala*, *Senna alata* e *Parkia platycephala* sobre tricostrongilídeos

**Avaliação da atividade ovicida e larvicida de *Leucaena leucocephala*,
Senna alata e *Parkia platycephala* sobre tricostrongilídeos**

Evaluation of ovicidal and larvicidal activity of *Leucaena leucocephala*,
Senna alata and *Parkia platycephala* on trichostrongylids

RESUMO

As verminoses gastrintestinais geram grandes perdas à produção de ruminantes. A busca por formas de controle alternativo tem se intensificado, haja vista o surgimento de resistência aos anti-helmínticos convencionais. A fitoterapia é uma área que se destaca, pois além de estender a vida útil dos medicamentos, os fitoterápicos não causam poluição ambiental reduzindo o problema dos resíduos. O estudo teve por objetivo avaliar a ação nematicida dos extratos brutos de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*, plantas pertencentes ao ecótono Amazônia e Cerrado, sobre ovos e larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos naturalmente infectados. No teste de inibição de eclosão, a suspensão de ovos foi distribuída em microtubos com o EB diluídos em solução de Tween 80 a 3% nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL, em triplicata. Após aplicação dos extratos, as placas foram incubadas a 26 ± 1 °C por 48 horas, e após esse período realizado as leituras. Para atividade larvicida, as larvas recuperadas de coproculturas foram desembainhadas, incubadas e submetidas ao teste de sensibilidade com os extratos, nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL. A partir dos testes notou-se que os extratos brutos das folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, e folhas e flores de *S. alata* apresentaram efeito significativo sobre a inibição de desenvolvimento de ovos de tricostrongilídeos, *in vitro*. O estudo revelou ainda que as folhas de *P. platycephala* e *S. alata* possuem ação anti-helmíntica sobre larvas infectantes de nematoides gastrintestinais.

Palavras-chave: anti-helmíntico; fitoterapia; resistência parasitária.

ABSTRACT

Gastrointestinal worms generate large losses for ruminant production. The search for alternative forms of control of these parasites has intensified, given the emergence of resistance to conventional antihelmintics. Herbal medicine is one area that stands out as an alternative way for treatment of parasitic infections. Moreover, these medicines can extend the life of drugs, since they do not cause environmental pollution because they do not leave residues in the environment. So, this study aimed to evaluate the nematicidal action of extracts of *Leucaena leucocephala*, *Senna alata* and *Parkia platycephala*, plants belonging to the Amazon and brazilain savannah (Cerrado) ecotone, on eggs and infective larvae of Trichostrongylidae of naturally infected sheep. At the onset of inhibition test, the egg suspension was distributed in microtubes with EB diluted in a solution of 3% Tween 80 at

concentrations of 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 mg / ml in triplicate. After administration of the extract, the plates were incubated at 26 ± 1 ° C for 48 hours and thereafter held readings. For larvicidal activity, the larvae recovered from fecal cultures were removed, incubated and subjected to sensitivity tests with the extracts at concentrations of 1.0, 2.5, 5.0 and 7.5 mg/mL. The results of the tests showed that crude extracts of the leaves of *L. leucocephala* and *P. platycephala*, and leaves and flowers of *S. alata* inhibited significantly the development of Trichostrongylidae eggs *in vitro*. This study also showed that the leaves of *P. platycephala* and *S. alata* have anthelmintic action on infective larvae of gastrointestinal nematodes.

Keywords: anthelmintic; phytotherapy; parasite resistance.

3.1 INTRODUÇÃO

As afecções causadas por parasitas gastrintestinais são responsáveis por prejuízos econômicos na produção de pequenos ruminantes (HECK et al., 2005). O parasitismo pode levar a perda de peso, baixa produtividade, menor rendimento de carcaça e em infecções maciças leva à morte, especialmente jovens e fêmeas no periparto. Além disso, o alto custo com os tratamentos dos animais refletem diretamente no lucro do produtor (CARMUÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Dentre os helmintos gastrintestinais a família Trichostrongylidae possui o maior número de espécies que parasitam os ruminantes, onde se destaca os gêneros *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Haemonchus*, sendo os mais frequentes e patogênicos que acometem o gado (ALMEIDA et al., 2005).

O controle das helmintoses é realizado principalmente por produtos químicos utilizados amplamente na pecuária, entretanto, tais produtos vêm sendo administrados de forma indiscriminada e sem critérios epidemiológicos, proporcionando a seleção de linhagens de parasitas resistentes (SANGSTER, 2001; TAYLOR; HUNT; GOODYEAR, 2002). Outro fator importante é a falta de rotação de princípio ativo que favorece a seleção (MELO et al., 2004).

O surgimento de novos métodos de controle parasitário é necessário para a preservação da economia e a manutenção da saúde dos animais (MOLENTO, 2004). Associado a isso, o lançamento de novos compostos farmacológicos é extremamente restrito, visto que exige muito tempo e altos custos. Assim, a fitoterapia é uma área que vem se destacando, incentivando o uso de plantas medicinais no tratamento de doenças, pois além de estender a vida útil dos produtos, os fitoterápicos não causam poluição ambiental reduzindo o problema dos

resíduos (ALMEIDA et al., 2007; CEZAR; BATISTA; BIANCHIN, 2008; TOMAZZONI; NEGRELE; CENTA, 2006).

A quantidade de exemplares de plantas utilizados na medicina popular como uma alternativa no tratamento de enfermidade é extensa (CARMUÇA-VASCONCELOS et al., 2005), porém estudos científicos publicados sobre a sua aplicabilidade em animais de produção, ainda é restrita. O efeito antiparasitário das plantas pode estar associado aos metabólitos secundários, pois estes são responsáveis pela adaptação das plantas ao ambiente e pela defesa contra parasitas, microrganismos e herbívoros (BOURGAUD, 2001).

Segundo Ranganathan e Balajee (2000), a atividade da planta pode ser influenciada pela localização e pelos fatores ambientais, aos quais está submetida, além de variação genética, método de extração utilizado, pH e a temperatura. As concentrações do extrato podem também interferir na variação dos resultados (SOMCHIT et al., 2003).

Assim, o objetivo foi avaliar a ação nematicida dos extratos brutos de *Leucaena leucocephala*, *Parkia platycephala* e *Senna alata*, plantas pertencentes ao ecótono Amazônia e Cerrado, sobre ovos e larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos naturalmente infectados.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As análises dos materiais foram realizadas na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Tocantins (EMVZ- UFT).

A partir de ovinos naturalmente infectados (Figura 1), do rebanho da Universidade Federal do Tocantins – Departamento de ovinocultura- foram coletadas fezes diretamente do reto dos animais para determinar o grau de infecção. Em seguida, foi realizada a coprocultura para a determinação da prevalência dos gêneros de parasitos.



Figura 1 - Ovinos do Departamento de ovinocultura do campus de Araguaína, da Universidade Federal do Tocantins-UFT. Animais criados em sistema semiconfinado.

3.2.1 Obtenção dos extratos

As folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, folhas e flores de *S. alata* foram submetidas à pré-secagem a 55 °C por 96 horas em estufa ventilada, posteriormente, as folhas de *P. platycephala*, folhas e flores de *S. alata* foram submetidas à maceração em etanol 99,5 °GL por 120 horas, e as folhas de *L. leucocephala* em metanol PA por 48 horas e após esse período filtradas. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes. O filtrado foi submetido à secagem em evaporador rotativo (Fisatom® Mod. 801), sob pressão reduzida à temperatura de 45°C até a eliminação do solvente, formando o extrato bruto (EB).

3.2.2 Testes Parasitológicos

Foram coletadas fezes diretamente do reto de vinte e dois ovinos naturalmente infectados para realização da contagem de ovos por grama de fezes

(opg). Todas as amostras fecais foram processadas no laboratório de Parasitologia da EMVZ-UFT pela técnica de Mc Master modificada (GORDON; WHITLOCK, 1939); Foram utilizadas as fezes dos ovinos que apresentaram carga parasitária acima de 1000 opg. Após o opg, foram realizadas coproculturas para obter as larvas de estágio infectante (L3).

3.2.3 Coprocultura

As fezes, frescas ou refrigeradas, foram misturadas com o substrato vermiculita em volume suficiente para que a mistura apresentasse consistência porosa e úmida. A mistura foi transferida e acomodada em frascos de boca larga, com capacidade de 350 mL, preenchidos em dois terços do volume total, mantendo-se as bordas limpas. Com auxílio de um bastão de vidro (5 mm) foi aberto um espaço central circular de cerca de 2 a 3 cm para permitir adequada aeração do composto. Uma placa de Petri foi colocada como tampa em cada frasco e imediatamente incubada em temperatura ambiente durante oito dias.

Transcorrido o período de incubação, os copos foram preenchidos completamente com água aquecida a 42°C, foram tampados, invertidos e depositados sobre o balcão do laboratório em plano inclinado. Com os frascos em plano inclinado, as placas de Petri foram preenchidas com água aquecida e depois de quatro a seis horas, o seu conteúdo, completamente aspirado com auxílio de pipeta Pasteur. A seguir, todo o volume aspirado foi posto a sedimentar e as larvas presentes no sedimento recuperadas e armazenadas em tubos tipo Falcon com capacidade de 50 mL.

3.2.4 Atividade ovicida

A avaliação da atividade ovicida foi realizada por meio do teste de eclosão de ovos. Foram utilizadas fezes coletadas diretamente da ampola retal de ovinos diagnosticados com infecção natural com nematoides gastrintestinais. A recuperação dos ovos das fezes foi realizada segundo Hubert e Kerbeoeuf (1992), no qual 10g de fezes foram homogeneizadas com solução saturada de cloreto de sódio e filtradas em tamises de 1mm, 100, 55, 29 e 25 μ m. O conteúdo filtrado foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado,

homogeneizado com água destilada e centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos, o pellet formado foi submetido ao procedimento de lavagem com água destilada por 3 vezes.

Para o teste de eclosão, a suspensão de ovos foi distribuída em microtubos de polietileno (100 µL/tubo), e adicionado os EBs diluídos em solução de Tween 80 a 3% nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL. Foi utilizado como controle negativo a solução de Tween 80 a 3% e controle positivo, ivermectina 1%. Após aplicação dos extratos, as placas foram incubadas a 26 ± 1 °C por 48 horas. Foi acrescentado lugol para interromper a eclosão dos ovos. Todos os ovos e larvas (L1) foram contados de cada microtubo. Para cada concentração e controles foram realizadas 3 repetições para assegurar a validação dos resultados. O percentual de inibição da eclosão de ovos foi determinado através da relação: número de ovos / (número de ovos + número de L1).

3.2.5 Atividade larvicida

3.2.5.1 Cultivo *in vitro*

Após a recuperação das larvas infectantes da coprocultura, foi feita a limpeza e clarificação do material em água destilada. Essas larvas foram então examinadas para a classificação dos gêneros presentes na amostra. As larvas foram centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos, lavadas por três vezes em água destilada e desembainhadas em solução de hipoclorito de sódio 0,0007%.

As larvas desembainhadas, após 10-15 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio, foram submetidas a uma nova centrifugação para a remoção de larvas mortas e restos de bainha, seguida de nova lavagem em água destilada. Foram realizadas três lavagens e após a última, as larvas foram concentradas e transferidas para o meio de cultura RPMI 1640 acrescida 10.000 UI/mL de penicilina e 10.000 mg/mL de estreptomicina (SIGMA)®.

3.2.5.2 Teste de sensibilidade

Após 24 horas de incubação a 36 °C, os tubos foram examinados para confirmar a sobrevivência das larvas ao meio de cultura e verificar eventual

contaminação bacteriana. Uma vez consideradas viáveis, os tratamentos delineados foram realizados.

Os EBs das folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, e folhas e flores de *S. alata* foram diluídos em solução aquosa de Tween 80 a 1%. As concentrações testadas sobre os parasitas foram de 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL. Para cada tratamento foram realizadas em triplicata. No grupo controle positivo foi utilizado ivermectina 1% e controle negativo solução de Tween 80 a 1%.

As leituras eram realizadas a cada 24 horas por 4 dias, começando a partir do D0, onde avaliavam-se o percentual de larvas vivas e mortas, em média 100 larvas/100µL de cada tratamento e controles, sob microscópio óptico com aumento de 40 vezes. Foi utilizado o critério de motilidade para avaliar a mortalidade das larvas, onde as aquelas com movimentação foram consideradas viáveis, enquanto as larvas sem movimento, que normalmente apresentavam-se esticadas ou curvadas, consideradas imóveis ou mortas. (PAIVA et al., 2001).

3.3 RESULTADOS

A média geral de opg obtido a partir dos testes quantitativos foi de 3250. A partir da coprocultura, determinou-se a prevalência dos gêneros dos helmintos gastrintestinais de ovinos, dos quais 63,3% eram pertencentes ao gênero *Haemonchus*, 31,8% de *Trichostrongylus*, e 4,5% de *Cooperia* (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias de ovos por grama de fezes (opg) e prevalência de gêneros de Tricostrongilídeos em amostras fecais de ovinos naturalmente infectados.

	OPG	Coprocultura		
		<i>Trichostrongylus</i>	<i>Haemonchus</i>	<i>Cooperia</i>
Ovinos selecionados	3250	31,8%	63,3%	4,5%

A tabela 2 mostra a eficácia média dos extratos brutos *L. leucocephala* e *P. platycephala* e das flores e folhas de *S. alata* e das folhas de sobre ovos de tricostrongilídeos de ovinos. Houve diferenças significativas ($P < 0,05$) nas concentrações a partir de 0,5 mg/mL de todos os extratos. Os extratos de *P. platycephala* e da folha de *S. alata* apresentaram os maiores percentuais de inibição de eclosão, de 99,0 e 99,3%, respectivamente.

Tabela 2- Percentual médio de eclosão de ovos de Tricostrongilídeos submetido a diferentes concentrações de extrato bruto de plantas.

Plantas	Concentração (mg/mL)					
	Tween (3%)	0,05	0,1	0,5	1,0	1,5
<i>L. leucocephala</i>	100±0,0 a	-	99,7±10,9 a	9,5±15 b	8,0±3,02 b	6,1±3,5 b
<i>P. platycephala</i>	100±0,0 a	-	99,8±2,3 a	15,5±12,0 b	1,9±0,04 b	1,0±0,0 b
<i>S. alata- folha</i>	100±0,0 a	-	99,6±0,2 a	6,6±3,9 b	4,7±2,33 b	0,7±0,3 b
<i>S. alata- flor</i>	97,6 ± 0,7 a	93,9 ± 2,4 ab	89,4±7,9 b	47,1±8,0 c	14,4±4,4 d	-

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa por ANOVA, seguido por teste de Tukey para comparação de médias com $P < 0,05$. (-) Concentrações não avaliadas.

Os EBs das folhas de *L. leucocephala* e flores de *Senna alata* não promoveram redução significativa das larvas infectantes de tricostrongilídeos nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL (Tabela 3 e Tabela 6).

O EB das folhas de *P. platycephala* apresentou redução estatisticamente significativa das larvas nas concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL com 72 horas (Tabela 4). O EB das folhas de *S. alata* também apresentou efeito significativo sobre o percentual de mortalidade das larvas nas concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL, a partir das 48 horas.

Tabela 3 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto das folhas *Leucaena leucocephala*.

Concentrações	Período de avaliação			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Tween80 a 1%	96,00±2,0	96,00±2,0	96,00±2,0	96,00±2,0
1 mg/mL	96,00±2,0	80,65±5,26	92,26±2,97	97,38±0,29
2,5mg/mL	96,00±2,0	84,65±5,56	91,26±3,80	94,64±2,24
5,0mg/mL	96,00±2,0	87,44±4,17	88,75±2,75	92,00±4,07
7,5mg/mL	96,00±2,0	83,96±3,27	75,47±8,4	87,4±1,78

$P < 0,05$. ANOVA.

Tabela 4 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto das folhas *Parkia platycephala*.

Concentrações	Período de avaliação			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Tween80 a 1%	96,00±2,0	96,00±2,0	96,00±2,0	96,00±2,00a
1 mg/ML	96,00±2,0	95,49±2,57	88,46±2,38	96,21±1,04
2,5mg/mL	96,00±2,0	97,92±2,08	92,32±3,80	76,32±0,80*
5,0mg/mL	96,00±2,0	86,15±1,15	90,12±2,35	46,81±6,75*
7,5mg/mL	96,00±2,0	90,91±1,46	82,20±1,34	45,02±4,20*

O (*) determina se o tratamento teve efeito significativo ($P < 0,05$). A análise estatística foi realizada pela ANOVA, seguido por Teste Tukey.

Tabela 5 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto das folhas de *Senna alata*.

Concentrações	Período de avaliação			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Tween80 a 1%	97,33±2,66	97,33±2,66	95,33±2,60	95,33±2,00
1 mg/mL	97,33±2,66	91,97±2,75	91,97±2,75	82,16±8,82
2,5mg/mL	97,33±2,66	95,65±4,35	50,29±8,61*	50,42±3,25*
5,0mg/mL	97,33±2,66	93,64±0,77	74,20±4,20*	52,74±5,70*
7,5mg/mL	97,33±2,66	97,98±2,08	70,60±1,63*	52,06±5,63*

O (*) determina se o tratamento teve efeito significativo ($P < 0,05$). A análise estatística foi realizada pela ANOVA, seguido por Teste Tukey.

Tabela 6 - Médias (em porcentagem) e respectivos erros-padrão de sobrevivência de larvas infectantes expostas a diferentes concentrações de extrato bruto de flores de *Senna alata*.

Concentrações	Período de avaliação			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Tween80 a 1%	100±0,0	97,00±2,00	97,00±2,00	97,00±2,00
1 mg/mL	100±0,0	90,57±1,08	92,36±2,10	95,92±2,28
2,5mg/mL	100±0,0	89,57±2,36	96,90±1,23	89,21±5,02
5,0mg/mL	100±0,0	82,86±0,77	92,64±3,70	93,35±1,82
7,5mg/mL	100±0,0	82,34±4,74	88,19±4,93	75,81±3,10

$P < 0,05$. ANOVA.

3.4 DISCUSSÃO

A contagem de opg permite avaliar os níveis de infecção dos animais no momento da coleta. A média observada no presente experimento indicou uma infecção alta por parasitas gastrintestinais, visto que o tratamento seletivo é recomendado para animais que apresentam carga parasitária acima de 300 opg (ANTONELLO et al., 2010) A alta carga parasitária implica prejuízos econômicos aos produtores, tanto pela mortalidade de animais e redução dos índices de produção de leite, carne e lã, quanto pelo custo com os tratamentos (CARMUÇA-VASCONCELOS, et al., 2005).

Os gêneros identificados no presente estudo são relatados como os parasitas frequentemente encontrados nas diversas regiões do Brasil, tendo o *Haemonchus contortus* como principal espécie promotora das maiores perdas na produção (AMARANTE, 2011).

Para um tratamento anti-helmíntico ser eficiente é necessário que ele promova alterações no desenvolvimento normal dos ovos, impedindo a eclosão e liberação das larvas que se tornarão infectantes. A ação pode-se-dar através da inibição da fase de blastomeração (KRYCHAK-FURTADO et al., 2005), assim, não ocorrerá divisão celular e formação da larva.

O presente estudo demonstrou que as plantas foram eficazes na inibição da eclosão dos ovos de tricostrongilídeos, podendo atribuir essa atividade aos metabólitos secundários da planta. Estudos prévios revelaram a presença de flavonoides, taninos condensados e saponinas nas folhas de *L. leucocephala*, e taninos hidrolisados e saponinas nas folhas de *P. platycephala*. Já nas folhas de *S. alata* foram identificados flavonoides e saponinas e nas flores verificou-se flavonoides (dados não publicados).

As plantas possuem uma variedade de compostos, que quando testados podem apresentar ação sinérgica entre os diferentes princípios ativos, devido à presença de substâncias de classes e estruturas diferentes ou ainda agindo de forma isolada (MACIEL; PINTO; VEIGA JR, 2002).

Plantas taníferas são empregadas popularmente no controle de verminoses, tendo sua ação comprovada sobre helmitoses em ovinos (COSTA et al., 2008). Taninos são metabólitos secundários que tem a capacidade de formar complexos com polissacarídeos e proteínas de parasitas, tornando-os indisponíveis (OKUDA,

2005). Assim, a atividade ovicida observada nos extratos de *L. leucocephala* e *P. platycephala* pode ser atribuídas à ação dos taninos.

Os taninos podem se ligar às glicoproteínas presentes na cutícula do parasita e, assim, causar à morte (ATHNASIADOU; KYRIAZAKIS; JACKSON, 2001). Geralmente, essa ação anti-helmíntica é atribuída aos taninos condensados da planta. Entretanto, o efeito larvicida observada nas concentrações 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL do EB das folhas de *P. platycephala*, possivelmente, deve-se à presença de taninos hidrolisados encontrados na planta. Nossos resultados corroboram com Mulla et al. (2010) e Costa et al. (2002), que correlacionam ação nematicida de *Adocacia indica* e *Mangifera indica*, respectivamente, a este metabólito.

Flavonoides são polifenóis presentes nas plantas e podem apresentar propriedades sobre mecanismos biológicos. Estudos relatam ação antimicrobiana, antifúngica, antiviral e anti-helmíntica desses metabólitos (FLAMBÓ, 2013; SILVA et al., 2010). Dessa forma, possivelmente a inibição do desenvolvimento dos blastômeros e a não eclosão dos ovos verificados com os extratos das folhas e flores de *S. alata* podem ser atribuídas a esses compostos.

Já a ação larvicida do EB das folhas de *S. alata* pode ser conferida pela ação sinérgica entre as saponinas e os flavonoides presente no extrato da folha da planta.

Diante do exposto, podemos afirmar que os extratos brutos das folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, e folhas e flores de *S. alata* apresentaram efeito de inibição de desenvolvimento de ovos de tricostrongilídeos, em testes *in vitro*. O estudo revelou ainda que as folhas de *P. platycephala* e *S. alata* possuem ação anti-helmíntica sobre larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de ovinos.

Propõe-se que trabalhos posteriores com folhas de *P. platycephala* e *S. alata* sejam realizados para melhor elucidar seu efeito com vistas à utilização terapêutica de seus compostos.

4 CONCLUSÃO

- As folhas de *L. leucocephala* possuem taninos condensados, flavonoides e saponinas; nas folhas de *P. platycephala* foram encontrados taninos hidrolisados e saponinas; nas folhas de *S. alata*, fenóis, chalconas e auronas, flavonas, flavonóis e xantonas, e saponinas, e nas flores, fenóis, chalconas e auronas, flavononois, flavonas, flavonóis e xantonas.
- O presente estudo revelou que todos os extratos das plantas apresentaram baixa toxicidade sobre *A. salina*.
- As folhas de *L. leucocephala* e *P. platycephala*, e folhas e flores de *S. alata* apresentaram atividade ovicida sobre tricostrongilídeos, *in vitro*.
- Os extratos brutos das folhas *L. leucocephala* e flores de *S. alata* não promoveram a mortalidade larvar nas concentrações testadas, porém os extratos das folhas de *P. platycephala* e *S. alata* apresentaram ação larvicida sobre L3 de tricostrongilídeos nas concentrações 2,5; 5,0 e 7,5mg/mL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, LR.; CASTRO. A.A.; SILVA. J.F.; FONSECA, A.H. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes, na estação seca da Baixada Fluminense. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.14, p. 89-94, 2005.

ALMEIDA, M.A.O. de; DOMINGUES, L.F.; ALMEIDA, G.N.; SIMAS, N.M. dos S.; BOTURA, M.B.; CRUZ, A.C.F.G. da; SILVA, A.V.A.F.; MENEZES, T.P.; BATATINHA, M. J. M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Mentha piperita* L. *Chenopodium ambrosioides* L. Sobre cultivo de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.57-59, 2007.

AMARANTE, A. F.T. Why is it important to correctly identify haemonchus species? *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, 2011.

ANTONELLO, A.M.; CEZAR, A.S.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F. Contagens de ovos por grama de fezes para o controle anti-helmíntico em bovinos de leite de diferentes faixas etárias. **Ciência Rural**, v.40, n.5, 2010.

ATHNASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, F.; JACKSON, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep, in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v. 99, 19-21, 2001.

BOURGAUD, F. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p.839-851, 2001.

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

CEZAR, A. S.; BATISTA, J.; BIANCHIN,C.I.; Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v.38, 2008.

COSTA, C.T.C; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.108-116, 2008.

COSTA, C.T.C.; MORAIS, S.M. DE; BEVILAQUA, C.M.L.; SOUZA, M.M.C. DE; LEITE, F.K.A. Ovicidal effect of *Mangifera indica* L. seeds extracts on *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 11, p. 57-60, 2002.

FLAMBÓ, D.F.A.L.P. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana**, 2013, 43 p. Dissertação. Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2013.

- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for courting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Council of Science and Industry Research in Australia**, v.12, p.50-52, 1939.
- HECK I.; LEANDRO, A.S.; LEITE, C.T.; GINDRI, J.K.; SOUZA, M.B.M. de; DEPNER, R.; MOLENTO, M.B. Efeitos do Clima sobre a ação parasitária em bezerros e presença de larvas em manejo rotativo de pasto em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, p.1461-1464, 2005.
- HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The Veterinary Record**, v.130, p.442-446, 1992.
- KRYCHAC-FURTADO, S.; NEGRELLE, R.B.; MIGUEL, O.G.; ZANIOLO, S.R.; KAPRONEZAI, J.; RAMOS, S.J.; SOTELLO, A. Efeito de *Carica papaya* (caricaceae) e *Musa paradisíaca* Linn. (musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.72, p.191-197, 2005.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, JR.V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25. n. 3, p.429-38, 2002.
- MELO, A.C. F.L.; RONDON, F.C.M.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L. Desenvolvimento da Resistência ao Oxfendazol em Propriedades Rurais de Ovinos na Região do Baixo e Médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.4, p.137-141, 2004.
- MOLENTO, M. B. Resistência de Helminthos em Ovinos e Caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, 2004.
- MULLA, W.A.; THORAT, V.S.; PATIL, R.V.; BURADE, K.B. Anthelmintic activity of leaves of *Alocasia indica* Linn. **International Journal of PharmTech Research**, v.2, p. 26-30, 2010.
- OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-2031, 2005.
- PAIVA, F.; SATO, M. O.; ACUÑA, A. H.; JENSEN, J. R.; BRESSAN, M. C. R. V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus Placei* e *Cooperia Punctata* em bovinos. **Hora Veterinária**, v.120, p.29-34, 2001.
- RANGANATHAN, S.; BALAJEE, S. A. M. Anti-*Cryptococcus* activity of combination of extracts of *Cassia alata* and *Ocimum sanctum*. **Mycoses**, v. 43, p. 299-301, 2000.
- SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v.98, p. 89-109, 2001.
- SILVA, N. L. A. DA; MIRANDA, F. A. A; CONCEIÇÃO, G. M. DA. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, 2010.

SOMCHIT, M. N.; REEZAL, I.; NUR, I. E.; MUTALIB, A. R. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 1-4, 2003.

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

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & contexto – enfermagem**, v.15, n.1, p.115-121, 2006.