

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEW KAN SPRENGER

UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE *ARTEMISIA ANNUA* NO CONTROLE DE
EIMERIA EM AVES E NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM CAPRINOS

CURITIBA

2013

LEW KAN SPRENGER

UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE *ARTEMISIA ANNUA* NO CONTROLE DE
EIMERIA EM AVES E NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana B. B. Maurer

CURITIBA

2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE *Artemisia Annu* NO CONTROLE DE *Eimeria* EM AVES E NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM CAPRINOS"** apresentada pelo Mestrando **LEW KAN SPRENGER** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 19 de fevereiro de 2013

Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento
Presidente/Orientador

Dr. João Ari Gualberto Hill
Membro

Professor Dr. Edson Gonçalves de Oliveira
Membro

À minha família, Carmen, Paulo,
Raphael, Mahala, Théo, pela
ajuda de todas as formas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as formas de divindades existentes pela criação e manutenção de Tudo.

Aos meus pais e irmãos, que mesmo algumas vezes estando às vezes ausentes estavam sempre presentes e pelo amor incondicional.

A minha namorada Larissa por estar sempre ao meu lado, pelo amor, pelo carinho e por me entender mesmo quando eu não me entendia.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Beltrão Molento, pela orientação nos trabalhos e pela ajuda no crescimento do meu Eu.

À minha co-orientadora, professora Dra. Juliana Bello Baron Maurer, por todo apoio e ajuda no meu trabalho, principalmente pelos conselhos pessoais e profissionais.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelo incremento científico.

A Grande Família Wünsche e Risolia pela amizade verdadeira e companheirismo.

Aos meus amigos Alex e Felix por acreditarem em mim em todos os momentos e me apoiar em todas as fases.

A “velha guarda” da turma de medicina veterinária 2006-2010, principalmente ao Mayron, Daniel e Carlos, pela amizade de anos e sempre.

Aos amigos Luiz Bassan e Rodrigo Rosa, sem eles os primeiros passos que dei não seriam possíveis.

Aos amigos que fiz no laboratório Úrsula, Andréia, Fernando, Arnieles, Fernanda, Pedro, Vivien e Ricardo, pelos conselhos e ajuda ao longo desses dois anos.

Aos amigos do NUPPLAMED, principalmente a professora Dra. Selma Faria Zawadzki Baggio e aos pós-graduandos Fábio e Luciano, pela ajuda no desbravamento do mundo bioquímico.

Ao professor Dr. Edson Gonçalves de Oliveira, por todo apoio na realização dos experimentos na Fazenda Experimental do Canguiri.

Ao professor Dr. Pedro Melillo de Magalhães, a Iara Bolson Beleze e ao pessoal do CPQBA-UNICAMP por toda ajuda prestada, do fornecimento da *Artemisia annua* até a interpretação dos resultados de seu uso.

Ao professor Dr. John E. Hermansen, Dr. Niels C. Kyvsgaard e ao pós-graduando Gustavo F. de Almeida, por toda consultoria científica.

Aos professores Dr. Peterson Triches Dornbusch e Dr. Ivan Roque de Barros Filho, membros do Comitê de Orientação, pelas orientações prestadas.

Às alunas de iniciação científica Amanda Becker e Helena Baggio, por toda a dedicação ao projeto.

A coordenação de pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio acadêmico.

A Coordenação de Aperfeiçoamento em Pesquisa e Ensino Superior e para o CV 43-08 – UGF – SETI Governo do Paraná, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram e incentivaram nessa caminhada.

Muito obrigado!

“E o tempo avança e a gente agradece pela vida. Vida de sonhos, verdades, alegrias, de dores, amores e luz. Tenta, mesmo que ao momento seja só lembrança. Viva de forma que seja mistério, incertezas, de luta, de paz e de amor.”

Cartola

RESUMO

A eimeriose causa graves lesões no sistema digestivo das aves, o que acarreta em perdas produtivas, que ocorrem tanto de modo direto como indireto. Na caprinocultura, este lugar é ocupado pelas infecções por nematódeos gastrintestinais. O modo usual de combater estes dois problemas é com o uso de produtos antiparasitários comerciais, o que causa também a seleção de organismos resistentes. Este fato é reconhecido no Brasil e no mundo. Diversas ferramentas foram desenvolvidas com o intuito de contornar essa situação, sendo que uma das mais promissoras é a utilização da fitoterapia. Entre as diversas plantas estudadas, uma que possui um grande destaque atualmente é a *Artemisia annua*. Planta de origem chinesa, onde é usada há mais de 2000 anos para curar a malária e outros distúrbios. *Artemisia annua* se encontra difundida por diversas partes do globo, sendo pesquisada para combater os mais diversos patógenos. Na parasitologia, muitos são os casos de sucesso relatados com a utilização de produtos derivados de diferentes extrações, principalmente frente a nematódeos e protozoários do filo Apicomplexa. Esta dissertação se inicia com um capítulo sobre a resistência dos nematódeos gastrintestinais de caprinos, mostrando as novas ferramentas existentes para combater este problema. Este capítulo irá focar na utilização da fitoterapia como tratamento, indicando o potencial da *Artemisia annua* para resolver esse agravo. Em seguida, são apresentados três trabalhos com a utilização de extratos fitoterápicos desenvolvidos a partir das folhas da planta. No primeiro, foram produzidas três diferentes extrações: aquosa (Aq.), hidroalcoólica de 7 dias (H.7) e de 30 dias (H.30). Estes foram submetidos a marcha fitoquímica, dosagem de fenóis totais e de artemisinina, teste toxicológico e ensaios antioxidantes. Concluiu-se que ambos os extratos possuíam vários metabólitos com ações antiparasitárias, além de melhorarem o sistema imune e possuírem baixo índice de toxicidade. Já no segundo trabalho, os três extratos foram usados para verificar a atividade *in vitro* para combater nematódeos gastrintestinais de caprinos. Os extratos H.7 e H.30 demonstraram eficácia superior a 90% no teste da eclodibilidade larvar somente na concentração de 50 mg/ml⁻¹. O mesmo não ocorreu no teste de inibição da migração larvar. O extrato aquoso não demonstrou bons resultados nos dois testes. Por fim, no último trabalho é mostrado o uso para combater a coccidiose em camas de aves contaminadas. Após a aplicação dos produtos e análise do material, verificou-se que a redução máxima dos oocistos foi menor que 45%, com a aplicação dos extratos H.7 e H.30 na concentração de 12 mg.mL⁻¹. Contudo, devido à magnitude do problema que é esta doença e das dificuldades de destruir os oocistos, os resultados foram considerados muito positivos. Em conclusão, os extratos demonstraram uma excelente atividade frente aos desafios impostos. Este fator, aliado aos resultados encontrados nos exames bioquímicos, evidenciam que estes fitoterápicos possuem um alto potencial antiparasitário e devem ser melhor estudados, visando maximizar a eficácia e explorar novas áreas de aplicação.

Palavras-chave: *artemisinina*, *Eimeria* sp., nematódeos gastrintestinais, resistência parasitária.

ABSTRACT

The eimeriosis in poultry causes severe lesions in the digestive system, resulting in production losses, which occur both direct and indirect mode. In goats, this stage is occupied for infections by gastrointestinal nematodes. The usual way to combat these two problems is with the suppressive use of anthelmintic, which accelerated the installation of parasite resistance, and currently there are several reports of this process in Brazil and worldwide. Many tools have been developed in order to overcome this situation, and one of the most promising is the use of herbal medicine. Among the many plants already studied, the *Artemisia annua* have a big highlight. Plant from China, where it is used for more than 2000 years to cure malaria and other diseases, today is widespread in various parts of the globe, being researched to tackle the most diverse pathogens. In parasitology, there are many success stories reported with the use of products derived from different extractions, particularly against nematodes and protozoa of the phylum Apicomplexa. Initially, it presents a chapter on resistance of gastrointestinal nematodes in goats, showing the new tools available to combat this problem. This part focuses on the use of herbal medicine as healing, indicating the potential of *A. annua* to resolve this grievance. Then there are three works developed with the use of herbal medicines extracts from the leaves of the plant. At first, three different extractions were produced: aqueous (aq.), hydroalcoholic 7 days (H.7) and 30 days (H.30). These were submitted to phytochemical march, dosage of phenolic compounds and artemisinin, toxicological test and antioxidants assays. It was concluded that both extracts possess various metabolites with antiparasitic actions, besides improve the immune system and have low toxicity index. In the second study, the three extracts were used to verify the in vitro activity to combat gastrointestinal nematodes of goats. The extracts H.7 and H.30 demonstrated efficacy greater than 90% in the egg hatch test at a concentration of 50 mg.ml⁻¹. This did not occur in the larval migration inhibition assay. The aqueous extract did not show good results in both tests. Finally, in the last work is shown the use for combating coccidiosis in poultry contaminated beds. After application of the products and material analysis, it was found that the maximum reduction of the oocysts was less than 45%, but due to the magnitude of the problem is that this disease and the difficulties to destroy the oocysts, the results were very positive. In conclusion, the three extracts demonstrated excellent activity against the challenges posed. This factor, combined with the results in biochemical tests show that these herbal drugs have a high potential antiparasitic and should be better studied in order to maximize the effectiveness and explore new application areas.

Keywords: *artemisinin*, *Eimeria* sp., gastrointestinal nematodes, parasitic resistance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PLANTAÇÃO DE <i>ARTEMISIA ANNUA</i> , CPQBA – UNICAMP.....	39
FIGURA 2 – AMBIENTE INTERNO DAS BAIAS ONDE ESTAVAM ALOJADOS OS FAISÕES (<i>Phasianus Colchicus L.</i>), FAZENDA EXPERIMENTAL CANGUIRI, 2012.....	139
FIGURA 3 – AMBIENTE INTERNO DO GALPÃO QUE ABRIGAVA OS FAISÕES (<i>Phasianus Colchicus L.</i>), FAZENDA EXPERIMENTAL CANGUIRI, 2012.....	139

LISTA DE TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS

TABELA 1 – Resultados da marcha fitoquímica dos extratos aquoso, hidroalcoólico de 7 dias e hidroalcoólico de 30 dias obtidos da <i>Artemisia annua</i>	77
TABELA 2 - Percentual médio (\pm desvio padrão) de inibição da eclosão larvar de nematódeos gastrintestinais dos extratos obtidos a partir da <i>Artemisia annua</i>	108
TABELA 3 - Percentual médio (\pm desvio padrão) de inibição da migração larvar de nematódeos gastrintestinais dos extratos obtidos a partir da <i>Artemisia annua</i>	109
TABELA 4 - Número médio \pm desvio padrão (eficácia do tratamento %) de oocistos de <i>eimeria</i> sp. no intervalo “t” após a aplicação do extrato hidroalcoólico de 7 dias obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	142
TABELA 5 - Número médio \pm desvio padrão (eficácia do tratamento %) de oocistos de <i>eimeria</i> sp. no intervalo “t” após a aplicação do extrato hidroalcoólico de 30 dias obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	143
TABELA 6 - Número médio \pm desvio padrão (eficácia do tratamento %) de oocistos de <i>eimeria</i> sp. no intervalo “t” após a aplicação do extrato aquoso obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	144
QUADRO 1 - Quantificação da lactona sesquiterpênica artemisinina ($\mu\text{g/dL}$) nos extratos obtidos da <i>Artemisia annua</i> por cromatografia líquida de alta eficiência.....	78
QUADRO 2 - Valores de CL_{50} calculados para os diferentes extratos no teste de letalidade frente à <i>Artemisia annua</i>	79
QUADRO 3 - Valores de fenóis totais calculados para os diferentes extratos no ensaio de Folin-Ciocalteu.....	79
QUADRO 4 - Valores de CE_{50} calculados para os diferentes extratos nos diferentes ensaios antioxidantes.....	83
GRÁFICO 1 -. Atividade antioxidante (% Ativ. Ant.) dos extratos obtidos da <i>Artemisia annua</i> , em diferentes concentrações, pelo ensaio do radical DPPH.....	80
GRÁFICO 2 - Atividade antioxidante (% Ativ. Ant.) dos extratos obtidos da <i>Artemisia annua</i> , em diferentes concentrações, pelo ensaio do poder redutor.....	81
GRÁFICO 3 - Atividade antioxidante (% Ativ. Ant.) dos extratos	

obtidos da <i>Artemisia annua</i> , em diferentes concentrações, pelo ensaio da captação do radical óxido nítrico.....	82
GRÁFICO 4 – Curva do efeito dose-dependente no teste de eclodibilidade larvar com o extrato hidroalcoólico de 7 dias obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	110
GRÁFICO 5 – Curva do efeito dose- dependente no teste de eclodibilidade larvar com o extrato hidroalcoólico de 30 dias obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	110
GRÁFICO 6 – Curva do efeito dose- dependente no teste de eclodibilidade larvar com o extrato aquoso obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	111
GRÁFICO 7 – Curva do efeito dose- dependente no teste de migração de larvas em agar com o extrato hidroalcoólico de 7 dias obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	111
GRÁFICO 8 – Curva do efeito dose- dependente no teste de migração de larvas em agar com o extrato hidroalcoólico de 30 dias obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	112
GRÁFICO 9 – Curva do efeito dose- dependente no teste de migração de larvas em agar com o extrato aquoso obtido a partir da <i>Artemisia annua</i>	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – micrograma

µL – microlitro

B.O.D. – demanda bioquímica de Oxigênio

dL – decilitro

DMSO – dimetilsulfóxido

et al. – e colaboradores

g – grama

h – hora

HPLC – High-performance liquid chromatography

L – litro

L1 – larva de primeiro estágio

L3 – larva de terceiro estágio

m – metro

M – mol

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

ORAC - oxygen radicals absorbance capacity

p/p – pureza/pureza

PB – Paraíba

pH – potencial hidrogeniônico

rpm – rotações por minuto

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

v/v – volume/volume

W – watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 HIPÓTESE.....	20
1.2 OBJETIVO GERAL.....	21
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2 ARTEMISIA ANNUA: UMA SOLUÇÃO FITOTERÁPICA À RESISTÊNCIA PARASITÁRIA DE NEMATODÉOS GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS.....	22
2.1 INTRODUÇÃO.....	24
2.2 NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM CAPRINOS.....	25
2.3 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA.....	27
2.4 CONTROLES ALTERNATIVOS.....	29
2.5 FITOTERAPIA.....	33
2.6 FITOTERAPIA EM MEDICINA VETERINÁRIA.....	37
2.7 <i>ARTEMIA ANNUA</i>	40
2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
3. AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE <i>ARTEMISIA ANNUA</i> COMO CANDIDATOS A FITOTERÁPICOS ANTIPARASITÁRIOS.....	68
3.1 INTRODUÇÃO.....	70
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3.3 RESULTADOS.....	79
3.4 DISCUSSÃO.....	86
3.5 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
4. ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> OVICIDA E LARVICIDA DE EXTRATOS FITOTERÁPICOS DE <i>ARTEMISIA ANNUA</i> SOBRE NEMATODÉOS GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS.....	102
4.1 INTRODUÇÃO.....	104
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	106
4.3 RESULTADOS.....	110

4.4 DISCUSSÃO.....	115
4.5 CONCLUSÃO.....	121
REFERÊNCIAS.....	122
5. EFEITO ANTICOCCIDIANO DE EXTRATOS DE <i>ARTEMISIA</i>	
<i>ANNUA</i> EM CAMAS DE AVES CONTAMINADAS COM <i>EIMERIA</i> SP....	133
5.1 INTRODUÇÃO.....	135
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	138
5.3 RESULTADOS.....	143
5.4 DISCUSSÃO.....	147
5.5 CONCLUSÃO.....	151
REFERÊNCIAS.....	152
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	160
7. ANEXOS.....	162

INTRODUÇÃO

A pecuária no Brasil deu seus primeiros passos no século XVI, graças a Tomé de Sousa, ainda na época das capitanias hereditárias. A criação era principalmente de gado bovino, que aliado as condições favoráveis ao seu desenvolvimento, vieram com a finalidade de movimentar os engenhos e também para transportar pessoas e cargas. De um modo mais sucinto, pode-se dizer que a finalidade primordial dos animais era a tração animal.

Transcorridos quase 500 anos desde então, a criação animal continua sendo o pulmão da economia brasileira. Entretanto, agora os animais são um dos atores principais da economia, é a venda de produtos oriundos deles que geram dinheiro, não são mais coadjuvantes. Contamos agora com uma diversidade de culturas, somos considerados o celeiro do mundo, ocupamos um lugar de destaque na pecuária mundial. Além da bovinocultura, carro chefe da produção, temos como destaque a avicultura e a suinocultura, e com alguma dificuldade temos ainda um bom rebanho caprino.

Atualmente, a carne de aves é o segundo tipo mais consumido no planeta, ficando atrás somente da carne suína (FAO, 2011). O Brasil está consolidado com um dos polos mundiais na produção de frango, sendo o terceiro maior produtor mundial desses animais e o primeiro em termos de exportação (USDA, 2011). Quanto a caprinocultura, o tamanho do rebanho brasileiro é estimado em 9,5 milhões, representando assim também, uma importante atividade pecuária no país (COSTA *et al.*, 2011).

Independente de qual tipo de criação tratado, as parasitoses gastrintestinais ocupa um lugar de destaque entre as principais causas de prejuízos sanitários e econômicos. Estes podem ser divididos em diretos, como a diminuição na produção de carne ou leite e também pela mortalidade de alguns animais (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2006) e indiretos, resultando do dinheiro gasto com medicamentos e assistência veterinária para controlar as infecções.

Normalmente, o controle parasitário aplicado é com o uso de maneira indiscriminada de anti-helmínticos pertencentes a diversas classes químicas, muitas vezes sem considerar os fatores epidemiológicos envolvidos (FALBO *et al.*, 2009).

Contudo, a utilização de fármacos de modo supressivo aliado às falhas de manejo contribuem para o estabelecimento de parasitas resistentes aos produtos (ALMEIDA *et al.*, 2010). A resistência parasitária é um fenômeno biológico no qual uma droga não produz a mesma eficácia frente aos nematódeos após certo tempo, quando utilizada nas mesmas condições (CONDER *et al.*, 1995). Devido ao efeito seletivo, a eficácia de qualquer fármaco antiparasitário pode diminuir bruscamente, favorecendo a permanência da população resistente e a eliminação de indivíduos susceptíveis (MOLENTO, 2005). Outro problema é a deposição de compostos químicos no meio ambiente decorrente do uso desses produtos, que pode acarretar em distúrbios ecológicos (BEYNON, 2012).

Buscando solucionar este problema, muitas novas ferramentas biotecnológicas e propostas integradas de manejo foram descobertas. Dentre estas novas inovações destacam-se o desenvolvimento de vacinas contra helmintos, utilização de raças de animais resistentes a parasitoses, fungos predadores e diversas estratégias de tratamento parasitário seletivo (AMARANTE, 2010). Uma destas novas aliadas no combate a resistência é a fitoterapia, que é a prática do uso de plantas ou suas partes com a finalidade terapêutica (FETROW; ÁVILA, 2000).

A fitoterapia é um ramo da medicina que vem crescendo notavelmente nos últimos anos (OLIVEIRA *et al.*, 2009), devido ao crescente interesse da indústria em compostos a partir de extratos vegetais. Isso é decorrente da necessidade de novos produtos que não sejam agressivos ao homem, aos animais e ao meio ambiente (MENDES *et al.*, 2007). Outra vantagem que podemos citar é que estes produtos não deixam, resíduos tóxicos significativos em alimentos e apresentam baixo custo de produção (OLIVO *et al.*, 2009). Além disso, compostos antiparasitários a base de extratos vegetais são uma alternativa frente à resistência, uma vez que como os parasitas não foram expostos aos princípios ativos presentes nestes produtos o processo de resistência demorará a ocorrer (BROGLIO-MICHELETTI *et al.*, 2010).

Dentre as diversas plantas estudadas está a *Artemisia annua*. Esta planta de origem chinesa, hoje distribuída em várias localidades do globo, vêm sendo estudada em diversos centros de pesquisas do mundo e muitas são as descobertas de novas aplicações de seus extratos que surgem anualmente. Na área da parasitologia, entre os diversos usos citados na literatura, estão o controle da coccidiose com o fornecimento da planta para as aves (ALLEN *et al.*, 1997; BRISIBE *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*,

2011) e sucesso frente a *Haemonchus contortus in vitro* e *in vivo* em caprinos (FERREIRA, RITCHEY, CASSIDA, 2006 ; SQUIRES, 2009; SQUIRES *et al.*, 2011).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver novas metodologias de aplicação para os extratos fitoterápicos produzidos a partir da *A. annua*, visando o controle da coccidiose aviária e o combate a nematódeos gastrintestinais de caprinos.

Esta dissertação está organizada em capítulos. O capítulo 2 descreve uma revisão bibliográfica sobre a problemática da eimeriose em aves e as parasitoses gastrintestinais de caprinos, focando na utilização da fitoterapia como solução para os dois problemas. No capítulo 3 se encontrará o estudo fitoquímico da *A. annua*, sendo descrita os três tipos de extratos produzidos da planta (aquoso, hidroalcoólico de 7 dias e de 30 dias). Também contará com a análise de seus componentes e atividades, que foram analisados pela marcha fitoquímica, ensaios antioxidantes, de toxicidade além da dosagem de artemesinina. Já no capítulo 4 é mostrado a utilização dos três extratos para o controle da coccidiose aviária, sendo os mesmos aplicados na cama dos animais. É uma metodologia inovadora, diferente de tudo que já foi pesquisado, que promete ser uma excelente ferramenta para o controle da contaminação ambiental causada pela *Eimeria* sp. Por fim, o capítulo 5 conta com o estudo *in vitro* utilizando os três extratos produzidos frente ao desafio do teste de eclodibilidade de ovos e inibição da migração larvar realizado com ovos e larvas provenientes de um *pool* de fezes de caprinos altamente contaminados com nematódeos gastrintestinais.

1.1 HIPÓTESE

O uso de extratos fitoterápicos produzidos a partir da *Artemisia annua* é eficaz contra *Eimeria* sp. e nematódeos gastrintestinais de caprinos.

1.2 OBJETIVO GERAL

Formular um fitoterápico a base de *Artemisia annua* que tenha efeito comprovado no controle ambiental de *Eimeria* sp. e também para nematódeos gastrintestinais de caprinos.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever os componentes encontrados nos diferentes extratos obtidos a partir da mesma amostra de *Artemisia annua*, por meio da realização da marcha fitoquímica, ensaios antioxidantes e teste de toxicidade.
- b) Analisar a possibilidade da aplicação dos extratos para o controle da contaminação ambiental causada por *Eimeria* sp., visando uma análise de sua eficácia e impacto no meio ambiente.
- c) Verificar a eficácia *in vitro*, por meio da aplicação das técnicas do teste de eclodibilidade de ovos e inibição da migração larvar, dos extratos como possíveis candidatos a fitoterápicos antiparasitários para nematódeos gastrintestinais de caprinos.

2. ARTEMISIA ANNUA: UMA SOLUÇÃO FITOTERÁPICA À RESISTÊNCIA PARASITÁRIA DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS

RESUMO

A caprinocultura é uma atividade agroeconômica de grande importância no Brasil e que atualmente está em franca expansão. Contudo, devido ao baixo grau de investimentos na maior parte da produção brasileira, ela possui diversos entraves, sendo o parasitismo causado por nematódeos gastrintestinais um dos principais. Estes parasitas causam um enorme prejuízo ao produtor, devido aos menores índices zootécnicos. O modo mais utilizado para combater este problema é a utilização de anti-helmínticos, todavia esta aplicação é feita de modo supressivo e inadequado, fazendo com que atualmente grande parte dos princípios não sejam mais eficazes. Este fenômeno se chama resistência parasitária e é um problema global. A partir de então, diversas novas ferramentas foram desenvolvidas para contornar a situação, sendo que a fitoterapia é a uma das que mais se destaca. Esta prática consiste na utilização de extratos produzidos a partir de partes de vegetais, visando o tratamento de enfermidades. Não adianta fornecer o medicamento ao animal sem antes fazer testes preliminares com os extratos, para definir qual a sua composição química, verificar os prováveis mecanismos de ação e definir o índice de toxicidade. Apesar de ser bem estudada para humanos, na medicina veterinária ela ainda é uma ciência nova, sendo que a maioria das pesquisas ainda é recente. É na área da parasitologia que grande parcela delas se concentra, sendo que diversas plantas já foram cientificamente estudadas e testadas para combater os vermes em questão. Entre estes vegetais, destaca-se a *Artemisia annua*, planta utilizada a muito tempo para curar a malária e que está sendo pesquisada nos mais diversos pólos científicos do globo. Por possuir efeito comprovado para diversos outros fins, ela vem sendo pesquisada para os mais diversos parasitas. Seu principal metabólito é a artemisinina, contudo a planta possui vários outros compostos com diversas propriedades distintas entre si, que ajudam de modo direto ou indireto no combate ao parasitismo.

Palavras-chave: caprinocultura, fitoterapia, parasitoses.

ARTEMISIA ANNUA: A HERBAL SOLUTION TO PARASITE RESISTENCE IN GOATS GASTROINTESTINAL NEMATODES

ABSTRACT

The goat production is a very important agricultural economic activity in Brazil, which is currently booming. However, due to the low level of investment in most of the Brazilian production, this system has many obstacles and the parasitism caused by gastrointestinal nematodes is the major. These parasites cause a huge loss to the producer, due to lower indexes. The method most commonly used to combat this problem is the use of anthelmintics, but this application is made so suppressive and inadequate, causing most of the principles currently are no longer effective. This phenomenon is called parasitic resistance and is a global problem. Since then, several new tools were developed to circumvent the situation and that herbal medicine is the one that stands out the most. This practice is based in the use extracts produced from parts of plants, in order to cure the disease. No use only deliver the medication to the animal without first making preliminary tests with the extracts to define what its chemical composition, check the probable mechanisms of action and define the toxicity index. Despite being well studied in humans, in veterinary medicine it is still a new science and most research is still new. It is in the area of parasitology that focuses a large portion of them, and several plants have been scientifically studied and tested to combat the worms. Among these plants there is the *Artemisia annua*, plant long used to cure malaria and has been researched in several scientific centers of the globe. It have proven effective for many other purposes and has been studied for used in front of various parasites. Its main metabolite is artemisinin, however the plant has several other compounds with different properties distinct from each other, so that has helped directly or indirectly in combating parasitism.

Keywords: goat, parasitosis, phytotherapy.

2.1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos é uma atividade agropecuária amplamente explorada nos países tropicais, principalmente visando à produção de carne. Atualmente, representa um importante setor do agronegócio mundial, contribuindo com o fornecimento de couro, fibra, carne, leite e seus derivados (RESENDE *et al.*, 2005). O Brasil possui um rebanho caprino de 9.163 milhões de cabeças, sendo que a região Nordeste detém mais de 90% desta população (SEBRAE, 2009). A produção de carne caprina, em 2011, foi estimada em 42 mil toneladas, apresentando um crescimento de 247% na última década (FAO, 2011). Em termos leiteiros, os caprinos contribuem com 1% da produção leiteira mundial, sendo que nosso país produz diariamente aproximadamente 85 mil litros (WANDER; MARTINS, 2008). A pele é a matéria-prima que admite a mais elevada agregação de valor em toda cadeia produtiva (LEITE; VASCONCELOS, 2000), contudo ainda não é aproveitado o total potencial deste produto.

O interesse pela caprinocultura vem crescendo significativamente devido principalmente ao fácil manejo necessitado e a facilidade de manutenção dos animais em rebanhos locais de pequeno e médio porte (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2012). Outras vantagens destes animais é a rápida adaptação ao clima, vegetação e sistemas produtivos em que se encontram (NOGUEIRA FILHO; KASPRZYKOWSKI, 2006). Como grande parcela da produção está concentrada em pequenas propriedades, esta cultura destaca-se como alternativa economicamente viável de geração de emprego e renda (SIMPLÍCIO, 2006). Nos casos da produção de subsistência, concentrada principalmente nos estados do Nordeste, representa uma fonte de proteína de origem animal com importante relevância socioeconômica para a população local (LIMA *et al.*, 2010).

Embora o país apresente grandes áreas com condições ideais para produzir caprinos, a nossa participação na produção mundial está abaixo de 2% (FAO, 2006). A espécie caprina, apesar de seus potenciais, não tem sido reconhecida por tal valor, mesmo possuindo grande utilidade para o homem (BENVENUTI, 2011). A falta de grandes políticas governamentais incentivadoras aliado ao pouco crédito rural dificulta ainda mais a produção (DE VRIES, 2008). O baixo consumo *per capita* no Brasil, cerca de 125 gramas/habitante/ano, é outra dificuldade enfrentada (IBGE, 2009). Mas os

principais problemas estão no modelo de produção brasileiro, onde predominam os baixos índices produtivos, que advêm da precária nutrição e principalmente do ineficaz manejo sanitário (GOUVEIA; GUIMARÃES; HADDAD, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010).

2.2 NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM CAPRINOS

Os nematódeos gastrintestinais (NGI) em caprinos, são considerados um dos principais entraves na produção causando graves prejuízos ao produtor (LIMA *et al.*, 2010). As perdas econômicas são decorrentes do crescimento retardado, perda de peso, diminuição da ingestão de alimentos, menor produtividade e baixa fertilidade (VIEIRA *et al.*, 2009). Além disso, nos casos de infecção maciça têm-se altas taxas de mortalidade (MOLENTO, 2004). As principais espécies associadas a esta infecção são os parasitas pertencentes à família Trichostrongylidae (BENVENUTI, 2011).

O ciclo biológico é direto, com uma fase de vida livre que ocorre no ambiente e uma fase parasitária que se desenvolve no animal, tendo um período pré-patente que varia de 14 a 21 dias, também dependente dos efeitos de ambiente (URQUHART *et al.*, 1996). A presença dos vermes no ambiente não significa necessariamente a presença da doença, sendo que para a instalação da mesma depende de fatores epidemiológicos do ambiente e de fatores ligados ao hospedeiro (WALLER *et al.*, 2004).

Os parasitas mais predominantes no Brasil são *Haemonchus* sp., em primeiro lugar, distribuídos em todas as regiões do país e o mais importante epidemiologicamente, seguido do *Trichostrongylus* sp. e *Oesophagostomun* sp. (VIEIRA, 2008; LIMA *et al.*, 2010). Em pesquisa realizada por Sprenger *et al.* (2013), os principais parasitas encontrados na Lapa, PR, foram em ordem decrescente do gênero *Haemonchus* sp., *Trichostrongylus* sp., *Strongyloides* sp. e *Oesophagostomun* sp., respectivamente. Estes quatro parasitas estão associados a significativas perdas econômicas, sendo os mais patogênicos da família (COSTA JUNIOR *et al.*, 2005). Já Falbo *et al.* (2009), no município de Guarapuava, encontraram predominância de *Haemonchus* sp. (97%) e *Strongyloides* sp. (3%).

A infecção por NGI geralmente é mista, originando quadro clínico associado a cada espécie. De modo geral, a mucosa do trato gastrintestinal inferior fica espessa,

edemaciada, anêmica e brilhante (SOUTO SILVA *et al.*, 2010). No caso do *Haemonchus contortus*, o mais patogênico de todos os endoparasitas, podem aparecer pequenas úlceras no local de fixação (SCHENKEL *et al.*, 2012). Já animais parasitados por *Oesophagostomum* sp. formam pequenos nódulos amarelos ou creme, na mucosa do intestino grosso e delgado (NWOSU *et al.*, 2011). Analisando histopatologicamente os tecidos afetados, encontramos acúmulo de mastócitos e eosinófilos, especialmente na mucosa, sendo que em algumas infecções também visualizamos infiltrados de basófilos acompanhados de leucócitos (ADDAH; YAKUBU, 2009).

Os sinais clínicos variam conforme a idade do hospedeiro, imunidade, estado nutricional, intensidade da carga parasitária e espécies de NGI envolvidas (MIR *et al.*, 2008). De modo geral, pode ocorrer apatia, perda de peso, desidratação, diarreia, anemia de graus variados e pelagem opaca (WESONGAH *et al.*, 2006). No caso de altas cargas parasitárias a taxa de mortalidade pode ser elevada, principalmente quando os vermes envolvidos são altamente patogênicos (NEGASI; BOGALE; CHANIE, 2012).

Para chegar ao diagnóstico preciso, uma anamnese completa juntamente com o histórico da propriedade são de extrema validade. Para ser conclusivo, pode-se utilizar o exame coproparasitológico, sendo ainda possível realizar a cultura das fezes, para identificar as espécies envolvidas (ARAÚJO SANTOS; ZAMORA; RIBEIRO, 2012). Quando o animal em questão morrer, a realização da necropsia, exame do TGI, coleta de parasitas e posterior identificação, é o método diagnóstico mais preciso (UENO; GONÇALVES, 1998).

O controle dos NGIs é realizado com o uso frequente de medicamentos anti-helmínticos, sendo que as principais classes usadas atualmente são os benzimidazóis, imidotiazóis e lactonas macrocíclicas (GOUVEIA; GUIMARÃES; HADDAD, 2009; SPRENGER *et al.*, 2013). Em grande parte das vezes, essa aplicação não leva em consideração os fatores epidemiológicos locais envolvidos na infecção (FALBO *et al.*, 2008). Contudo, esse manejo sanitário inadequado faz com que as drogas percam a eficácia após um período de utilização, fenômeno chamado de resistência parasitária, que será abordado no próximo tópico.

2.3 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

A resistência parasitária (RP) é um fenômeno biológico, no qual uma droga não mantém a mesma eficácia frente aos parasitas, quando utilizada nas mesmas condições, após um determinado período de tempo (CONDER; CAMPBELL, 1995). A eficácia das drogas diminui consideravelmente devido a sobrevivência de parasitas resistentes e a transferência dos seus genes a prole, fazendo com que permaneça a população resistente e se elimine os indivíduos susceptíveis (MOLENTO, 2005).

A sua instalação é inevitável, sendo que a utilização de maneira supressiva e sem prévio estudo epidemiológico acaba acelerando mais o processo (WILLIAMS *et al.*, 1999). O intervalo para que este fenômeno se instale, depende da espécie do parasita envolvido, da frequência dos tratamentos realizados e da pressão de seleção feita pelo fármaco (VERMUNT; WEST; POMROY, 1995). Os NGIs podem desenvolver resistência aos anti-helmínticos dentro de cinco a oito gerações após a introdução de um novo grupo químico (GRANT, 2001). A utilização de medicamentos de longa persistência, o uso de subdosagens e a rápida rotação de princípios ativos são considerados como causas predisponentes ao aparecimento da RA (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; ALBERTI *et al.*, 2001).

Este fenômeno pode ser diagnosticado por métodos diretos ou indiretos. No método direto utiliza-se o teste *in vivo* controlado. Já para o diagnóstico indireto, podem ser usadas duas ferramentas: as análises *in vitro* e o teste de redução na contagem de ovos por grama de fezes, TRCOF (MOLENTO, 2004). Considera-se como resistência, quando uma determinada droga não apresenta mais eficácia superior a 95% frente a um parasita, o qual anteriormente era eficaz (CONDER; CAMPBELL, 1995). A partir do diagnóstico, o problema tende a aumentar cada vez mais, pois a população de indivíduos resistentes ao princípio ativo aumenta a cada geração (SANGSTER, 2001).

O primeiro caso de resistência em NGI de caprinos a anti-helmínticos foi relatado no Texas (THEODORIDES; SCOTT; LADERMAN, 1970), posteriormente foram feitos outros relatos na Austrália (MCGREGOR *et al.* 1980, HALL *et al.*, 1981), Nova Zelândia (KETTLE *et al.*, 1983) e França (KERBOUEUF; HUBERT, 1985). No Brasil, a primeira suspeita destes NGIs resistentes foi descrita por Vieira (1986) no estado do Ceará, posteriormente foi identificado casos também em Pernambuco (CHARLES; POMPEU;

MIRANDA, 1989; SANTOS; CHARLES; MEDEIROS, 1993) e na Bahia (BARRETO; SILVA, 1999).

Atualmente a RP foi diagnosticada em diversos países, e passou a ser um problema global (BURKE *et al.*, 2007). Howell *et al.* (2008) detectaram resistência a ivermectina nos Estados Unidos e Anziani *et al.* (2009) na Argentina. Domke *et al.* (2012) visualizaram este problema em rebanhos caprinos na Noruega frente a ivermectina, albamectina e moxidectina. SAEED *et al.* (2010) detectaram diversos rebanhos no Paquistão apresentaram RP para oxbendazol, ivermectina e levamisol. Paraud *et al.* (2009) mostraram a existência de resistência para levamisol e febendazol na França. Caprinos contaminados com populações de parasitas resistentes a albendazol, ivermectina e tetramisol foram descobertos na Etiópia (KUMSA; ABEBE, 2009). Na África do Sul, foram pesquisadas diversas fazendas e em todas foram detectadas casos de RP a ivermectina, albendazol e levamisol, sendo a um ou mais princípios ativos (TSOTETSI *et al.*, 2012). Enfim, provavelmente todos os países produtores de caprinos devem ter casos de resistência parasitária a um ou mais princípios ativos (JABBAR *et al.*, 2006; KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012).

No Brasil, são poucos ou até mesmo inexistentes, os produtores que nunca enfrentaram esse tipo de problema em seus plantéis, independente da localidade do país em que estão situados (BENVENUTI, 2011). Melo *et al.* (2003) mostraram que em algumas propriedades no Ceará, houve casos de resistência à oxfendazol, levamisol, closantel e ivermectina. Em 2003, Mattos *et al.* detectaram resistência à ivermectina no Rio Grande do Sul. Melo *et al.* (2009) encontraram em seu estudo resistência a benzimidazóis em 87,5% das propriedades pesquisadas. Rodrigues *et al.* (2007) já tinha detectado resistência à albendazol neste estado, reforçando ainda mais a situação para este princípio ativo. Sczesny-Moraes *et al.* (2010) encontram em diversas propriedades do Mato Grosso do Sul, este fenômeno para albendazol, ivermectina, levamisol, moxidectina e triclorfon. Também no Ceará, Coelho *et al.* (2010) também detectaram resistência a ivermectina e ainda a albendazol. Lima *et al.* (2010) evidenciaram este processo em alguns rebanhos caprinos da Paraíba, frente a albendazol, levamisole e ivermectina. Costa *et al.* (2011) detectaram resistência dos parasitas a ivermectina (0,2mg/kg), no Rio Grande do Norte. Sprenger *et al.* (2013) detectaram populações de NGIs de caprinos resistentes a levamisol no Paraná.

Apesar de o problema ser grande, existem algumas novas biotecnologias que estão sendo estudadas e aprimoradas para contornar a situação (MOLENTO, 2009). A seguir, serão descritas algumas dessas alternativas.

2.4 CONTROLES ALTERNATIVOS

Com o quadro da RP aumentando cada vez mais, associado ao despertar do consumidor para o consumo de alimentos com a menor quantidade de produtos químicos nocivos a saúde e ao meio ambiente utilizados ao longo da cadeia produtiva, diversos métodos alternativos estão sendo estudados. Serão abordados a seguir o manejo da pastagem, o controle biológico (besouros coprófagos e fungos nematófagos), seleção genética animal, vacinas e homeopatia. A fitoterapia será tratada em um tópico a parte.

2.4.1 Manejo de pastagem

Uma pastagem livre de parasitas parece ser o ideal à primeira vista, contudo é necessário ao animal um contato prévio com o NGI para o desenvolvimento de uma resposta imunológica frente aos mesmos (WALLER, 2002). Porém, esse contágio tem que ser baixo e com parasitas susceptíveis aos princípios químicos utilizados, população esta chamada de refugia (MOLENTO, 2005). A manutenção das larvas da refugia no pasto e vermes adultos nos hospedeiros é uma alternativa para frear o desenvolvimento da RP (VAN WYK, 2001).

O pastejo rotacionado é realizado com a divisão do pasto em áreas distintas, sendo que cada área recebe os animais da propriedade por um curto período. Os animais são retirados antes que o pasto fique muito degradado (rente ao chão), podendo assim se recuperar. O maior problema é equilibrar o número de dias de pastejo com o os dias em que o mesmo fica em descanso. Do ponto de vista nutricional, ele é viável, contudo não possui muito sucesso no controle parasitário a não ser que a pressão de pastejo seja baixa (CATTO *et al.*, 2009). Outra condição é que só em clima temperado esta proposta funciona, pois as larvas ficam viáveis no ambiente por menos

tempo, já em locais com estações bem definidas, os parasitas podem ficar viáveis por até 180 dias, inviabilizando o sistema (CATTO *et al.*, 2007).

O pastejo rotacionado pode ser melhorado se for realizada alternância de animais de espécies diferentes. Neste caso, podemos colocar animais que possuam poucos ou nenhum gênero de NGI semelhantes entre si, como por exemplo equinos e caprinos (FERNANDES *et al.*, 2004). Esta estratégia não deve ser feita com caprinos e ovinos juntamente, pois possuem muitos parasitas em comum (MOLENTO, 2004). Quando uma larva é ingerida por um hospedeiro não-preferencial, seu estabelecimento e desenvolvimento são dificultados ou anulados (AMARANTE, 2004).

Outra opção é colocar animais de idades distintas no mesmo piquete, pois assim os animais adultos acabam ingerindo um número maior de larvas na pastagem, sendo estes mais imunes aos efeitos dos NGIs (JABBAR *et al.*, 2006). Um cuidado importante é não colocar na pastagem animais debilitados ou fêmeas no período de pré-parto, pois estes tendem a eliminar altas cargas de vermes (CATTO BIANCHIN; TORRES JUNIOR, 2005).

O sistema integrado lavoura-pecuária, tem demonstrado bons resultados na diminuição da carga parasitária no ambiente, além de melhorar a qualidade do solo e controlar plantas invasoras (BARRETO *et al.*, 2010). O único empecilho é a diminuição da área de pastagem e a aptidão do pecuarista em cuidar do rebanho e também de uma área agrícola (VILELA *et al.*, 2011).

2.4.2 Controle Biológico

Consiste no uso de competidores naturais que agem sobre as fezes, como os besouros coprófagos, ou agem sobre as larvas, como os fungos nematófagos. Apesar de todo o estudo desenvolvido até o momento, este método enfrenta como principais problemas a relação custo/benefício, a eficácia variável e um modo de aplicação mais eficaz (ASSIS *et al.*, 2011).

Os besouros coprófagos agem diretamente sobre o bolo fecal, decompondo-o e desse modo inviabilizando as fezes, exercendo um controle indireto sobre os NGI (MIRANDA; SANTOS; BIANCHIN 1998). Outra vantagem de sua utilização é que estes

insetos formam galerias no solo e escondem massas fecais nelas, para alimentar sua prole (WHIPPLE *et al.*, 2012). Com isso acabam melhorando a aeração e adubação do solo (RIDS DILL; SMITH; EDWARDS; 2011). A espécie mais estudada e utilizada é *Digitonthophagus gazella*, a qual tem demonstrado adaptabilidade a diversos climas e regiões e maior eficácia (BERTONE *et al.*, 2005).

Os fungos nematófagos são classificados em predadores (a maioria das espécies), endoparasitas e oportunistas (BRAGA *et al.*, 2009). O primeiro grupo é o mais efetivo, age aprisionando as larvas e em seguida ocorre a penetração das hifas e digestão dos conteúdos internos destas (FERNANDEZ *et al.*, 2010). Dentre estes, a *Duddingtonia flagrans* destaca-se como a mais promissora para o controle de NGI (SAGÜÉS *et al.*, 2011; BUZATTI *et al.*, 2012). Para ser utilizado como um agente de controle biológico, estes devem sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal dos animais, germinar nas fezes e capturar larvas infectantes (EPE *et al.*, 2009). Os estudos atualmente estão focados na dosagem a ser administrada e na melhor metodologia de aplicação (SANTURIU *et al.*, 2011).

2.4.3 Seleção genética animal

É focada em dois pontos principais, a resistência/tolerância (capacidade do animal em não se infectar) e na resiliência (o animal infectado sofre poucas perdas produtivas) (MEXIA *et al.*, 2009). A seleção genética como alternativa à RP possui três possíveis estratégias: seleção entre raças, cruzamentos e seleção individual (ALMEIDA, 2009). Esta ferramenta vem sendo estudada principalmente em caprinos e ovinos, apresentando diversos resultados positivos. Estes êxitos ocorreram principalmente em países como Nova Zelândia e Austrália, onde a produção é baseada em uma ou duas raças dominantes, entretanto esta não é a situação no restante do mundo, o que dificulta a implantação do processo (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008).

Os benefícios da seleção devem balancear os resultados da resiliência com a resistência, de modo a reduzir a infecção no hospedeiro e também a contaminação da pastagem (BISHOP; MORRIS, 2007). Dados consistentes têm indicado que a seleção do hospedeiro contra uma espécie de NGI geralmente melhora a resposta frente a

outras espécies (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011). Todavia, a busca pela resistência pode diminuir a seleção de caracteres produtivos (VAGENAS *et al.*, 2002). Apesar de a vantagem genética poder ser melhorada a cada cruzamento, mais estudos estão sendo realizados para conseguir balancear as vantagens econômicas (MCMANUS *et al.*, 2009).

2.4.4 Vacinas

Apesar de muita pesquisa, ainda não há vacinas comerciais atualmente disponíveis contra NGI de pequenos ruminantes (ARUNKUMAR; BASITH; GOMATHINAYAGAM). Contudo, vacinas experimentais com proteínas específicas (H11) de *H. contortus* forneceram proteção parcial contra este parasita e melhoraram a resposta imune em cabras (HAN *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2012) e ovelhas (PIEDRAFITA *et al.*, 2012). Avanços recentes em genômica e proteômica permitirão um maior detalhamento nos estudos moleculares para descobrir os mecanismos da interação entre hospedeiro e parasita e propiciar no futuro as informações necessárias para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (FOSTER; ELSHEIKHA, 2012).

2.4.5 Homeopatia

A homeopatia se fundamenta em princípios diferentes da medicina convencional, via o princípio de cura pela similitude, por meio de substâncias previamente experimentadas em indivíduos sadios, em doses diluídas centenas e as vezes milhares de vezes (SILVA *et al.*, 2007). Na prática, valoriza a individualidade do paciente, elegendo, dentre as milhares de substâncias experimentadas, aquela que cure a totalidade de sinais clínicos, empregando, para um mesmo tipo de doença, medicamentos distintos para cada indivíduo enfermo (TEIXEIRA, 2004). Apesar de recomendado nos sistemas orgânicos, sua eficiência ainda não tem sido demonstrada efetivamente. Grande parte dos trabalhos é baseada em observações e relatos de

casos, não constituindo provas suficientes para sustentar a eficiência da homeopatia (PINHEIRO, 2007). Alguns autores apresentam resultados positivos da sua aplicação (PISSERI *et al.*,2005; CASTILLO *et al.*,2011), ao passo que outros negam a sua eficácia (ROCHA; PACHECO; AMARANTE, 2006). Esta é uma área relativamente nova na pesquisa veterinária e que futuramente trará muitos resultados (COSTA-JÚNIOR; FURLONG, 2011).

2.5 FITOTERAPIA

A utilização de plantas com propriedades medicinais para a recuperação da saúde é uma prática generalizada, que foi sedimentando-se ao longo do tempo, sendo o resultado do acúmulo milenar de conhecimentos empíricos sobre a ação de diversos vegetais por inúmeros grupos étnicos (ALEXANDRE; GARCIA; SIMÕES, 2005a). Acredita-se que desde o tempo do homem Neanderthal, ocorre a utilização de diversas plantas com a finalidade terapêutica. No Brasil, a utilização de plantas medicinais já era tradicional no povo indígena, muito antes da colonização pelo homem europeu (LORENZI; MATOS, 2002). Comumente, essas informações eram guardadas pelo pajé e confiadas somente aos membros da tribo, pois eram um tesouro vital (SILVEIRA, 2007). Com a chegada dos colonizadores, começou uma enorme busca por riquezas de diversos tipos em nosso país, com isso os conhecimentos das ervas locais começaram a ser explorados (SANTOS, 2008).

Muitas plantas foram descobertas através do uso popular, sendo o seu uso descrito de geração para geração, disseminando assim o conhecimento para várias pessoas. O exercício da fitoterapia representa uma prática sociocultural da comunidade, que vem sendo aceita e ampliada para diversos outros locais, até chegar aos centros de pesquisas (SILVA, 2003). Segundo a OMS, 65 a 80% da população mundial, localizados principalmente nos países em desenvolvimento, confiam nos produtos a base de plantas medicinais no tratamento das enfermidades, ou utiliza a medicina alternativa na atenção primária à saúde (RAHMAN; SINGHAL, 2002).

Mas o que vem a ser a fitoterapia? É o tratamento de doenças com o uso de vegetais frescos, drogas vegetais ou, ainda, extratos vegetais preparados com estes

dois tipos de matérias primas (SILVA *et al.*, 2006). Já o fitoterápico é o medicamento obtido e elaborado exclusivamente a partir de matérias-primas vegetais ativas com finalidade curativa ou profilática com benefício para o usuário (RIBEIRO *et al.*, 2005).

O uso de medicamentos fitoterápicos é largamente utilizado no Brasil, sendo nosso país como um dos que mais utilizam essa metodologia (SILVA *et al.*, 2006). O Brasil é um país privilegiado para essa terapêutica, tendo em vista que abriga um quarto da flora mundial conhecida (MARINHO *et al.*, 2007). Nosso país possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies já catalogadas, sendo que desse total, apenas 8% foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES *et al.*, 2003). Mesmo possuindo um grande número de centros de pesquisas e a maior flora mundial, o Brasil não tem uma grande expressão no mercado mundial de fitoterápicos, perdendo até para países tecnologicamente menos desenvolvidos (MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011).

Devido essa grande importância e a pouca fiscalização do uso e produção o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), pelo Decreto 5.813, de 22 de junho de 2006. Então a Portaria Interministerial 2.960, de 9 de dezembro de 2008, aprovou o PNPMF e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Esta se constitui como parte fundamental das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como forma de recurso básico de transversalidade na criação de ações, as quais cabem a promoção de melhorias direta na qualidade de vida da comunidade (BRASIL, 2009). A PNPMF expressa decisões de caráter geral que delineando ações do governo para tornar mais prático e seguro o uso destes tipos de remédios (BRASIL, 2009).

As pessoas normalmente acreditam que a fitoterapia é uma alternativa terapêutica sem efeitos adversos e sem causar interações medicamentosas (ERNST *et al.*, 1995). O seu uso com pouco critério pode levar a interações indesejáveis entre fármacos e os componentes químicos presentes nos medicamentos fitoterápicos, podem causar alterações nas concentrações plasmáticas dos fármacos e, conseqüentemente, mudanças na eficácia e segurança ao indivíduo (IZZO; ERNST, 2001; ALEXANDRE; GARCIA; SIMÕES, 2005). O uso não criterioso dos medicamentos também pode levar a intoxicações, que variam de leve a médio risco, raramente fatais, pois os pacientes podem ser alérgicos a algum componente ou ainda possuem

alguma doença concomitante que impediria o uso de tal fármaco (ALEXANDRE; GARCIA; SIMÕES, 2005b).

Por isso, antes de começar a utilizar qualquer planta se deve fazer uma extensa pesquisa, abordando diversos pontos técnicos (EASTERBROOK *et al.*, 1991). É fundamental que qualquer passo na medicina seja baseado em evidências, buscando sempre as melhores ferramentas que permitam a busca explícita de critérios científicos, disponíveis para nortear as decisões médicas e farmacológicas (SIMÕES *et al.*, 1998). Existem diversos ensaios que podem ser realizados com o intuito de se coletar inúmeras informações sobre os metabólitos presentes nos extratos, suas propriedades e possíveis danos toxicológicos (PINTO, 2004).

2.5.1 Marcha fitoquímica

Sempre que se fala em medicamento fitoterápico, deve-se pensar que se precisa elucidar a sua composição, descobrir quais os compostos existentes e analisar sua função (MIGUEL; MIGUEL, 2004). A avaliação da composição química e suas prováveis atividades farmacológicas é um ponto chave para a produção desses medicamentos (FLORES *et al.*, 2008). Só então, com os resultados em mãos, poderá-se realizar exames *in vitro* e depois passar para a etapa *in vivo* (ROSSI; ARIAS; LOZANO, 2002).

Existem diversas metodologias a serem seguidas, para que se descubra os mais diversos compostos. Entretanto, se deve sempre buscar o conjunto de técnicas que mais se adéque a planta em questão e as condições laboratoriais encontradas (ENRIQUEZ FLORES *et al.*, 2008). Deve-se sempre balancear o custo benefício dos exames, não adianta ter os melhores protocolos descritos se não tiver todos os reagentes e condições necessárias para a sua realização (MUÑOZ; MONTES; WILKOMIRSKY, 2001). Independente da metodologia adotada, deve-se sempre buscar o maior número de resultados, pois quanto maior for o número de respostas adquiridas, melhor se poderá responder as perguntas que surgirão (BRUNETON, 2000).

Entre os compostos vegetais mais pesquisados estão: antocianinas, fenóis, flavonóides, catequinas, taninos, antraquinonas, proteínas, polissacarídeos, saponinas,

cumarinas, alcalóides, triterpenos, antocianidinas e alcalóides (BARBOSA, 2001). Isto se deve ao fato que os metabólitos anteriormente citados são os que possuem, geralmente, a maior importância farmacológica (MATOS, 1997).

2.5.2 Ensaio antioxidantes

Atualmente, diversas pesquisas têm demonstrado o papel dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, entre elas o declínio do sistema imune (ATOUI *et al.*, 2005). Os compostos antioxidantes estabilizam ou desativam os radicais livres antes que ataquem as células (ATOUI *et al.*, 2005), por meio retardatário ou inibitório da oxidação de substratos oxidáveis (MORAIS *et al.*, 2009). Logo, é de grande importância que os extratos fitoterápicos tenham uma boa atividade antioxidante, pois assim agiriam indiretamente melhorando a imunidade do animal.

Os testes mais utilizados para elucidar tal atividade é a redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH) e o ensaio do poder redutor (DORMAN; HILTUNEN, 2004), e em menor escala a captação do radical NO. O primeiro é baseado na redução do referido radical pela doação de hidrogênio radicalar até a sua estabilidade (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Já o segundo avalia a capacidade antioxidante das amostras em doar elétrons ou hidrogênio, reduzindo assim o Fe^{+3} para Fe^{+2} . (DUH, 1998). Na captação do radical óxido nítrico avalia-se a atividade antioxidante através da captura desse radical liberado do nitroprussiato de sódio, sendo que quanto maior a liberação mais intensa a coloração da amostra e maior a atividade antioxidante (MARCOCCI *et al.*, 1994; MAITRA *et al.*, 1995). Contudo existem outros métodos que também podem ser utilizados (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

2.5.3 Análise toxicológica

A fitoterapia é um recurso popular, onde o conhecimento é repassado em comunidades e muito utilizado na automedicação, o que pode gerar inúmeros riscos (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008). Muitas vezes há informação, mas elas carecem de embasamento laboratorial, gerando conclusões precárias (VEIGA-JUNIOR, 2008). Logo é necessário que sejam realizadas extensivas pesquisas a cerca desse tema para que os fitoterápicos possam ser comercializados de maneira segura (LORENZI; MATOS, 2002). Com isso, a pesquisa toxicológica é outra etapa para a validação científica desses medicamentos e estabelecer os limites de segurança para a sua utilização (SIMÕES *et al.*, 2003).

Existem diversos exames que podem ser realizados para verificar o potencial tóxicos de medicamentos fitoterápicos, alguns mais complexos e outros mais simples (SOARES *et al.*, 2006). Entre os estudos mais simples de serem realizados e com alta eficácia está o ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (PARRA *et al.*, 2001). Este teste possui alta confiabilidade para testar o efeito tóxico de extratos vegetais (MCLAUGLIN; CHANG; SMITH, 1991). De modo simplificado, a avaliação pode indicar a toxicidade usando a concentração letal média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação (NUNES *et al.*, 2008). São considerados tóxicos, quando os valores da CL₅₀ são menores do que 1000 µg/mL (MAYORGA *et al.*, 2010). Extratos com alta toxicidade possuem uma alta probabilidade de possuírem boa atividade inseticida (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006), ao passo que os com baixa toxicidade possuem propriedades desejáveis para utilização no controle de parasitas no ambiente (RUIZ *et al.*, 2005).

2.6 FITOTERAPIA EM MEDICINA VETERINÁRIA

A etnoveterinária é a ciência que engloba as opiniões e conhecimentos das práticas medicinais populares e tradicionais usadas visando o tratamento ou prevenção das enfermidades que acometem os animais (MATHIUSMUNDY; MCCORKLE, 1989).

A Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA) reconhece como alternativas terapêuticas válidas a acupuntura, homeopatia, massoterapia, medicina holística, terapia física e a fitoterapia (SCHWARTZ, 2000).

Vale a pena ressaltar que foi devido à observação do comportamento de animais, domesticados ou não, frente aos vegetais foi um dos principais procedimentos usados para a descoberta das virtudes medicinais de diversas espécies (DI STASI, 1996). A Fitoterapia foi muito usada no passado, de forma empírica, para o tratamento de numerosas doenças nos animais (BULLITTA; PILUZZA; VIEGI, 2007). Hoje em dia, ainda é uma prática utilizada tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos (NANYINGI et al., 2008). As principais aplicações estão voltadas para medicamentos com potencial anti-inflamatório, anti-bacteriano, anti-fúngico, diurético e anti-parasitário, (CAMPANINI, 2004).

Contudo, a pesquisa com fundamentação científica na área dos fitoterápicos em medicina veterinária demorou um pouco a ser iniciada (MARTIN; McCORKLE, MATHIAS, 2001). Essa prática começou a ser estudada mais seriamente, nos anos 90 quando se começou a pensar muito nas desvantagens e perigos dos avanços tecnológicos, sem precedentes e que causaram desequilíbrio ecológico e ambiental (JIRLI, 1997). Nessa época existia inúmeros estudos em medicina, contudo em medicina veterinária os estudos estavam nas suas fases iniciais (BIZIMANA, 1997).

Apesar dos esforços por parte dos difusores da técnica, a fitoterapia ainda não é uma ciência conhecida e utilizada por todos. Almeida et al. (2006) constataram em sua pesquisa que 73,9% dos estudantes de medicina veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UNIFERSA) entrevistados, conhecem a fitoterapia e apenas 36,2% usaram esta forma de terapêutica com resultado eficaz. Nesta mesma pesquisa, foi visto que 20% dos entrevistados usaram fitoterápicos para tratar problemas de cicatrização, 17,4% para parasitoses e 13% para traumatismos.

Em entrevista realizada com produtores de animais, localizados no município de Patos-PB, as finalidades mais citadas da utilização desses fármacos são para problemas parasitários, seguido de dermatites, distúrbios gastrintestinais e problemas no parto (MARINHO *et al.*, 2007). Todos os entrevistados, disseram que utilizariam fitoterápicos, desde que fossem comprovadas cientificamente suas finalidades terapêuticas. No Brasil, cerca de 20% de nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis no mercado, os outros 80% consome o restante e encontra

nos produtos de origem natural especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1996).

Em pesquisa realizada com pecuaristas no Uruguai, em 57,1% dos casos, os entrevistados disseram que se informaram sobre o uso de certas plantas por meio dos saberes da comunidade, ao passo que 42,9% adquiriram os conhecimentos pesquisando na literatura (GROSSO, 2010). Na mesma enquete, 33,3% dos entrevistados disseram que os fitoterápicos foram sugeridos por médicos veterinários. No Uruguai, esse ramo da medicina é mais utilizado para tratar problemas parasitários, seguido de afecções cutâneas (GROSSO, 2010).

2.6.1 Fitoterapia em parasitologia veterinária

Os estudos utilizando extratos vegetais para o controle parasitário cresceram muito a partir dos anos 90, tanto no Brasil como em outros países, principalmente devido às poucas alternativas de produtos anti-helmínticos disponíveis, especialmente em locais que desenvolveram a resistência parasitária (CHAGAS, 2004). Entre as possíveis soluções a este problema, a fitoterapia se consolidou como uma das formas mais viáveis de serem usadas, por possuir potencial de ser altamente eficaz, tem a vantagem de não contaminar a carne e o meio ambiente (BIANCHIN; CATTO, 2004). O uso de plantas ou derivados pode representar uma alternativa ecologicamente viável, contribuindo inclusive para o aumento da lucratividade pecuária, uma vez que reduz o uso de anti-helmínticos convencionais, além de estender a vida útil dos produtos químicos disponíveis (VIEIRA *et al.*, 1999). Outra vantagem, é que são de fácil acesso e obtenção por parte dos produtores em farmácias de manipulação e ainda apresentam baixo custo para sua fabricação (OLIVO *et al.*, 2009).

Entretanto, ainda se faz necessária a validação científica dos fitoterápicos, uma etapa inicial obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos (KRYCHAK-FURTADO *et al.*, 2005). Os testes *in vitro* permitem uma avaliação da existência de propriedades anti-helmínticas nos extratos vegetais, constituindo desta maneira, uma etapa preliminar à caracterização dos possíveis compostos ativos presentes nos vegetais, possibilitando a criação de novas alternativas

para o controle das parasitoses (COSTA *et al.*, 2002). A importância de se utilizar testes *in vivo* reside na necessidade de avaliação do comportamento *in situ* do bio-material que será testado (CARVALHO *et al.*, 2010). Somente através de testes comprobatórios *in vitro* ou *in vivo*, pode-se afirmar a atividade farmacológica de uma espécie vegetal (FURTADO, 2006).

Diversas plantas com suposta ação anti-helmínticas têm sido investigadas e estudadas detalhadamente, para verificar se tal atividade acontece realmente e quais são os mecanismos responsáveis por ela (SANTOS *et al.*, 2012). Entre estas plantas se destaca a *A. annua*, muito utilizada na medicina tradicional chinesa e com diversas finalidades terapêuticas (KHANUJA *et al.*, 2008). O tópico seguinte irá detalhar melhor este vegetal.

2.7 ARTEMISIA ANNUA

A *Artemisia annua* (Figura 1) é uma planta herbácea pertencente à família *Asteraceae* (Compositae), sendo esta a maior e mais dispersa do reino vegetal, compreendendo aproximadamente 23.000 espécies e mais de 1.500 gêneros (SCHIMIDT, 1999). Originária da província de Sichuan, na China, é utilizada a mais de 2.000 anos para o tratamento de desinteria, febre, hemorróidas e malária (BONATTI *et al.*, 2011). Devido a melhorias genéticas, atualmente existem variedades que chegam a mais de 3 metros de altura (SCARCELLA; GRASSI; MASTRORILLI, 2011). Produz folhas simples e alternadas de coloração amarelo-esverdeadas e contendo inúmeras pequenas flores, com no máximo 3 mm (MANNAN *et al.*, 2010). Sua reprodução pode ser realizada por sementeira, por meio de técnicas laboratoriais e por propagação natural (ALEJOS-GONZALEZ *et al.*, 2011).



FIGURA 1 – PLANTAÇÃO DE *ARTEMISIA ANNUA*, CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS (CPQBA) - UNICAMP, 2012.

Na década de 1970 foi levada para diversos países como Argentina, Bulgária, França, Hungria, Romênia, Itália, Espanha e Estados Unidos (AL-QURAINY; KHAN, 2010). Contudo, só chegou ao Brasil em 1987, por pesquisadores pertencentes ao CPQBA/UNICAMP, que importaram sementes provenientes da Europa e China (MAGALHÃES, 1996). Desde então, começou um trabalho por meio de seleção dos melhores fenótipos e pelas constituições genotípicas (MAGIERO, 2012).

Essa planta produz uma série de metabólitos secundários, entre eles, cumarinas, compostos fenólicos (entre eles os taninos e flavonóides), terpenos (monoterpenos, triterpenos e principalmente os sesquiterpenos) e vários outros (BRISIBE et al., 2009). As cumarinas e seus derivados possuem algumas propriedades farmacológicas interessantes, como anticoagulante, anti-inflamatório e anticancerígena (MANJUNATHA et al., 2011).

Os compostos fenólicos compreendem um grande grupo de compostos ativos, sendo que, de modo geral, sua ação ocorre principalmente devido ao seu alto potencial de atividade antioxidante (POURMORAD; HOSSEINIMEHR; SHAHABIMAJD, 2009).

Isso faz com que reduzam os radicais livres no organismo, diminuindo as injúrias celulares (THITILERTDECHA *et al.*, 2010). Os radicais livres estão associados a mutação do DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica; o que contribui para o desenvolvimento de aterosclerose, câncer, diabetes, envelhecimento celular e processos inflamatórios (SILVA; FERRARI, 2011; PEREIRA; PEREIRA, 2012). Logo uma planta com elevada ação antioxidante é desejável na formulação de fármacos que visem a cura de enfermidades nos pacientes (GRASSI-ZAMPIERON; VIEIRA; SIQUEIRA, 2009; PESSUTO *et al.*, 2009). A *A. annua* possui uma dos maiores potenciais antioxidantes conhecidas do reino vegetal (FERREIRA; ZHELJAZKOV; GONZALEZ, 2013), logo o seu consumo pode promover uma melhora no sistema imune do animal (ÁVAR *et al.*, 2012).

Plantas com altas concentrações de taninos e flavonóides estão sendo muito estudadas para curar doenças parasitárias (WATERMAN *et al.*, 2010; AZANDO *et al.*, 2011). Plantas ricas em taninos destacam-se por seu potencial antiparasitário (SHABTAY *et al.*, 2008). Sua ação se deve a melhora do sistema imune e pela redução metabólica do parasita, ligando-se aos nutrientes e indisponibilizando-os (HOSTE *et al.*, 2006; MAKKAR *et al.*, 2006). Nas plantas, os flavonóides têm diferentes funções como coloração de flores e frutas, fixação de nitrogênio, proteção contra os raios UV, e para defesa frente a patógenos e insetos (FRIEDMAN, 2007; BUER; INIM; DJORDJEVIC, 2010). Seu mecanismo de ação frente aos parasitas e outros patógenos, normalmente ocorre devido ao fato que este composto ser o maior responsável pela atividade antioxidante da planta (LAKSHIMI *et al.*, 2010).

Contudo, é para a artemisinina que as pesquisas estão mais voltadas, pois é o principal biocomposto considerado responsável pelas atividades farmacológicas da planta (PIEPADE, 2012). Também chamada de qinghaosu, é uma lactona sesquiterpênica contendo uma ligação peróxido (TU, 2011). O mecanismo de ação para malária, sua mais famosa utilização, ocorre devido ao grupo heme, libertado pela digestão da hemoglobina pelo parasita e colocado para reagir com a ponte endoperóxido, quebrando as ligações de oxigênio, fazendo com que a produção de radicais livres danifiquem o parasita (KRISHNA *et al.*, 2008). A artemisinina também pode destruir proteínas do parasita, embora o alvo molecular específico ainda não tenha sido descoberto (O'NEILL, BARTON, WARD; 2010). Para *Eimeria* sp., acredita-se que ocorra uma interferência no sistema reprodutivo do protozoário (ARAB *et al.*, 2006)

e também uma redução na capacidade dos oocistos de serem eliminados pelo hospedeiro, esporular ou sobreviver no ambiente (DEL CACHO *et al.*,2010). Em NGI de pequenos ruminantes, é responsável pela diminuição da ovopostura das fêmeas (TARIQ *et al.*, 2009). Contudo, para estas doenças e também para as outras, as verdadeiras vias de ação não estão ainda bem esclarecidas (O'NEILL, BARTON, WARD; 2010).

Há indícios de que o mecanismo geral da ação do gênero *Artemisia*, ocorra devido ao seu potencial antioxidante e ainda pelo sinergismo entre os compostos presentes na mesma, o que potencializaria suas propriedades farmacológicas (BLANKE *et al.*, 2008). Logo, buscando uma melhor eficácia dos extratos produzidos a partir da *A. annua*, se deve buscar a maior concentração dos principais metabólitos, mas evitar trabalhar com eles de forma isolada. Esse vegetal também age de maneira indireta, melhorando o balanço nutricional de animais com deficiências alimentares, uma vez que possui cerca de 20 a 24% de proteína bruta (em % com base na MS), aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (BRISIBE *et al.*, 2008). Esses nutrientes adicionais junto a alguns compostos da planta acabam melhorando o sistema imunológico do animal, auxiliando ainda mais no combate aos parasitas (BRISIBE *et al.*, 2010).

Além das utilizações já citadas anteriormente, em diversos locais do mundo a planta é usada no tratamento, em humanos, de enfermidades como hepatite, hipertensão, icterícia, inflamações e infecções fúngicas, bacterianas e virais (RUSTAIYAN; MASOUDI, 2011). Também existem estudos, comprovando seu efeito em condições experimentais para o câncer (ZHENG, 2007; EFFERTH *et al.*, 2011) e úlceras (DIAS *et al.*, 2001). No campo da parasitologia, os extratos produzidos a partir da *A. annua* já tiveram sua eficácia comprovada frente a diversos parasitas, como: *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* e *Opisthorchis viverrini* (KEISER; UTZINGER, 2007); *Schistosoma japonicum* e *S. mansoni* (UTZINGER *et al.*, 2000; UTZINGER *et al.*, 2007); *S. haematobium* (XIAO *et al.*, 2004); *Cryptosporidium* sp., *Giardia intestinalis* e *Entamoeba histolytica* (BRISIBE *et al.*, 2010); *Leishmania* sp. (MENON *et al.*, 2006), *Trypanosoma* sp. (MISHINA *et al.*, 2007); *Babesia equi* (NAGAI *et al.*, 2003) e *Neospora caninum* (KIM *et al.*, 2002).

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao modo inadequado que os anti-helmínticos têm sido utilizados nos últimos anos na caprinocultura e aliada a falta de novos princípios ativos no mercado, faz com que o modelo usual de controle parasitário esteja defasado.

Os métodos alternativos de controle são uma solução extremamente viável a ser aplicada. Contudo, grande parte das técnicas precisa ser estudada com maior detalhamento para que possam ser definitivamente e seguramente aplicadas no campo.

A fitoterapia é um ramo que vem sendo exaustivamente pesquisado e inúmeros resultados encorajadores vêm sendo demonstrados. *Artemisia annua* é uma planta que possui diversos compostos com finalidades farmacológicas interessantes. Apesar de ainda estar no início das pesquisas frente a nematódeos gastrintestinais de caprinos. Acredita-se que essa planta é uma forte candidata a ser um fitoterápico com propriedades antiparasitárias eficazes.

REFERÊNCIAS

ADDAH, W.; YAKUBU, A. P. Comparative study of the effects of gastrointestinal parasites on differential leukocyte profile of Djallonke Sheep kept under extensive and semi-intensive management system in Northern Ghana. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2009.

AHID, S.M.M.; SUASSUNA, A.C.D.; MAIA, M.B.; COSTA, V. M. D. M.; SOARES, H. S. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.212-218, 2008.

ALEJOS-GONZALEZ, F.; QU, G.; ZHOU, L. L.; SARAVITZ, C. H.; SHURTLEFF, J. L.; XIE, D. Y. Characterization of development and artemisinin biosynthesis in self-pollinated *Artemisia annua* plants. **Planta**, v. 234, n. 4, p. 685-697, 2011.

ALEXANDRE, R. F. A.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 2. Medicamentos fitoterápicos elaborados com alcachofra, castanha-daíndia, ginseng e maracujá. **Acta Farma Bonaerense**, v. 24, p. 310-314, 2005b.

ALEXANDRE, R. F. A.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 1. Medicamentos fitoterápicos elaborados com ginkgo, hipérico, kava e valeriana. **Acta Farma Bonaerense**, v.24, p. 300-309, 2005a.

ALMEIDA F. A. **Caracterização da resistência a anti-helmínticos de isolados de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* oriundos de ovinos**. 63f. [Dissertação]. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu – São Paulo, 2009.

ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F. L. C.; PEREIRA, T. F. C. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro profissional veterinário. **Revista Verde**, v. 1, n. 1, p. 67-74, 2006.

ALMEIDA, L. R.; CASTRO, A. A.; SILVA, F. J. M.; FONSECA, A. H. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes, na estação seca da baixada fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 89-94, 2005.

AL-QURAINY, F.; KHAN, S. Mutational approach for enhancement of artemisinin in *Artemisia annua*. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 473, 2010.

AMARANTE, A.F.T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl.1, p.68-71, 2004.

ANZIANI, O. S.; CAFFE, G.; CERVILLA, N.; LITTERIO, N. J.; AGUILAR, S.; BOGGIO, J. C. Prevalencia de la resistencia antihelmíntica en Nematodos gastrointestinales de los caprinos en el norte de la provincia de Córdoba, Argentina. In: Congreso Argentino de Producción Animal, 32., Malargüe-ARG. **Anais...** Malargüe, 2009, p. 14-16.

ARAB, H. A.; RAHBARI, S.; RASSOULI, A.; MOSLEMI, M. H.; KHOSRAVIRAD, F. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. **Tropical animal health and production**, v. 38, n. 6, p.497-503, 2006.

ARAÚJO SANTOS, F. G.; ZAMORA, L. M.; RIBEIRO, V. M. F. Controle de parasitas intestinais de capivaras (*hydrochaerus hydrachaeis*) criadas em sistema semi-extensivo, no município de Senador Guimard Santos, Acre. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n.4, p. 393-398, 2012.

ARUNKUMAR, S.; BASITH, S. A.; GOMATHINAYAGAM, S. A comparative analysis on serum antibody levels of sheep immunized with crude and thiol-purified excretory/secretory antigen of *Haemonchus contortus*. **Veterinary World**, v. 5, n. 5, p. 279-284, 2012.

ASSIS, R. C. L.; LUNS, F. D.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R. Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 373-377, 2012.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

AZANDO, E. V. B.; HOUNZANGBÉ-ADOTÉ, M. S.; OLOUNLADÉ, P. A.; BRUNET, S.; FABRE, N.; VALENTIN, A.; HOSTE, H. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, p. 292-297, 2011.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, v. 4, p. 12-18, 2001.

BARRETO, H. F. M.; SOARES, J. P. G.; MORAIS, D. A. E. F.; SILVA, A. C. C.; SALMAN, A. K. D. Impactos ambientais do manejo agroecológico da caatinga no Rio Grande do Norte. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.45, n. 10, p. 1073-108, 2010.

BARRETO, M. A.; ALMEIDA, M. A. O.; SILVA, A.; REBOUÇAS, I.; MENDONÇA, L. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no estado da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado, 2002.

BERTONE, M.; GREEN, J.; WASHBURN, S.; POORE, M.; SORENSON, C., WATSON, D. W. Seasonal activity and species composition of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Geotrupidae) inhabiting cattle pastures in North Carolina. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n.3, p. 309-321, 2005.

BIANCHIN, I.; CATTO, J. B. Alho desidratado (*Allium sativum* L.) no controle de nematódeos gastrintestinais em bovinos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1267-1270, 2004.

BISHOP, S.C.; MORRIS, C.A. Genetic of disease resistance in sheep and goats, **Small Ruminants Research.**, v. 70 , p. 48–59, 2007

BIZIMANA, N. Scientific evidence of efficacy of medicinal plants for animal treatment. In: Ethno veterinary Medicine: Alternatives for Livestock Development, Proceedings of an International Conference held in Pune, 2., 1997, Pune. **Anais...** Pune, 1997. p. 11-12.

BLANKE, C. H.; NAISABHA, G. B.; BALEMA, M. B.; MBARUKU, G. M.; HEIDE, L.; MÜLLER, M. S. Herba *Artemisiae annua* and tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double-blind clinical trial. **Tropical doctor**, v. 38, n. 2, p. 113-116, 2008.

BONATI, M., SEVERINO, F.; BAGNATI, R., CARRÀ, A.; FANELLI, R. Millet-porridge with *Artemisia annua* as first aid for African children with malaria. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 4, p. 371-373, 2011.

BRAGA, F. R.; CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; LIMA, W. S.; TAVELA, A. O.; FERREIRA, S. R. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. **Journal of helminthology**, v. 83, n. 4, p. 303, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 125p.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P. M.; FERREIRA, J. F.; LUTHRIA, D.; WU, X.; PRIOR, R. L. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1240-1246, 2009.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; OWAI, P. U.; BRISIBE, F. Dietary inclusion of dried *Artemisia annua* leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 22, 2010.

BRUNETON, J. Farmacognosia. **Fitoquímica de plantas medicinales**. 2 ed. Madri: Acribia S.A., 2000. p. 673-6.

BUER, C.S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC; M.A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integral Plant Biology**, v. 52, p. 98–111, 2010.

BULLITTA S., PILUZZA G.; VIEGI L. Plant resources used for traditional ethnoveterinary phytotherapy in Sardinia (Italy). **Genetic Resources and Crop**, n. 54, p. 1447-1464, 2007.

BURKE, J. M.; TERRILL, T. H.; KALLU, R. R.; MILLER, J. E.; MOSJIDIS, J. Use of copper oxide wire particles to control gastrointestinal nematodes in goats, **Journal Animal Science**, n. 85, p. 2753–2761, 2007.

BUZATTI, A.; SANTOS, C. P.; YOSHITANI, U. Y.; SPRENGER, L. K.; KLOSTER, F.; ANTUNES, J. D.; MOLENTO, M. B. Biological control using the fungi *Duddingtonia flagrans* against cyathostomins of horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 10, p. 31, 2012.

CABARET, J.; Bouilhol, M.; Mage, C. Managing helminths of ruminants in organic farming. **Veterinary Research**, v.33, p.625-640, 2002.

CAMPANINI, E. **Dizionario di Fitoterapia e Piante Medicinali**. 2 ed. Tecniche Nuove, 2004.

CARVALHO, A. C. A.; PEREIRA, E. S. C.; COSTA, C.; BARRETO, I. C.; MADUREIRA, L. C. PAIM, F. R. Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. n. 9, supl. 1, p. 20-27, 2010.

CASTILLO, R.; BARRERAS, F.; GONZÁLEZ, I.; VEGA, J. Terapêutica Homeopática en el parasitismo gastrointestinal de terneros estabulados. **Revista Avanzada Científica**, v. 2, n. 2, 2011.

CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Efeito de sistema de pastejo e de espécies forrageiras na contaminação da pastagem e no parasitismo por nematóides gastrintestinais em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 343-353, 2007.

CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; SANTURIO, J. M.; FEIJÓ, G. L. D.; KICHEL, A. N.; SILVA, J. M. Sistema de pastejo, rotenona e controle de parasitas: efeito sobre o ganho de peso e níveis de parasitismo em bovinos cruzados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 37-43, 2009.

CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; TORRES JUNIOR, R. A. Efeitos da everminação de matrizes e de bezerros lactentes em sistema de produção de bovinos de corte na região de Cerrado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 188-19, 2005.

ČAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M.; VIDIC, D.; PARIĆ, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. **Industrial Crops and Products**, v.37, n. 1, p. 479-485, 2012.

CHAGAS, A. C. S. Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. Disponível em: <http://www.http://cniia.inta.gov.ar>. Acessado em: 13 de novembro de 2012.

CHARLES T. P. ; POMPEU J. ; MIRANDA D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 71-75, 1989.

CHARLES, T. P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode in-fectios of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 71-75, 1989.

COELHO, W. A. C.; AHID S. M. M.; VIEIRA L. S.; FONSECA Z. A. A.; SILVA I.P. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 589-599, 2010.

CONDER, G. A.; CAMPBELL, W. C. Chemoterapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**, v.35, p.1-83, 1995.

COSTA JÚNIOR, G. D. S.; MENDONÇA, I. L. D.; CAMPELO, J. E. G.; CAVALCANTE, R. R.; DANTAS FILHO, L. A.; NASCIMENTO, I. M. R. D.; ALMEIDA, E. C. R.; CHAVES, R. D. M. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 279-286, 2006.

COSTA, C. T. C; DE MORAES, S. M.; BEVILAQUA, C. M. I; DE SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.2, p.57-60, 2002.

COSTA, K. M. F. M.; AHID, S. M. M.; VIEIRA, L. S.; VALE A. M.; SOTO-BLANCO, B. Efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos infectados com nematódeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1075-1082, 2011.

COSTA, N.C.; ARAÚJO, R.L.D.; FREITAS, G.B.L.D. Homeopatia: Um Campo Terapêutico Fundamental não Cuidado Veterinário de Animais de Produção. **Revista Salus**, v. 3, n. 2, p. 73-89, 2011.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; FURLONG, J. Efficiency of sulphur in garlic extract and non - sulphur homeopathy in the control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n.1, p.7-11, 2011.

DEL CACHO, E.; GALLEGRO, M.; FRANCESCH, M.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Efeito da artemisinina em oocisto a formação da parede e esporulação durante *Eimeria tenella* infecção. **Parasitology Internacional**, v. 4, p. 506-511, 2010.

DE VRIES, J. Goats for the poor: Some keys to succesful promotion of goat production among the poor. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 221-224, 2008.

DI STASI, L. C. Arte, ciência e magia. In: DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. Cap.1, p.15-21.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230p.

DIAS, P. C.; FOGGIO, M. A.; POSSENTI, A.; NOGUEIRA, C. F. D.; CARVALHO, E. J.. Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 670-675, 2001.

DOMKE, A. V. M.; CHARTIER, C.; GJERDE, B.; HÖGLUND, J.; LEINE, N.; VATN, S.; STUEN, S. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. **Parasitology Research**, v. 111, p.185–193, 2012.

DORMAN, H. J.; HILTUNEN, R. Fe(II) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. **Food Chemistry**, v. 88, n.2, p. 193–199, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação d bis atividade antioxidante utilizando Sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUH, P. D. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 4, p. 455-461, 1998.

EASTERBROOK, P.J.; BERLIN, J.A.; GOPALAN, R.; MATTEWS, D.R. **Lancet**. v. 337, p. 867-72, 1991.

EFFERTH, T.; HERRMANN, F.; TAHRANI, A.; WINK, M. Cytotoxic activity of secondary metabolites derived from *Artemisia annua* L. towards cancer cells in comparison to its designated active constituent artemisinin. **Phytomedicine**, v. 18, n. 11, p. 959-969, 2011.

ENO, H; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico de helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143p.

ENRIQUEZ FLORES, A. M.; PRIETO VELA, E. P.; RIOS MARTINEZ, E.; Ruiz Reyes, S. G. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú. **Revista de Medicina Vallejana**, vol.5, n.1, p.50-64, 2008.

EPE, C.; HOLST, C.; KOOPMANN, R.; SCHNIEDER, T.; LARSEN, M.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 86-90, 2009.

ERNST, E.; WILLOUGHBY, M.; WEIHMAYR, T. H. Nine possible reasons for choosing complementary medicine. **Perfusion**. v. 8, p. 356-358, 1995.

FALBO, M.K.; SANDINI, I.E.; ISHIY, H.M.; FÁVARO, J. L.; DOS SANTOS, C. E.; BASTOS, S.; GUZZO, D. Atividade anti-helmíntica do fruto de *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29 , n. 4, p.881-886, 2008.

FALBO, M. K.; SOCCOL, V. T.; SANDINI, I. E.; NEUMANN, M.; ISHIY, T. M. Atividade anti-helmíntica do triclorfom e closantel em cordeiros naturalmente infectados por *Haemonchus*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 926-930, 2009.

FERNANDES, L.H., SENO, M.C.Z., AMARANTE, A .F.T., SOUZA, H., BELUZZO, C.E.C. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p.733- 740, 2004.

FERNANDEZ, A. S.; HENNINGSEN, E.; LARSEN, M.; NANSEN, R.; GRØNVOLD, J.; SØNDERGAARD, J. A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* as biological control agent against free - living larvae of horse strongyles. **Equine veterinary journal**, v. 31, n. 6, p. 488-491, 2010.

FERREIRA, J. F.; ZHELJAZKOV, V. D.; GONZALEZ, J. M. Artemisinin concentration and antioxidant capacity of *Artemisia annua* distillation byproduct. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 294-298, 2013.

FLORES, W.; FUENTES, R.; GALINDO, D.; GONZÁLES, F.; HERNÁNDEZ, G.; HERNÁNDEZ, K.; HIDALGO, I.; ZAMUDIO DEL CARPIO, D.; CASTAÑEDA, B.; IBÁÑEZ, L.; LARREA, Evaluación de los efectos antioxidante, antibacteriano y

antifúngico de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Lagarto caspi). **Revista Horizonte Médico Volumen**, v. 8(, n. 2, p. 7-16, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, FAOSTAT – FAO Statistics Division/ProdSTAT: livestock (primary and processed). 2011.

FOOD and agriculture organization of the united nations, FAOSTAT. Food and agriculture commodities. FAO/UN Report. 2006.

FOSTER, N.; ELSHEIKHA, H. M. The immune response to parasitic helminths of veterinary importance and its potential manipulation for future vaccine control strategies. **Parasitology research**, v. 110, n. 5, p. 1587-1599, 2012.

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular in Nutricional Food Research**, v. 51, p. 116–134, 2007.

FURTADO, S. K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2006, 125p.

GOUVEIA, A. M. G.; GUIMARÃES, A. S.; HADDAD, J. P. A. [2009]. Características zoonosológicas da ovinocultura em Minas Gerais. In: Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais, 2009.

GRANT, W. Population genetics and drug resistance in nematode parasites. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 410, 2001.

GRASSI-ZAMPIERON, R. F.; VIEIRA, M. C.; SIQUEIRA, J. M. D. Atividade antioxidante e captora de radicais livres dos extratos de *Achyrocline alata* (Kunth.) DC. em comparação com extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 572-576, 2009.

GROSSO, L.; QUADERNI, I. **El uso popular de las plantas medicinales en Uruguay la experiencia de los pequeños productores agroecológicos**. n. 6. Montevideú, ZooBioDi, 2010.

HALL C.A.; RITCHEL L.; MCDONELL P. A. Investigation for anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes from goats. **Research Veterinary Science**. v. 31, n. 1, p. 116- 119, 1981.

HAMMERSCHMIDT, J.; BIER, D.; FORTES, F. S.; WARZENSAKY, P.; BAINY, A. M.; MACEDO, A. A. S.; MOLENTO, M. B. Avaliação do sistema integrado de controle parasitário em uma criação semi-intensiva de caprinos na região de Santa Catarina; Evaluation of the integrated parasite control in a semi-intensive goat farming in the region of Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 927-934, 2012.

HAN, K.; XU, L., YAN, R.; SONG, X.; LI, X. Vaccination of goats with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase DNA vaccine induced partial protection against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2012.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world, **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 144-154, 2011.

HOWELL, S.B.; BURKE, J. M. ; MILLER, J. E. ; TERRILL, T. H.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L.H.; ZAJAC, A. M.; KAPLAN, R. M. Anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States, **Journal of the American Veterinary Medical Association** , n. 233, p.1913–1919, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Rebanho ovino, Curitiba, 2009 - Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em: 18 dezembro de 2012.

IZZO, A. A.; ERNST, E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. **Drugs**, v. 61, p. 2163-2175, 2001.

JABBAR, A.; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.N.; AFAQ, M. Anthelmintic resistance: the state of play revisited **Life Sciences**, n. 79 , p. 2413–2431, 2006.

JIRLI, B. Cognitive domain and acceptance of ethnoveterinary medicina by animal scientists. In: INTERNATIONAL CONFERENCE HELD IN PUNE. 1997, Pune, **ANAIS...** India, 1997.

KAPLAN, R. M. ; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance, **Veterinary Parasitology**, n. 186, p. 70–78, 2012.

KERBOUEF D.; HUBERT J. Benzimidazole resistance of field strains of nematodes from goats in France. **Veterinary Records**, v. 116, n. 5, p.133, 1985.

KETTLE P.R.; VLASSOFF A.; REID T.C.; HORTON C.T. A survey of nematode control of measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 31, n. 8, p.139-143, 1983.

KIM, J.T.; PARK, J.Y.; SEO, H.S.; OH, H.G.; NOH, J.W.; KIM, J.H; KIM, D.Y.; YOUN, H.J. In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 53-63, 2002.

KRISHNA, S.; BUSTAMANTE, L.; HAYNES, R. K.; STAINES, H. M. Artemisinins: their growing importance in medicine. **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n.10, p. 520-527,2008.

KRYCHAK-FURTADO, S.; NEGRELLE, R. B; MIGUEL, O. G.; ZANIOLO, S. R.; KAPRONEZAI, J.; RAMOS, S. J.; SOTELLO, A. Efeito de *Carica papaya* L. (Caricaceae) e *Musa paradisiaca* Linn. (Musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 191-197, 2005.

KUMSA, B.; ABEBE, G. Multiple anthelmintic resistances on a goat farm in Hawassa. **Tropical Animal Health and Production**, n. 41, p. 655–662, 2009.

LAKSHMI, V.; JOSEPH, S. K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, S. K.; SAHOO, M. K.; DUBE, V.; MURTHY, P. K. Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoids tested against *Brugia malayi*. **Acta tropical**, v. 116, n. 2, p. 127-133, 2010.

LEITE, E. R.; VASCONCELOS, V.R. Estratégias de alimentação de caprinos e ovinos em pastejo no Nordeste do Brasil. In : SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1., 2000, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2000. p. 71-80.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 158-163, 2006.

LIMA M. M.; FARIAS M. P. O.; ROMEIRO E. T.; FERREIRA D. R. A.; ALVES L.C.; FAUSTINO M.A.G. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 94-100, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, São Paulo, 2002.

MAGALHÃES, P. M. **Seleção, Melhoramento, e Nutrição da *Artemisia annua* L. para cultivo em região intertropical**. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1996, 117p.

MAGIERO, C. E. **Fisiologia da floração e atividade alelopática de *Artemisia annua* L. cultivar *Artemis* cultivada em clima subtropical úmido**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Pato Branco, 2012, 55p.

MAITRA, I.; MARCOCCI, L.; DROY-LEFAIX, M. T.; PACKER, L. Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. **Biochemical pharmacology**, v. 49, n. 11, p. 1649-1655, 1995.

MANJUNATHA, M.; NAIK, V. H., KULKARNI, A. D.; PATIL, S. A. DNA cleavage, antimicrobial, anti-inflammatory anthelmintic activities, and spectroscopic studies of Co (II), Ni (II), and Cu (II) complexes of biologically potential coumarin Schiff bases. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 64, n. 24, p. 4264-4275, 2011.

MANNAN, A., AHMED, I., ARSHAD, W., ASIM, M. F., QURESHI, R. A., HUSSAIN, I., MIRZA, B. Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 310, 2010.

MARCOCCI, L.; MAGUIRE, J. J.; DROY-LEFAIX, M. T.; PACKER, L.. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 201, p. 748-755, 1994.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007.

MARTIN, M.; McCORKLE, C.; MATHIAS, E. **Ethnoveterinary medicine. An annotated Bibliography of Community Animal Healthcare**. London: ITDG Publishing, 2001.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza. Ed. UFC, 1997.

MATTOS, M. J. T.; OLIVEIRA, C. M. B.; GOUVEA, A. S.; AN-DRADE, C. B. Sensibilidade dos nematodeos gastrintestinais de caprinos ao ivermectin na região da Grande Porto Alegre, RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 3, p. 155-160, 2003.

MAYORGA, P.; PÉREZ, K. R.; CRUZ, S.M.; CÁCERES, A. Comparação de bioensaios utilizando o anostracan crustáceos *Artemia salina* e *platyurus Thamnocephalus* para a planta de triagem toxicidade extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.

MCGREGOR B. A.; ADOLPH A. J.; CAMPBELL, N.J. Occurrence of anthelmintic resistance in goats in Victoria. In: 13th Biennial Conference **Production Australian Animal Production**, 1980, Austrália. **Anais...** Austrália, 1980, p. 159.

MELO A. C. F. L.; BEVILAQUA C. M. L.; REIS I.F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**. v. 10, n. 1, p.294-300, 2009.

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

MENON, R. B.; KANNOTH, M. M.; TEKWANI, B. L.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; AVERY, M. A. A new library of C-16 modified artemisinin analogs and evaluation of their anti-parasitic activities. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 9, n. 10, p. 729-741, 2006.

MEXIA, A. A.; DE MACEDO, F. D. A. F.; DE OLIVEIRA, C. A. L.; ZUNDT, M.; YAMAMOTO, S. M.; SANTELLO; SASA, A. Susceptibilidade a nematóides em ovelhas Santa Inês, Bergamácia e Texel no Noroeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1921-1928, 2011.

MIR, R. A. M. Z.; CHISHTI, M. A.; ZARGER, H.; TAK; DAR, F. A.. Seasonal prevalence of trematode parasites of sheep (*Ovis aries* L.) in Kashmir Valley, India. **Nigerian Journal of Parasitology** v. 29, n. 2, p. 80-83, 2008.

MIRANDA, C.H.BB.; SANTOS, J.C.C.; BIANCHIN, I. Contribuição de *Onthophagus gazella* à melhoria da fertilidade do solo pelo enterrio de massa fecal bovina fresca. I. Estudo em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 4, p. 681-685, 1998.

MOLENTO M.B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, sup. 1, p.82-87, 2004.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 82–87, 2004.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária dos helmintos de eqüídeos e Propostas de Manejo. **Ciência Rural** , v. 35, n. 6, p. 1469-1477, 2005.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices, **Veterinary Parasitology**, n. 163, p. 229–234, 2009.

MORAES, L. G.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 77-99, jan./jun. 2011

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MUÑOZ, O.; MONTES, M.; WILKOMIRSKY, T. Plantas **Medicinales de Uso en Chile: Química y Farmacología**. 1 ed. Ed. Universal. Chile, p. 15–16, 2001.

NAGAI, A.; YOKOYAMA, N.; MATSUO, T.; BORK, S.; HIRATA, H.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Growth-inhibitory effects of artesunate, pyrimethamine, and pamaquine against *Babesia equi* and *Babesia caballi* in *in vitro* cultures. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 800-803, 2003.

NANYINGI, M. O.; MBARIA, J. M.; LANYASUNYA, A. L.; WAGATE C. G.; KOROS K. B.; KABURIA H. F.; MUNENGE, R. W.; OGARA; W. O. Ethnopharmacological survey of

Bamburu district, Kenya. **Journal Ethnobiology and Ethnomedicine**. n. 4, p.14-26, 2008.

NEGASI, W.; BOGALE, B.; CHANIE, M. Helminth Parasites in Small Ruminants: Prevalence, Species Composition and Associated Risk Factors in and Around Mekelle Town, Northern Ethiopia. **European Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 91-95, 2012.

NOGUEIRA FILHO, A.; KASPRZYKOWSKI, J.W.A **O agronegócio da caprino-ovinocultura no Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2006. (Série Documentos do Etene, n.09).

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, s. 18, p. 718-723, 2008.

NWOSU, C. O. E. D.; OKON, S. N.; CHIEJINA, A. W.; MBAYA, P. K.; COLUMBUS; CHAGWA, L. L.. "Infection of Oesophagostomum columbianum in small ruminants of the Nigerian Sahel Region and its economic importance." **Nigerian Veterinary Journal**, v. 32, n. 3, p. 162-168, 2011.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1705-1721, 2010.

OLIVO, C. J.; HEIMERDINGER, A.; ZIECH, M. F.; AGNOLIN, C. A.; MEINERZ, G. R.; BOTH, F.; CHARÃO, P. S. Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. **Ciências Rural**, v. 39, n. 4, 2009.

PARAUD, C.; KULO, A.; PORS, I.; CHARTIER, C. Resistance of goat nematodes to multiple anthelmintics on a farm in France , **Veterinary Records**, n. 164, p. 563–564, 2009.

PARRA, A. L.; YHEBRA R. S; SARDIÑAS, I. G; BUELA, L.I. 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**. n. 8, p.395–400, 2001.

PEREIRA, B. C.; PEREIRA, A. K. D. T. Radicais livres: uma nova abordagem. **Revista Saúde Quântica**, v. 1, n. 01, 2012.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C. D.; SOUZA, A. B. D.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P. D.; PETEREIT, F.; LUFTMANN, H. Antioxidant activity of extracts and condensed tannins from leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n.2, p. 412-416, 2009.

PIEIDADE, R.; SCHAEFFELER, E.; WINTER, S.; ASIMUS, S.; SCHWAB, M.; ASHTON, M.; BURK, O.; GIL, J. P. PXR Variants and Artemisinin Use in Vietnamese Subjects: Frequency Distribution and Impact on the Interindividual Variability of CYP3A Induction by Artemisinin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2153-2157, 2012.

PIEDRAFITA, D. P., DE VEER; M. J., SHERRARD, J.; KRASKA, T.; ELHAY, M.; MEEUSEN, E. N. Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. **Vaccine**, v. 30, n.50, p.7199-7204, 2012.

PINTO, G. B. S. **Subsídios à geração de proposta de desenvolvimento para a região de Joselândia (Barão de Melgaço/MT): estudo etnobotânico**. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004. 144p.

PISSERI, F.; BENVENUTI, N.; GORACCI, J.; TERRACCIANO, G.; GIULIOTTI, L.; CIANCI, D. Testing the effectiveness of homeopathic remedy for the treatment of gastrointestinal nematodes in an organic flock of Massese sheep [Tuscany]. **O e DV Obiettivi e Documenti Veterinari**, v. 26, n. 10, p. 5-9, 2005.

POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S. J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n.11, 2009.

RAHMAN, S. Z.; SINGHAL, K. C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports**, s. 17, p. 1-4, 2002.

RESENDE, K.T.; FERNANDES, M.H.M.; TEIXEIRA, I.A.M.A. Exigências nutricionais de caprinos e ovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. p.114-135.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 65-70, 2005.

RIDSDILL-SMITH, T. J.; EDWARDS, P. B. Biological control: Ecosystem functions provided by dung beetles. **Ecology and evolution of dung beetles**, p. 245-266, 2011.

ROCHA, R. D. ; PACHECO, R. D. L. ; AMARANTE, A. F. T. A eficácia do tratamento homeopático contra a infecção natural de ovelha por nematódeos gastrintestinais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 23-27, 2006.

RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES O. G.; SILVA W. W.; FARIA E. B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 162-166, 2007.

ROSSI, C.; ARIAS, G.; LOZANO, N. Evaluación antimicrobiana y fitoquímica de *Lepechenia meyeri* Walp "Salvia". **Ciencia e Investigación**, v. 5, n. 1, 2002.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 98-102, 2005.

RUSTAIYAN, A.; MASOUD, S. Chemical constituents and biological activities of Iranian *Artemisia* species. **Phytochemistry Letters**, v. 247, p. 440-447, 2011.

SAEED, M.; IQBAL, Z.; JABBAR, A., MASOOD, S.; BABAR, W.; SADDIQLI, H. A.; YASEEN, M.; SARWAR, M.; ARSHAD, M. Multiple anthelmintic resistance and the possible contributory factors in Beetal goats in an irrigated area, **Research Veterinary Science**, n.88, p. 267–272, 2010.

SAGÜÉS, M. F.; FUSÉ, L. A.; FERNÁNDEZ, A. S.; IGLESIAS, L. E.; MORENO, F. C.; SAUMELL, C. A. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology research**, v. 109, n. 3, p. 707-713, 2011.

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

SANTOS N. V. M.; CHARLES T. P.; MEDEIROS E. M. A. M. Eficácia do cloridrato de levamisol em infestações por nematódeos gastrintestinais em caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 45, n. 5, p.487-495, 1993.

SANTOS, R. R.B.; LÓPEZ, J. A.; SANTOS, L. C.; ZACHARIAS, F.; DAVID, J. M., DAVID, J. P.; LIMA, F. W. D. M. Biological Effect of Leaf Aqueous Extract of *Caesalpinia pyramidalis* in Goats Naturally Infected with Gastrointestinal Nematodes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; FANFA, V. R.; FARRET, M. H.; RAGAGNIN, L.; HECKTHEUER, P.A.; MONTEIRO, S. G. A suitable model for the utilization of *Duddingtonia flagrans* fungus in small-flock-size sheep farms. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 4 ,p. 727-731, 2011.

SCARCELLA, M.; GRASSI, F.; MASTRORILLI, M. *Artemisia annua* L.: agro-techniques for semi-arid environments. **Italian Journal of Agronomy**, v. 6, n. 3, s. 26, 2011.

SCHENKEL, D. M., CAVALCANTE, M. K. M.; DAMASCENO, E. S.; CAMPOS, A. K.; FURLAN, F. H. Outbreak of *Oestrus ovis* in sheep in Mato Grosso, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 754-756, 2012.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 577-608, 1999.

SCHWARTZ, S. **Recent advances in companion animal behavior problems. Massachusetts, USA: Internacional veterinary information service**, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acessado em: 11 de dezembro de 2012.

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

SEBRAE. **Panorama da ovinocaprinocultura no Brasil**. 2009. Disponível em < <http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 06 de dezembro de 2012

SHABTAY, A.; EITAM, H.; TADMOR, Y.; ORLOV, A.; MEIR, A.; WEINBERG, P.; WEINBERG, Z.G.; CHEN, Y.; BROSH, A.; IZHAKI, I.; KEREM; Z. Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. **Journal of Agriculture and. Food Chemistry**, v. 56, p. 1063–1070, 2008.

SILVA, A. S.; FACCIO, L.; OTTO, M. A.; RIPOLI, F. L.; MONTEIRO, S. G.; SHAROM, A. Homeopathia In Treatment Of Mice (*Mus musculus*) Naturally Infected By *Giardia muris*. **Caderno de Pesquisa Sérica Biologia**, v.20, n. 1, p. 15-22, 2007.

SILVA, M. I. G. Utilização de Fitoterápicos nas Unidades Básicas de Saúde da Família (UBSF) no Município de Maracanaú-CE. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará (UFCE), Fortaleza, 2003; 144p.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-462, 2006.

SILVA, W. J. M. D.; FERRARI, C. K. B. Mitochondrial metabolism, free radicals and aging. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14 n. 3, p. 441-451, 2011.

SILVEIRA, P. F. Perfil de Utilização e Monitorização de Reações Adversas a Fitoterápicos do Programa Farmácia Viva em uma Unidade Básica de Saúde de Fortaleza-CE, Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará (UFCE), Fortaleza, 2007; 141p.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M, ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J. R. "Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul", Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre,

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. SIMPLÍCIO, A. A.[2006]. **Caprino-ovinocultura: uma alternativa à geração de emprego e renda**. Disponível em: < <http://www.cnpc.embrapa.br/artigo-6.htm> >. Acesso em: 16 de dezembro de 2012

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera offi cinalis*,

Myroxylon toluifera, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, p. 447-454, 2006.

SOBRAL, C. L. B. Caracterização fenotípica de caprinos mestiços resistentes e susceptíveis a verminose gastrointestinal no Nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado), UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ – CE, 2011.

SOUTO SILVA, C. A.; SILVA, M. L. C. R.; NÓBREGA, G. H. D.; PARANHOS, G. M.; LÔBO, K. M. D. S.; ATHAYDE, A. C. R. Estudo comparativo da carga parasitária e hematócrito em caprinos (*Capra hircus* L.) abatidos em matadouro público. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 4, n.1, 2010.

SPRENGER, L. K.; AMARAL C. H.; FILHO R. V. L.; AGUIAR T. N.; MOLENTO M. B. Eficácia do fosfato de levamisol em nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos, **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.1, p.29-39, 2013.

TEIXEIRA, M. Z. Panorama da pesquisa em homeopatia: iniciativas, dificuldades e propostas. **Diagnostico & Tratamento**, v. 9, p. 98-104, 2004.

THEODORIDES V. J.; SCOTT G. C.; LADERMAN M. Efficacy of parbendazole against gastrointestinal nematodes in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 5, p. 857-863, 1970.

THITILERTDECHA, N.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. and their antioxidant activities. **Molecules**, v. 15, n.3, p. 1453-1465, 2010.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2, p. 159-173, 2008.

TSOTETSI, A. M.; NJIRO, S.; KATSANDE, T. C.; MOYO, G.; BALOYI, F.; MPOFU, J. Prevalence of gastrointestinal helminths and anthelmintic resistance on small-scale farms in Gauteng Province, South Africa. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1-11, 2012.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature medicine**, v. 17, n.10, p. 1217-1220, 2011.

URQUHART, G. M. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guana-barra Koogan, 1996. 273p.

VAGENAS, D. ; JACKSON, F.; RUSSEL, A. J. F.; MERCHANT, M.; WRIGHT, I. A.; BISHOP, S. C. Genetic control of resistance to gastro-intestinal parasites in crossbred cashmere-producing goats: responses to selection, genetic parameters and relationships with production traits. **Animal Science**, v. 74, p. 199-208, 2002

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; JOSÉ, A. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VAN WYK, J.A. Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.68, p.55-67, 2001.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VERMUNT, J. J.; WEST, D. M.; POMROY, W. E. Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. **Veterinary Record**, v.137, p.43–45, 1995.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 2, p. 49-56, 2008.

VIEIRA, L. S., CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Nematóides gastrintestinais e pulmonares de caprinos. In: **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. 1 ed., Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 63 – 94. 2009

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 99-103, 1999.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; PEREIRA, M. F.; DANTAS, L. B; XIMENES, L. J. F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North – East

Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 150, n. 5, p. 447-452, 1999.

VILELA, L.; JUNIOR, M.; BUENO, G.; MACEDO, M. C. M.; MARCHÃO, R. L.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; PULRONNIK, K.; MACIEL, G. A. Integrated crop-livestock systems in the Cerrado region. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 10, p. 1127-1138, 2011.

WALLER, P. J.; RUDBY-MARTIN, L.; LJUNGSTRÖM, B. L.; RYDZIK, A. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. **Veterinary parasitology**, v. 122, n. 3, p. 207-220, 2004.

WALLER, P.J. Global perspectives on nematode parasitecontrol in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. In: FAO. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. **Anais...**Rome, Italy: FAO, 2002. 104p.

Wander, A. E.; Martins, E. C. **Viabilidade econômica da caprinocultura leiteira. Anuário Brasileiro de Caprinos & Ovinos**, Uberaba: Agropecuária Tropical. (2008).

WATERMAN, C.; SMITH, R. A.; PONTIGGIA, L.; DERMARDEROSIAN, A. Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 755-759, 2010.

WESONGAH, J. O.; CHEMULITI, J.; WESONGA, F. D.; WANJALA, K.; MUNGA, L.; NGARE, P.; MURILLA, G. A. Prevalence of parasitic infections in small ruminants in a pastoral community in Narok district, Kenya Prevalence des infections parasitaires chez les petits ruminants dans une communauté pastorale du district de Narok au Kenya. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 53, n. 4, p. 218-225, 2006.

WHIPPLE, S. D.; LINDROTH, E. J.; HOBACK, W. W.; ALBRECHT, M. C.; FOSTER, J. E. Genetic Variability of *Digitonthophagus gazella* (F.) (Coleoptera: Scarabaeidae) from Vieques, Puerto Rico and South Africa. **The Coleopterists Bulletin**, v. 66, n.1, p. 45-50, 2012.

WILLIAMS, J. C.; LOYCANO A. F.; DEROSA, A.; GURIE, J.; CLYMER, B. C.; GUERINO, F. Duration of anthelmintic efficacy of doramectin and ivermectin injectable solutions against naturally acquired nematode infections of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.277-288, 1999.

XIAO, S.H; GUO, J.; CHOLLET, J.; WU, J.; TURNER, M.; UTZINGER, J. Effect of artemether on *Schistosomiasis mansoni*: Dose-efficacy relationship and changes in morphology and histopathology. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Disease**, v. 22, p. 148-153, 2004.

ZHAO, G.; YAN, R., MULEKE, C. I.; SUN, Y.; XU, L.; LI, X. Vaccination of goats with DNA vaccines encoding H11 and IL-2 induces partial protection against. *Haemonchus contortus* infection. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 1, p. 94-100, 2012.

ZHENG, G. Q.. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. **Planta Medica**, v.60, n. 1, p. 54-57, 2007.

3. AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *ARTEMISIA ANNUA* COMO CANDIDATOS A FITOTERÁPICOS ANTIPARASITÁRIOS

RESUMO

Com o avanço do problema da resistência parasitária, novos métodos alternativos vêm sendo estudados para combater os parasitas gastrintestinais, entre eles se destaca a fitoterapia. Atualmente, diversas plantas estão sendo investigadas para tal finalidade, sendo que uma das mais promissoras é a *Artemisia annua*. O objetivo deste trabalho foi descrever a constituição química, a atividade antioxidante e analisar toxicologicamente esta planta para estabelecer se a mesma é uma candidata a ser um fitoterápico anti-helmíntico eficaz. Foram produzidos três tipos diferentes de extratos: Aquoso (Aq.), hidroalcoólico de 7 dias (H.7) e Hidroalcoólico de 30 dias (H.30). Os extratos foram analisados com a marcha fitoquímica completa; dosagem de artemisinina em HPLC; dosagem de fenóis totais; ensaios de atividade antioxidante pelos métodos do DPPH, poder redutor e captação do radical NO e ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*. Foram encontrados diversos metabólitos com potencial ação antiparasitária nos três extratos. A maior concentração de artemisinina foi encontrada, em ordem decrescente, no H.7 (59.409 ± 1.472), H.30 (50.378 ± 0.880) e Aq. (35.529 ± 1.849). No teste toxicológico, todos os extratos demonstraram ter baixa toxicidade ($CL_{50} > 1000$ ppm). Em todos os testes antioxidantes realizados, os melhores resultados foram encontrados no H.7, seguido do H.30 e por fim o Aq. Os extratos produzidos a partir da *A.annua* apresentaram bons resultados nos testes realizados e são candidatos a fitoterápicos anti-helmínticos. Testes *in vitro* ou *in vivo* necessitam ser realizados para elucidar a real atividade antiparasitária dos mesmos.

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

EVALUATION OF *ARTEMISIA ANNUA* EXTRACTS AS A HERBAL ANTIPARASITIC CANDIDATE

ABSTRACT

With the advancement of parasite resistance, new alternative methods are being studied to combat gastrointestinal parasites, among them stands out phytotherapy. Currently, several plants are being investigated for this purpose, and one of the most promising is the *Artemisia annua*. The objective of this study was describe the chemical composition, the antioxidant activity and make the analyze toxicologically this plant to establish whether it is a candidate to be an effective herbal anthelmintic. Was produced three different extracts: Aqueous (aq), hydroalcoholic 7 days (H.7) and Hydroalcoholic 30 days (H.30). Was made the complete phytochemical march; dosage of artemisinin in HPLC; dosage of total phenols, antioxidant activity assays by the methods of DPPH, reducing power and radical capture NO; toxicity test in the brine shimp. In all extracts were found various metabolites with potential antiparasitic action. The highest concentration of artemisinin was found, in descending order, in H.7 ($59,409 \pm 1,472$), H.30 ($50,378 \pm 0880$) and Aq. ($35,529 \pm 1,849$). In toxicological test, all extracts had low toxicity ($LC_{50} > 1000$ ppm). In all tests performed antioxidants, best results were found at H.7, followed by H.30 and finally Aq. The extracts produced from *A.annua* showed good results in these tests and are candidates for herbal anthelmintic. *In vitro* or *in vivo* tests need to be performed to elucidate the real antiparasitic activity in this extracts.

Keywords: anthelmintic, herbal medicine, parasite resistance.

3.1 INTRODUÇÃO

Independentemente do tipo de criação animal, as parasitoses gastrintestinais são apontadas como uma das principais causas de prejuízos. Tais perdas estão associadas a: diminuição no ganho de peso; alterações na condição corporal; maior conversão alimentar; diminuição da produção; diminuição do desempenho reprodutivo e, ainda, no aumento da mortalidade, principalmente entre animais jovens (RAMOS et al., 2004; PEREIRA, 2011).

Em grande parte dos sistemas produtivos de animais domésticos, o método de controle mais comum dessa enfermidade é através do uso indiscriminado de bases químicas (VIEIRA, 2003). Muitas vezes os produtores não sabem nem quais parasitas estão envolvidos e quais animais realmente necessitam de tratamento (AMARANTE et al., 2004). Esta forma de utilização do fármaco, sem nenhum estudo epidemiológico prévio, leva a resistência parasitária, que é um fenômeno no qual uma droga não consegue manter a mesma eficácia frente aos parasitas (CONDER; CAMPBELL, 1995). Logo, cria-se uma população resistente ao princípio ativo e essa passa os seus genes de resistência para as futuras gerações, aumentando assim a quantidade de indivíduos resistentes (MOLENTO, 2005).

Além do citado problema da resistência, atualmente existe uma tendência pela produção de alimentos sem a utilização de tais medicamentos (LUCHESE *et al.*, 2007). Isso se deve ao fato que, além de acarretar em resistência parasitária, essa utilização massiva de produtos químicos aumenta o custo de produção e acarreta em acúmulo de resíduos no meio ambiente e nos produtos de origem animal o que pode ser perigoso para o consumo (CONDER; CAMPBELL, 1995; MOLENTO, 2005). Devido a isso, existe uma tendência de mudança de comportamento dos consumidores na esfera mundial, que cada vez mais buscam produtos mais saudáveis e sem a adição de produtos químicos (YIN *et al.*, 2011). Muitos métodos alternativos vêm sendo amplamente pesquisados, entre eles se destaca a busca pelo desenvolvimento de produtos fitoterápicos (SOBRAL *et al.*, 2010).

A fitoterapia é a prática do uso de plantas ou suas partes com finalidade terapêutica (FETROW; AVILA, 2000). Representa uma alternativa ecologicamente viável, contribuindo inclusive para o aumento da lucratividade pecuária, uma vez que

reduz o uso de antiparasitários convencionais, além de estender a vida útil dos produtos químicos disponíveis (VIEIRA *et al.*, 1999). Os produtos fitoterápicos são de fácil acesso e obtenção por parte dos produtores em farmácias de manipulação, não deixam resíduos contaminantes em alimentos e ainda apresentam baixo custo para sua fabricação (OLIVO *et al.*, 2009). Estes medicamentos vêm sendo frequentemente utilizados no controle das parasitoses de diversas espécies animais (ALMEIDA; SILVA; ECHEVARRIA, 2002). Várias espécies de plantas têm demonstrado eficácia no controle das doenças parasitárias, assim muitos grupos de pesquisa estão envolvidos na avaliação de extratos vegetais como uma estratégia contra as parasitoses (VALDÉS *et al.*, 2009).

Artemisia annua ocorre naturalmente como parte da vegetação das planícies ao norte das províncias Chadar e Suiyuan, na China (MARCHESE, 1999). Pertencente a família Asteraceae, essa planta possui grande importância econômica na Ásia. Contudo, com a descoberta de suas diversas propriedades biológicas, a mesma se encontra difundida por vários países do mundo (Willcox *et al.*, 2004). No Brasil, o número de pesquisadores que trabalha com esta espécie é pequeno, porém nos últimos anos houve um grande aumento no interesse por esta erva.

Na medicina tradicional chinesa a *A. annua* é utilizada há muito tempo principalmente no combate a malária (MUELLER *et al.*, 2004), apresentando pouco ou nenhum efeito colateral (WHO, 2005). Além do referido potencial antimalárico, essa planta tem sido estudada em vários centros de pesquisas do mundo e diversas são as atividades biológicas citadas (WEATHERS *et al.*, 2011). Sua eficácia foi comprovada frente a diversos patógenos, como: *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* e *Opisthorchis viverrini* (UTZINGER *et al.*, 2000; KEISER; UTZINGER, 2007); *Babesia equi* (NAGAI *et al.*, 2003); *Neospora caninum* (KIM *et al.*, 2002); *Leishmania* sp. (MENON *et al.*, 2006; SEN *et al.*, 2007); *Eimeria* sp. (ALLEN *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2011) e *Staphylococcus aureus* (STERMITZ *et al.*, 2002).

Sua atividade é devido a ação sinérgica de compostos como: sesquiterpenóides, flavonóides, cumarinas, triterpenóides, compostos esteróides, fenóis, purinas, lipídeos e alifáticos, que conferem a ela uma alta atividade antioxidante (BHAKUNI *et al.*, 2001). Todavia, seu principal metabólito é a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada da planta (MAGIERO *et al.*, 2009) e descoberta por cientistas chineses em 1967 (DEBNATH *et al.*, 2011). A mesma encontra-se, em maior quantidade, nas folhas e

inflorescências da planta (DAVIES *et al.*, 2009), apresentando quantidade variável, de 0,01 a 0,8% do peso seco dependendo das condições de crescimento e variações sazonais e geográficas, (BALIANT, 2001), porém existe cultivares que possuem mais que 1% deste metabólito na planta (ZHANG *et al.*, 2009).

É de extrema necessidade a validação científica dos fitoterápicos, uma etapa inicial obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos (KRYCHAK-FURTADO *et al.*, 2005). Técnicas *in vitro* possuem vantagens pela simples execução com custo baixo e resultados rápidos em diferentes fases parasitárias permitindo selecionar uma grande quantidade de plantas com uso de pouco material biológico (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006).

O controle apropriado das parasitoses gastrintestinais na cadeia pecuária é de grande importância, assim como a busca por novas alternativas de controle. O objetivo deste trabalho foi caracterizar fitoquimicamente, verificar a toxicidade frente a *Artemia salina* e analisar a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da *Artemisia annua*, para obter a produção de um novo fitoterápico com propriedades anti-helmínticas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

A *Artemisia annua* utilizada neste experimento foi plantada no final do ano de 2009 e colhida em março de 2010 no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) que é um órgão vinculado à Universidade de Campinas (UNICAMP), o qual está localizado no município de Paulínia-SP, Distrito de Betel, possuindo as coordenadas 22° 47' 15.91" S e 47° 6' 42.87" O. A identificação taxonômica do material foi feita pelo Prof. Dr. Pedro Melilo de Magalhães (UNICAMP).

Após a colheita das folhas, estas foram secadas a sombra em temperatura ambiente, sendo trituradas em moinho, em seguida o material foi inspecionado para retirada de partículas estranhas e posteriormente o material foi armazenado ao abrigo de luz e umidade.

3.2.2 Preparação dos extratos

As folhas foram utilizadas para realização de três tipos de extrações distintas entre si e não contínuas. Na extração aquosa a quente, foram pesados 64 g do material, macerado em 800 mL de água destilada e mantidas em banho-maria por 1 h a 30° C em frasco tipo Becker, sob agitação constante. Após essa etapa, realizou-se a filtração, com auxílio de uma bomba de vácuo, em funil com papel filtro para um frasco tipo Kitasato.

Na extração hidroalcolólica se utilizou um frasco de cor âmbar e vedado em toda a extensão lateral com papel alumínio, no qual foram colocados 64g das folhas junto com 640 mL de álcool 80% (v/v). Nesta extração, se produziu dois extratos diferentes, o primeiro, onde o conteúdo ficou sete dias armazenado em refrigerador a 4° C e o segundo ficou armazenado, nas mesmas condições, pelo período de 30 dias. Em

ambos os casos, houve agitação periódica. Após o tempo estipulado, realizou-se a mesma metodologia de filtração citada anteriormente.

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida à temperatura inferior a 30°C e posteriormente foram liofilizados. O rendimento obtido em relação as folhas na extração aquosa foi de 3,813%; já na extração hidroalcoólica de 7 dias se obteve 5,89% e a hidroalcoólica de 30 dias rendeu 6,891%.

3.2.3 Caracterização fitoquímica

O extrato aquoso foi diluído em água destilada e os extratos hidroalcoólicos em etanol a 80%, ambos em concentração de 10mg/mL. Posteriormente se realizou a marcha fitoquímica qualitativa adaptada de Nakashima (1994) e Matos (1998). Buscou-se avaliar a presença dos seguintes metabólitos secundários: fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, catequinas, leucoantocianidinas, esteróides, triterpenos, saponinas, resinas e alcalóides. Para a interpretação dos resultados foram utilizados os sinais (+, positivo) para indicar presença e (-, negativo) no caso de ausência.

3.2.4 Dosagem da artemisinina

Esta etapa foi realizada nos laboratórios de fitoquímica do CPQBA-UNICAMP. Para o preparo da curva padrão de artemisinina, em balão volumétrico de 25 mL pesou-se 0,0618g de padrão de artemisinina (Ayalla Marketing, 98% m/m) e que em seguida foi diluído em metanol grau HPLC, a fim de preparar uma solução-mãe de 2,423 µg/mL. A fase móvel utilizada foi H₂O:Metanol (60:40 v/v), com filtração em Millipore 0.45 µm e sonicação sob vácuo. A partir desta solução, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, em balões volumétricos, foram preparadas sete soluções com concentrações que diferiam 100% ao valor da anterior (24,23-969,2 µg/mL). As soluções foram injetadas

em triplicata em HPLC-IR Waters, com bomba Waters 515, forno para aquecimento de coluna a 35° C, detector de índice de refração Waters 241. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna de fase Luna 5 μ CN 100 A° 250mm x 4,6 mm x 5 μ m (Phenomenex, Waters) acoplada a uma pré-coluna C-18, com volume de injeção de 20 μ L e vazão de 1mL/min. A curva foi confeccionada através do Software Empower pro build 1154 / Waters. A quantificação da artemisinina (tempo de retenção de 7,5 min) seguiu a metodologia descrita por Celeghini *et al.* (2009).

3.2.5 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada através do teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach, baseando-se na metodologia adaptada de Meyer *et al.*, (1982). Os ovos foram colocados em um aquário contendo água do mar artificial (sal marinho artificial 38g/L, Red Sea) sob aeração constante e temperatura controlada (26-30°C). Após 48 h de incubação as larvas eclodiram. Dez metanúplios por grupo foram coletados e transferidos para placas de 24 poços contendo soluções dos extratos preparados com água do mar artificial: DMSO (1% v/v) em concentrações variando de 8000 até 31,75 μ g/mL. O grupo controle negativo foi preparado apenas com água do mar artificial: DMSO (1% v/v) ao passo que o controle positivo foi preparado com sulfato de quinidina. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após 24 h em contato com os extratos, realizou-se a contagem do número de larvas vivas, sendo consideradas mortas aquelas que permaneceram imóveis por mais de 15 segundos após agitação da placa. A partir desse valor foi calculada a concentração letal onde 50% das *A. salina* morrem (CL₅₀). O critério de toxicidade dos extratos foi estabelecido de acordo com Déciga-Campos *et al.*, (2007), sendo valores >1000 μ g/mL (não tóxicos), $\geq 500 \leq 1000$ μ g/mL (fracamente tóxico) e < 500 μ g/mL (tóxicos).

3.2.6 Determinação dos polifenóis totais

A dosagem de compostos fenólicos totais foi realizada pelo teste de Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia adaptada por McDonald *et al.*, (2001). As absorbâncias dos extratos foram comparadas ao padrão de ácido gálico (1 µg/mL a 50 µg/mL). Para tanto, 250 µL dos extratos, a 1 mg/mL, foram adicionadas a 1,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) juntamente com 1 mL de carbonato de sódio 7,5% (m/v). O material foi mantido em banho-maria, a 50°C, por 5 min. Todas as amostras, assim como as diversas concentrações do padrão ácido gálico, foram analisadas em triplicatas. Após 1 h de incubação, 200 µL das amostras foram transferidas para placas de 96 poços e lidas em comprimento de onda de 760 nm no espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA). O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico. Os resultados, determinados a partir da equação de regressão da curva de calibração ($y = 0,02x - 0,0064$; $R^2 = 0,9911$) foram expressos em mg de ácido gálico equivalentes por grama da amostra.

3.2.7 Ensaio antioxidantes

Na avaliação quantitativa da atividade antioxidante, foram realizadas três metodologias diferentes: redução do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila); poder redutor, captação do radical óxido nítrico. Os três métodos abaixo descrito foram realizados em triplicata.

A atividade sequestrante do radical DPPH foi determinada de acordo com o metodologia de Blois (1958), com modificações. Em microtubos tipo *ependorf* foram colocados 300 µL dos extratos em diferentes concentrações (10-640 µg/mL) junto a 100 µL de solução etanólica de DPPH (0,1 mM). Para o branco da amostra foi adicionado 100 µL de etanol (EtOH) ao invés do DPPH, enquanto que no branco do método foi utilizado 300 µL EtOH no lugar das amostras. Os tubos foram agitados em *vortex* e posteriormente se transferiu 200 µL do preparado para uma placa de 96 poços. O preparado foi incubado no escuro, sob temperatura ambiente por 30 min. Decorrido o tempo, a absorbância de cada solução foi mensurada no espectrofotômetro a 515 nm.

O poder redutor dos extratos foi determinado de acordo com o método descrito por Oyaizu, (1986). Em microtubos de 2ml tipo *ependorf* foram adicionados 250 µL dos extratos em diferentes concentrações (10-640 µg/mL) junto a 250 µL de tampão fostato de sódio 0,2 M, pH 6,6 (62,5 mL de solução de 4M de fosfato de sódio monobásico, 37,5 mL de solução de 4M de fosfato de sódio dibásico e água qsp 200 mL) e 250 µL de ferrocianeto de potássio (1%*m/v*). Para o branco da amostra foi adicionado 250 µL EtOH ao invés do ácido tricloroacético (10%*m/v*), enquanto que no branco do método foi utilizado 250 µL EtOH no lugar das amostras. Os preparados foram incubados no escuro, a 50°C por 20 min. Acrescentou-se 250 µL de ácido tricloroacético a 10% e depois se homogenizou em *vortex* para então transferir 200 µL do preparado para uma placa de 96 poços. A absorbância de cada solução foi mensurada no espectrofotômetro a 700 nm.

A captação do radical óxido nítrico dos extratos foi determinada de acordo com o método descrito por Marcocci *et al.*, (1994). Em tubos tipo *ependorf* foram adicionados 250 µL dos extratos em diferentes concentrações (10-640 µg/mL) juntamente a 250 µL de nitroprussiato de sódio (10mM) em tampão fostato 0,2 M, pH 7,4 (19,0 mL de solução de 4M de fosfato de sódio monobásico, 81,0 mL de solução de 4M de fosfato de sódio dibásico e água qsp 200 mL). Por fim se agitou o produto em *vortex*. As amostras foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente por 120 min. Posteriormente, foram transferidos 100 µL das amostras para uma placa de 96 poços e se adicionou 100µL de reagente de Griess (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% *m/v*: naftilenodiamida 0,1% *m/v* em água destilada, 1:1, *v/v*). Para o branco da amostra foi adicionado 100µL do mesmo tampão ao invés do reagente de Griess, ao passo que no branco do método foi utilizado 250µL do mesmo tampão no lugar dos extratos. A absorbância de cada solução foi mensurada no espectrofotômetro a 546 nm.

As atividades antioxidantes dos extratos, nos diferentes métodos testados, foram expressas em percentagem, segundo a equação:

$$AA(\%) = ((ABS_{controle} - (ABS_{amostra} - ABSBR_{amostra})) \times 100) / ABS_{controle}$$

Onde, $ABS_{controle}$ é a absorbância do controle, $ABS_{amostra}$ é a absorbância das amostras incubadas com diferentes concentrações e $ABSR_{amostra}$ é a absorbância do branco da amostra.

A atividade antioxidante dos extratos testados foi comparada com padrão do antioxidante comercial ácido ascórbico (AA, vitamina C), composto com comprovada

elevada atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007), o qual foi preparado em etanol e utilizado nas mesmas concentrações dos extratos.

Com os resultados das atividades antioxidantes (%) obtidos nas diferentes concentrações de cada uma das amostras foi possível calcular a concentração eficiente de 50% (CE₅₀) (LEE *et al.*, 2003).

3.2.8 Análise estatística

Para analisar a toxicidade frente a *Artemia salina* se utilizou a análise de regressão não linear. Em todos os casos os resultados apresentados correspondem à média da triplicata (n=3) ± desvio padrão da média. Nos outros testes, os dados foram comparados por análise de variância pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.

3.3 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão os resultados da marcha fitoquímica realizada com os três extratos. Em todos eles, foi detectada a presença dos seguintes metabólitos: taninos, flavonóides, cumarinas, esteróides, fenóis, triterpenos e sesquiterpenos. Ao passo que, antocianinas, antocianidinas e leucoantocianidinas não foram detectadas, pelos testes utilizados, em nenhum dos extratos. Saponinas foram encontradas somente no Aq., enquanto que resinas somente no H7 e H30. Catequinas foram encontradas no extrato aquoso no teste de mudança de pH e aquecimento, não sendo detectada no teste de madeira, HCL e aquecimento. Já nos extratos hidroalcoólicos a presença deste metabólito ocorreu nos dois métodos.

TABELA 1 – RESULTADOS DA MARCHA FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSO, HIDROALCOÓLICO DE 7 DIAS E HIDROALCOÓLICO DE 30 DIAS OBTIDOS DA *ARTEMISIA ANNUA*.

Teste ou Reagente	Composto	H.7	H.30	Aq.
Cloreto Férrico	Fenóis	+	+	+
	Taninos	+	+	+
Gelatina 2,5% <i>m/v</i> , NaCl 0,9% <i>m/v</i> Mudança de pH	Taninos	+	+	+
	Antocianinas	-	-	-
Mudança de pH e aquecimento	Antocianidinas	-	-	-
	Catequinas	+	+	+
Madeira, HCl e aquecimento	Leucocianidinas	-	-	-
	Catequinas	+	+	-
Lieberman-Burchard	Esteróides	+	+	+
H ₂ SO ₄ e anisaldeído	Triterpenos	+	+	+
Clorofórmio	Saponinas	-	-	+
Etanol	Resinas	+	+	-
Dragendorff	Alcalóides	+	+	+

(+) = reação positiva; (-) = reação negativa; Aq. = Extrato aquoso; H. 7d = Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d = Extrato hidroalcoólico de 30 dias.

Os resultados das análises químicas de quantificação da artemisinina nos extratos se encontram no Quadro 1. O extrato H.7 apresentou a maior quantidade desse metabólito ($59,409 \pm 1,472 \mu\text{g/L}$), seguido pelo H.30 ($50,378 \pm 0,880 \mu\text{g/L}$) e Aq. ($35,529 \pm 1,849 \mu\text{g/L}$). Todas as médias são diferentes estatisticamente entre si ($P < 0,05$)

QUADRO 1 - QUANTIFICAÇÃO DA LACTONA SESQUITERPÊNICA ARTEMISININA ($\mu\text{g/dL}$) (\pm DESVIO PADRÃO) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO NOS EXTRATOS OBTIDOS DA *ARTEMISIA ANNUA* POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

Extratos	$\mu\text{g /dL}$	D. P.	CV%
H.30	$50,378^b$	0,880	1,746
Aq.	$35,529^c$	1,849	5,204
H.7	$59,409^a$	1,472	2,478

Aq.= Extrato aquoso; H. 7d= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; D.P.= Desvio padrão; CV%= Coeficiente de variação.

Para analisar a toxicidade dos extratos foi utilizado o ensaio frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Os valores de CL_{50} encontrados para os extratos H.7, H.30, Aq. e sulfato de quinidina (controle positivo) foram de $3827 \mu\text{g/mL}$, $3325 \mu\text{g/mL}$, $2673 \mu\text{g/mL}$ e $104 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sendo assim, todos apresentaram baixa toxicidade ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$). Os resultados estão ilustrados no Quadro 2. Como o valor do coeficiente de determinação (R^2), significa que o modelo consegue explicar os valores observados. De modo simplificado, quanto mais alto este valor mais exato é o valor da CL_{50} encontrado.

QUADRO 2 - VALORES DE CL₅₀ CALCULADOS PARA OS DIFERENTES EXTRATOS NO TESTE DE LETALIDADE FRENTE À *ARTEMIA SALINA*.

Extratos	CL ₅₀ (ppm)	R ²
H. 7	3.827	0,9478
H. 30	3.325	0,9518
Aq.	2.673	0,9895
C+	104	0,977

Aq.= Extrato aquoso; H. 7d= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; CL₅₀= Concentração letal para 50% das *Artemia salina*; R²= coeficiente de determinação.

Os resultados da quantificação dos fenóis totais (FT) estão expressos no Quadro 3. O menor teor de FT foi registrado no Aq; (142,7 ± 0,874). Ao passo que o maior teor foi encontrado no H.7 (203,0±0,569), sendo este valor estatisticamente igual (P < 0,05) ao observado para o H.30 (197,3 ± 0,656).

QUADRO 3. VALORES DE FENÓIS TOTAIS CALCULADOS PARA OS DIFERENTES EXTRATOS NO ENSAIO DE FOLIN-CIOCALTEU.

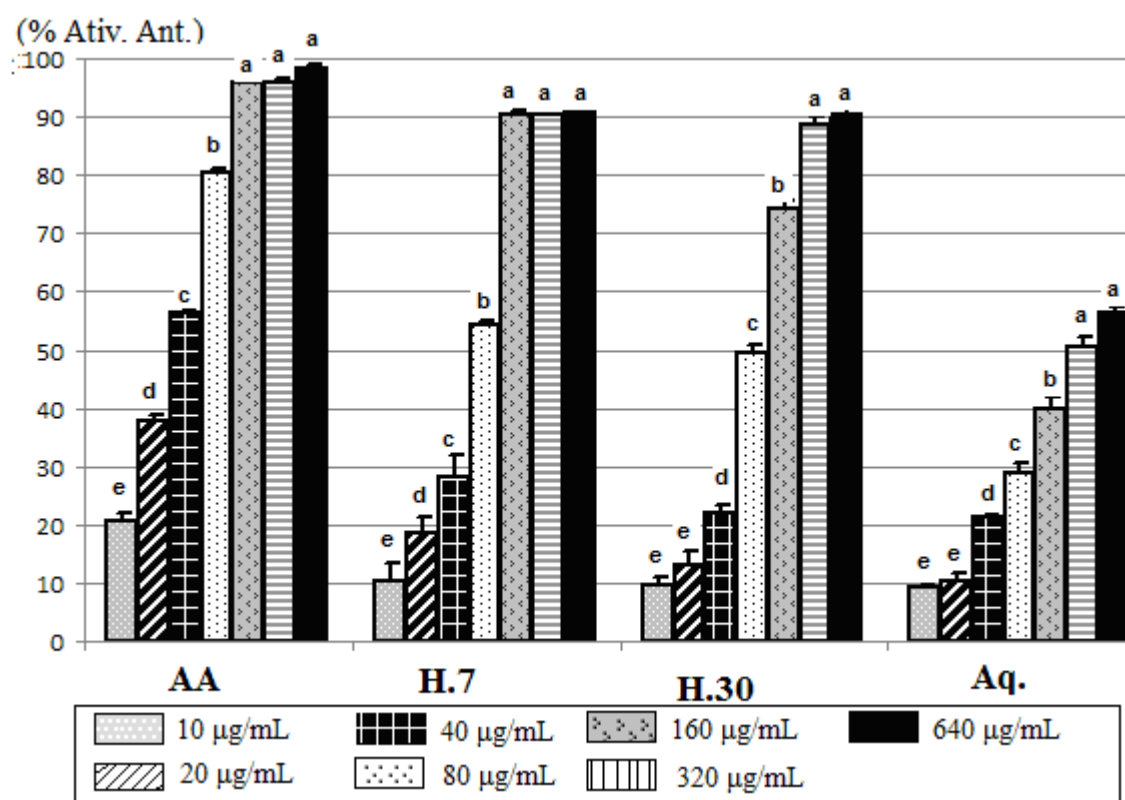
Extratos	mg de EAG/g de extrato ± DP
H.7	203,0 ± 0,569 ^a
H.30	197,3 ± 0,656 ^a
Aq.	142,7 ± 0,874 ^b

Aq.= Extrato aquoso; H. 7d= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; EAG= equivalente de ácido gálico; DP= Desvio padrão.

Os resultados das avaliações quantitativas das atividades antioxidantes (% Ativ. Ant.) dos extratos H.7, H.30, Aq. e do ácido ascórbico (controle positivo) nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 µg/mL, determinadas pelos ensaios do DPPH, poder redutor e captação do radical NO encontram-se respectivamente nos gráficos 1, 2 e 3. Pode-se observar que todos os extratos apresentam atividade antioxidante.

Os resultados do teste do DPPH estão no Gráfico 1. A atividade antioxidante do controle positivo (AA), nas diferentes concentrações testadas, são diferentes entre si ($P<0,05$). O mesmo aconteceu para o H.7 e H.30. Já no Aq., a % Ativ. Ant. não apresentam diferenças estatísticas ($P<0,05$), sendo apenas entre as concentrações 10 e 20; 320 e 640 $\mu\text{g/mL}$.

GRÁFICO 1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (% ATIV. ANT.) DOS EXTRATOS OBTIDOS DA *ARTEMISIA ANNUA*, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, PELO ENSAIO DO RADICAL DPPH.

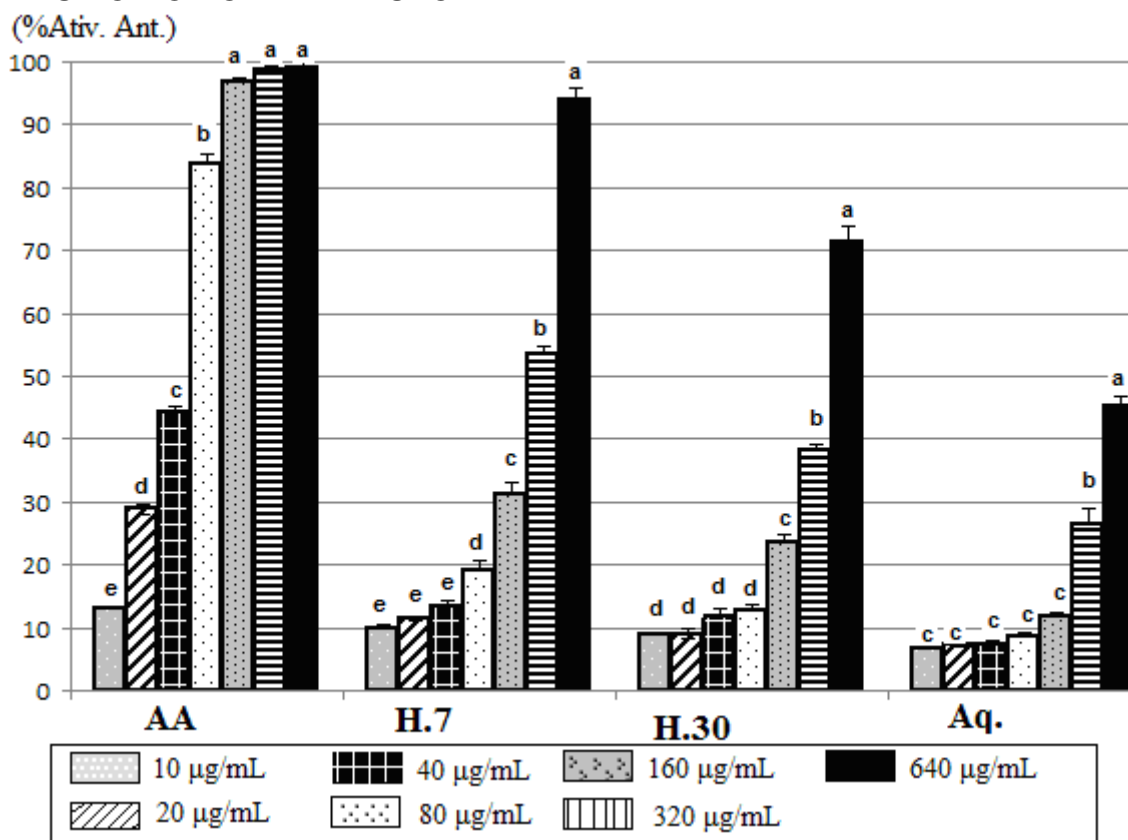


Aq.= Extrato aquoso; H. 7d= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; AA= Ácido ascórbico (controle positivo). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa no mesmo tratamento ($P<0,05$)

Já no teste do poder redutor, observou-se nesse ensaio que a atividade antioxidante do AA, nas diferentes concentrações testadas, são diferentes entre si. O mesmo aconteceu para o H.7. No H.30 a %Ativ. Ant. não apresentou diferença estatística ($P<0,05$) entre as concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ e entre 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$, sendo os demais diferentes estatisticamente ($P<0,05$). No caso do Aq., somente as

concentrações 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ não apresentam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) (Gráfico 2).

GRÁFICO 2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (% ATIV. ANT.) DOS EXTRATOS OBTIDOS DA *ARTEMISIA ANNUA*, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, PELO ENSAIO DO PODER REDUTOR.

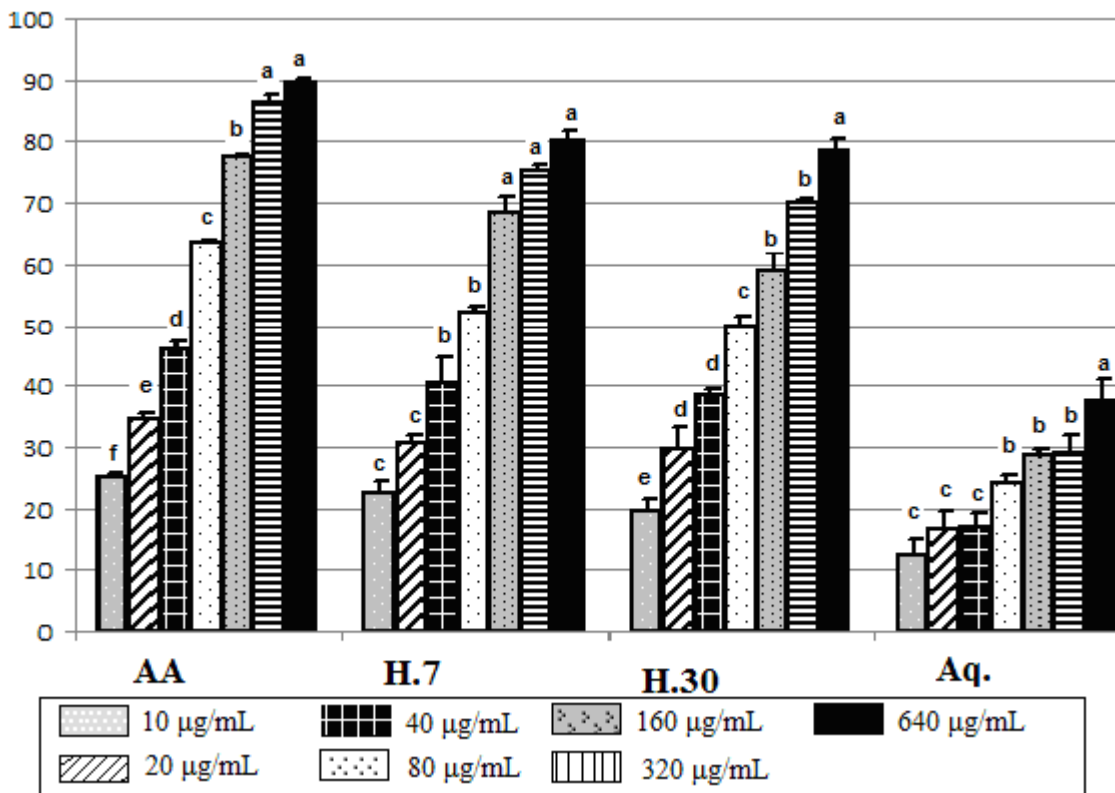


Aq.= Extrato aquoso; H. 7d= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; AA= Ácido ascórbico (controle positivo). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa no mesmo tratamento ($P < 0,05$)

Por fim, no ensaio da captação do radical NO, as %Ativ. Ant do AA, nas diferentes concentrações testadas, não apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,05$), sendo que o mesmo ocorreu para o H.7 e H.30. Entretanto, no Aq. as concentrações 10,20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ não apresentam diferenças estatísticas entre si ($P < 0,05$), sendo que o mesmo ocorreu entre 80, 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$. Já os outros valores são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) (Gráfico 3).

GRÁFICO 3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (% ATIV. ANT.) DOS EXTRATOS OBTIDOS DA *ARTEMISIA ANNUA*, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, PELO ENSAIO DA CAPTAÇÃO DO RADICAL ÓXIDO NÍTRICO.

(%Ativ. Ant.)



Aq.= Extrato aquoso; H. 7d= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; AA= Ácido ascórbico (controle positivo). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa no mesmo tratamento ($P < 0,05$)

Os valores de CE_{50} estão na Quadro 4, sendo que nos três ensaios realizados, os menores valores, de forma crescente, foram encontrados no controle positivo (ácido ascórbico), seguido dos extratos H.7, H.30 e por fim Aq. Nessa análise utilizada, quanto menor o valor obtido melhor a ação antioxidante do extrato avaliado (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005; SOUSA *et al.*, 2007).

QUADRO 4. VALORES DE CE₅₀ CALCULADOS PARA OS DIFERENTES EXTRATOS NOS DIFERENTES ENSAIOS ANTIOXIDANTES.

Extratos	DPPH	P. Red.	Cap. NO
AA	42,110	46,15	62,7
H.7	67,480	268,1	71,06
H.30	82,470	417,39	80,46
Aq.	316,170	705,36	854,29

Aq.= Extrato aquoso; H. 7d= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H. 30d= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; AA= Ácido ascórbico (controle positivo); CE₅₀= Concentração eficiente; DPPH= Atividade seqüestrante do radical DPPH; P. Red.= Poder redutor; Cap. NO = captação do radical óxido nítrico.

3.4 DISCUSSÃO

Avaliar a composição química e as prováveis atividades farmacológicas é um ponto chave para a produção de fármacos (FLORES *et al.*, 2008). Esses estudos possibilitam uma melhor avaliação da atividade terapêutica e também os requisitos de qualidade (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

Os dados encontrados na marcha fitoquímica corroboram com os encontrados na literatura, onde são citados que esses mesmos compostos estão presentes na *A. annua* (BRISIBE *et al.*, 2009). Esta planta normalmente possui quantidades insignificantes de antocianinas, antocianidinas e leucoantocianidinas. Contudo, quando a planta passa por estresse, como falta de água ou temperatura inadequada, esses são compostos que aumentam de produção nas folhas da planta (WALLART *et al.*, 2000). O fato de saponinas só serem encontradas no extrato aquoso, enquanto que resinas somente nos hidroalcoólicos se deva a diferença no processo, pois a extração aquosa extrai compostos mais polares, já a hidroalcoólica extrai compostos com características mais apolares (SILVA, 2004). As catequinas não foram encontradas no teste de madeira, devido provavelmente a menor sensibilidade deste teste, uma vez que o gênero *Artemisia* é rico em flavonóides (TODA, 2005).

Todos os extratos avaliados apresentaram moderados teores de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies descritos na literatura (SOUSA *et al.*, 2007 ; PERES *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos são muito eficientes na prevenção da auto-oxidação (LUXIMON-RAMMA *et al.*, 2002). Eles interagem, preferencialmente, com o radical peroxil, uma vez que este é mais prevalente na auto-oxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (DECKER, 1998). Nesse teste, foi demonstrado que quanto mais polar o solvente maior a quantidade de polifenóis no extrato, sendo o mesmo efeito descrito em outros estudos (CHAVAN *et al.*, 2001; ZHOU; YU *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2005).

Ressalta-se a importância de alguns metabólitos secundários, pertencentes ao grupo dos fenólicos, encontrados nos extratos produzidos que possuem comprovado efeito antiparasitário como os taninos (MCCANN *et al.*, 2006) e flavonóides (HUR;

MOLAND; CHA, 2005; NAIDOO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). Estes dois, quando encontrados em quantidade representativa em uma planta, fazem com que a mesma seja uma excelente candidata a possuir boas propriedades antiparasitárias (KERBOEUF *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato que os compostos anteriormente citados são os principais responsáveis pelo mecanismo de melhora na imunidade do animal (BRISIBE *et al.*, 2009).

Os taninos são pesquisados há muito tempo na parasitologia, pois possuem um efeito anti-helmíntico pronunciado (ATHANASIADOU *et al.*, 2000), principalmente por reduzir a taxa metabólica do parasita via quelação dos nutrientes que seriam utilizados pelo mesmo (HOSTE *et al.*, 2006). Uma outra importante ação dos taninos, é que eles aumentam a biodisponibilidade de proteínas no organismo do animal, levando a uma maior resposta imune sobre parasitas intestinais (NIEZEN *et al.*, 2002).

Devido as suas ações anti-tumoral, antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antiviral e antiparasitária, compostos que possuam em sua composição quantidades significativas de flavonóides estão sendo pesquisados (HAVSTEEN, 2002; HOANG *et al.*, 2012). Quanto aos seus efeitos na área da parasitologia, destacam-se a inibição do desenvolvimento de *Toxoplasma* sp. (WEISS *et al.*, 1998), *Trypanosoma* sp. (MAMANI-MATSUDA *et al.*, 2004), *Leishmania* sp (KIRMIZIBEKMEZ *et al.*, 2004). e *Plasmodium falciparum* (HOANG *et al.*, 2012). Grande parte dos efeitos benéficos à saúde dos flavonóides é atribuído à sua atividade antioxidante (HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA; 2002). Eles são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da planta (CAO *et al.*, 1996).

A artemisinina é o biocomposto mais importante presente, sendo considerado o principal responsável pelas atividades farmacológicas da planta (OLUMNESE, 2006). Para malária, a artemisinina mata quase todas as formas assexuadas do parasita no sangue, podendo também ter efeito nas fases sexuadas. Porém, não afetam as formas pré-eritrocítica ou estágios latentes (SMITH *et al.*, 2007; DONDORN *et al.*, 2009) . O mecanismo de ação ocorre devido ao grupo heme liberado pela digestão da hemoglobina pelo parasita e que reage com a ponte endoperóxido, quebrando as ligações de oxigênio e fazendo a produção de radicais livres, que danificam o parasita (KRISHNA *et al.*, 2008). A artemisinina também tem sido demonstrada para desnaturar proteínas do parasita, embora o alvo molecular específico ainda não tenha sido descoberto (O'NEILL, BARTON, WARD; 2010). Contudo, para estas doenças e também

para as outras, as verdadeiras vias de ação não estão ainda bem esclarecidas (O'NEILL, BARTON, WARD; 2010).

Além dos compostos destacados acima, existem diversos outros com menor importância quando encontrados isolados, contudo quando todos estão presentes na mesma solução ocorre uma forte sinergia entre eles (KERBOEUF, RIOU, GUEGNARD; 2008). Há indícios que o mecanismo de ação do gênero *Artemisia* provavelmente ocorra pelo potencial antioxidante e ainda pelo sinergismo dos metabólitos presentes na planta, aumentando sua absorção, atividade farmacológica e ainda sua permanência no organismo (BLANKE *et al.*, 2008). Ocorre também um efeito indireto do consumo de *A. annua*, uma vez que sabe-se que a presença desses diversos componentes estimula o aumento da produção de diversas células de defesa (KEISER *et al.*, 2008). Por último, existem alguns compostos presentes na planta com potencial pró-inflamatórias, sendo assim podem atenuar a resposta inflamatória provocada pelos desafios parasitários (GARCÍA-LAFUENTE *et al.* 2009). O efeito sinérgico entre os compostos encontrados nos vegetais superiores reforçam a ideia de que sempre se trabalha com a planta inteira e não com compostos isolados, pois assim se poderia perder tal efeito (VEIGA JUNIOR, PINTO, MACIEL; 2005).

Para estabelecer a toxicidade dos fitoterápicos, o ensaio de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* apresenta-se como um método de alta especificidade (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006). Além de ter menor custo barato, é vendido em forma de cistos, possui distribuição cosmopolita, sendo seguro e prático (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005; KOUTSAFTIS; AOYAMA, 2007). Este teste possui alta confiabilidade para testar o efeito tóxico de extratos vegetais (MCLAUGLIN; CHANG; SMITH, 1991), além de também ser usado para avaliação em micotoxinas, poluentes de águas residuais e marinhas, detergentes e surfactantes, produtos originados de petróleo, corantes alimentares, metais pesados e pesticidas (SAM, 1993). A avaliação pode indicar fontes vegetais com importantes atividades biológicas usando a concentração letal média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação (NUNES *et al.*, 2008).

Os resultados da CL₅₀ podem variar de acordo com as variações ambientais e de manejo aplicadas na plantação, contudo a variação é baixa e não interfere muito em plantas com altos valores (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Extratos com alta toxicidade no teste com *Artemia salina* mostram boa correlação com atividades inseticida (KABARU; GICHIA, 2001; LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006) e tripanosomicida (ALVES *et*

al., 2000). Contudo extratos com baixa toxicidade possuem propriedades desejáveis para utilização no controle de parasitas no ambiente (RUIZ *et al.*, 2005). Os resultados encontrados nos testes fitoquímicos aliados ao resultado neste teste fazem com que os extratos produzidos possuam propriedades antiparasitárias e ao mesmo tempo não sejam tóxicos ao meio ambiente. Ramazari *et al.* (2010) pesquisando a toxicidade, com o mesmo teste por nós realizado, com cinco plantas diferentes de *Artemisia* sp. verificou que a *A. scoparia* e *A. dracunculus* demonstraram toxicidade mediana (DL50 100–500 µg/mL). Já a *A. vulgaris*, *A. annua* e *A. absinthium* apresentaram baixa toxicidade (DL50 >1,000 µg/ml). Logo, os dados encontrados neste ensaio corroboram com os dados encontrados na literatura.

Observando os resultados encontrados nos ensaios antioxidantes, vê-se que os extratos hidroalcoólicos apresentaram uma ótima atividade. Mesmo o extrato aquoso apresentando um efeito menor, podemos considerá-lo bom também. Extrações aquosas tendem a possuir uma menor atividade antioxidante, devido a menor quantidade de compostos mais polares retidos durante a extração (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004).

Os radicais livres vem sendo muito estudados, pois possuem grande importância no envelhecimento celular e em outros transtornos metabólicos, entre os quais está o declínio do sistema imune (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Os compostos antioxidantes estabilizam ou desativam os radicais livres antes que ataquem as células (ATOUI *et al.*, 2005), por meio retardatório ou inibitório da oxidação de substratos oxidáveis (MORAIS *et al.*, 2009). Portanto, uma boa atividade antioxidante é uma característica desejável para a formulação de um antiparasitário, tanto pela defesa direta do organismo dos danos oxidativos quanto pela melhoria do estado imunológico geral (FLOHE; HECHT; STEINERT, 1999).

Artemisa annua é uma das quatro plantas com maior capacidade de absorção do oxigênio radical (ORAC) (BRISIBE *et al.*, 2009). Possivelmente essa elevada atividade antioxidante se deve ao elevado conteúdo fenólico presente na planta, uma vez que a planta apresenta mais de 50 compostos fenólicos distintos, sendo a maioria pertencente ao grupo dos flavonóides (FERREIRA; LUTHRIA; SASAKI, 2010).

3.5 CONCLUSÃO

Diversos compostos com propriedades antiparasitárias foram encontrados nos testes. Logo, se concluí que os extratos de *Artemisia annua* obtidos nas metodologias descritas neste trabalho são possíveis candidatos a serem fitoterápicos eficazes frente a diversas doenças parasitárias. Os resultados obtidos apontam para um horizonte de possibilidades em que os produtos podem ser pesquisados. Contudo, testes frente a estes parasitas são necessários para elucidar a real atividade antiparasitária destes extratos.

REFERÊNCIAS

ALLEN, P. C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. **Poultry Science**, v. 76, p.1156–1163, 1997.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, 2002. .

ALMEIDA, G. F.; HORSTED, K.; THAMSBORG, S. M.; KYVSGAARD, N. C.; FERREIRA, J. F. S.; HERMANSEN, J. E. Use of *Artemisia annua* as a natural coccidiostat in free-range broilers and its effects on infection dynamics and performance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 178-187, 2011.

ALMEIDA, P. A.; DA SILVA, T. M. S.; ECHEVARRIA, A. Mesoionic 5-alkyl-1, 3-dithiolium-4-thiolates: Synthesis and brine shrimp toxicity. **Heterocyclic Communications**, v. 8, n. 6, p. 593-600, 2011.

ALVES, T. M. D.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

AMARANTE, A. D.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 91-106, 2004.

ARAB, H. A.; RAHBARI, S.; RASSOULI, A.; MOSLEMI, M. H.; KHOSRAVIRAD, F. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. **Tropical animal health and production**, v. 38, n. 6, p. 497-503, 2006.

ATOUI, A. K. ; MANSOURI, A. ; BOSKOU, G. ; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2, p. 261-265, 2001.

BHAKUNI, R. S.; JAIN, D. C.; SHARMA, R. P.; KUMAR, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. **Current Science-Bangalore**, v. 80, n. 1, p. 35-48, 2001.

BLANKE, C. H.; NAISABHA, G. B.; BALEMA, M. B.; MBARUKU, G. M.; HEIDE, L.; MÜLLER, M. S. Herba *Artemisiae annuae* tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double-blind clinical trial. **Tropical Doctor**, v. 38, n. 2, p. 113-116, 2008.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P. M.; FERREIRA, J. F. S.; LUTHRIA, D.; WU, X.; PRIOR, R. L. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. **Food chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1240-1246, 2009.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; OWAI, P. U.; BRISIBE, F. Dietary inclusion of dried *Artemisia annua* leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4083–4092, 2008.

CELEGHINI, R. M. S.; SOUSA, I. M. O.; SILVA, A. P.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A. Development and validation of analytical methodology by HPLC-IR for evaluation of artemisinin on *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 875-878, 2009.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 491-497, 2005.

CHAVAN, U. D. SHAHIDI, F.; NACZK, M.. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, v. 75, p. 509-512, 2001.

CONDER, G. A.; CAMPBELL, W. C. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**, v. 35, p. 1-84, 1995.

DAVIES, M. J.; ATKINSON, C. J.; BURNS, C.; WOOLLEY, J. G.; HIPPS, N. A.; ARROO, R. R. J.; DUNGEY, N.; ROBINSON, T.; BROWN, P.; FLOCKART, I.; HILLS, C.; SMITH, L.; BENTLEY, S. Enhancement of artemisinin concentration and yield in response to optimization of nitrogen and potassium supply to *Artemisia annua*. **Annals of Botany**, v. 104, n. 2, p. 315-323, 2009.

DEBNATH, C.; DOBERNIG, A.; SAHA, P.; ORTNER, A. J. Lectrochemical Determination of Artemisinin in *Artemisia annua* L. Herbal Tea Preparation and Optimization of Tea Making Approach. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 55, n. 1, p. 57-62, 2011.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; ARRIAGA-ALBA, M.; CASTAÑEDA-CORRAL, G.; ANGELES-LÓPEZ, G. E.; NAVARRETE, A.; MATA, R. J. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 334-342, 2007.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 241-248, 1998.

DORMAN, H. J.; HILTUNEN, R. Fe(II) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 193-199, 2004.

DUH, P. D. J. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 4, p. 455-461, 1998.

FERNÁNDEZ-CALIENES VALDÉS, A.; MENDIOLA MARTÍNEZ, J.; MONZOTE FIDALGO, L.; GARCÍA PARRA, M.; SARIEGO RAMOS, I.; ACUÑA RODRÍGUEZ, D.; LIZAMA, R. S.; GUTIÉRREZ GAITÉN, Y. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 61, n. 3, p. 254-258, 2009.

FERREIRA, J. F. S.; LUTHRIA, D. L.; SASAKI, T. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3135-3170, 2010.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**, 1 ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

FLORES, W.; FUENTES, R.; GALINDO, D.; GONZÁLES, F.; HERNÁNDEZ, G.; HERNÁNDEZ, K.; HIDALGO, I.; ZAMUDIO DEL CARPIO, D.; CASTAÑEDA, B.; IBÁÑEZ, L.; LARREA, Evaluación de los efectos antioxidante, antibacteriano y antifúngico de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Lagarto caspi). **Revista Horizonte Médico/ Volumen**, v. 8, n. 2, p.7-16, 2008.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova**, v. 31, p. 1427-1430, 2005.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GORDON, M. H. In: **Food Antioxidants**. HUDSON, B. J. F. Elsevier Applied Science: London, 1990, p 1-18.

GOUPY, P. ; DUFOUR, C. ; LOONIS, M. ; DANGLES, O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 615-622, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of iron in Oxygen Radical Reactions. **Methods In Enzymology**, v. 105, p. 47-56, 1984.

HUR, S. N.; MOLAND, A. L.; CHA, J. O. Effects of feeding condensed tannin-containing plants on natural coccidian infection in goats. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 9, p. 1262-1266, 2005.

KABARU, J. M.; GICHIA, L. Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove tree *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) Lam. against three arthropods. **African Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 44-49, 2009.

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

KEISER, J.; UTZINGER, J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 605-612, 2007.

KERBOEUF, D., RIOU, M., GUEGNARD, F., Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 116–128, 2008.

KIM, J. T.; PARK, J. Y.; SEO, H. S.; OH, H. G.; NOH, J. W.I.; KIM, J. H.; KIM, D.Y.; YOUN, H. J. In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 103, n. 1, p. 53-63, 2002.

KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA, I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the total environment**, v. 387, n. 1, p. 166-174, 2007.

KRISHNA, S.; BUSTAMANTE, L.; HAYNES, R. K.; STAINES, H. M. Artemisinins: their growing importance in medicine. **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 10, p. 520-527, 2008.

KRYCHAK-FURTADO, S.; NEGRELLE, R. B.; MIGUEL, O. G; ZANIOLO, S. R.; KAPRONEZAI, J.; RAMOS, S. J.; SOTELLO, A. The effect of *Carica papaya* L.(caricaceae) and *Musa paradisiaca* Linn.(musaceae) on the development of gastrointestinal nematode eggs from ovine. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 191-197, 2005.

KUMAR, S.; GUPTA, A. K.; PAL, Y.; DWIVEDI, S. K. J. In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 11, p. 1171-1175, 2003.

LEE, S. E.; HWANG, H. J.; HA, J. S.; JEONG, H. S.; JEONG H. K. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life sciences**, v. 73, n. 2, p. 167-179, 2003.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 158-163, 2006.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, C. M. C. P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 531-536, 2006.

LUCHESE, F. C.; PERIN, M.; AITA, R. S.; MOTTIN, V. D.; MOLENTO, M. B.; MONTEIRO, S. G. Prevalência de espécies de *Eimeria* nos frangos de criação industrial e alternativa. **Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

LUCHESE, F. C.; PERIN, M.; AITA, R. S.; MOTTIN, V. D.; MOLENTO, M. B.; MONTEIRO, S. G. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

LUXIMON-RAMMA A., BAHORUN T., SOOBRAATTEE M. A., ARUOMA O. I., J. Antioxidant Activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in Extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5042-5047, 2002.

MAGIERO, E. C.; ASSMANN, J. M.; MARCHESE, J. A.; CAPELIN, D.; PALADINI M. V.; TREZZI, M. M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

MARCHESE, J. A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1999; 117p.

MARTINS, G. F.; BOGADO, A. L. G.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; GARCIA, J. S. Uso de vacinas no controle da coccidiose aviária. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1165-1176, 2012.

MATOS, F. J. A.; **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. EUFC: Fortaleza, 1998.

MCCANN, M. E. E.; NEWELL, E.; PRESTON, C.; FORBES, K. The use of mannan-oligosaccharides and/or tannin in broiler diets. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 9, p. 873-879, 2006.

MCDONALD, S.; PRENZLER, P.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, v. 73, p. 73-84, 2001.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. In: **Studies in Natural Products Chemistry**; Rahman. Elsevier Applied Science: London, p. 383-409, 1991.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão. **Ciência Animal**, v. 12, n. 1, p. 35-45, 2002.

MENON, R. B.; KANNOTH, M. M; TEKWANI, B. L.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; AVERY, M. A. A new library of C-16 modified artemisinin analogs and evaluation of their anti-parasitic activities. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 9, n.10, p. 729-741, 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E., MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 2 ed. São Paulo: Robe Editorial, 2004.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n.6, p. 1469-1477, 2005.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MUELLER, M. S.; RUNYAMBO, N.; WAGNER, I.; BORRMANN, S.; DIETZ, K.; HEIDE, L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 318-321, 2004.

NAGAI, A.; YOKOYAMA, N.; MATSUO, T.; BORK, S.; HIRATA, H.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Growth-inhibitory effects of artesunate, pyrimethamine, and pamaquine against *Babesia equi* and *Babesia caballi* in in vitro cultures. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 800-803, 2003.

NAIDOO, V.; MCGAW, L. J.; BISSCHOP, S. P. R.; DUNCAN, N.; ELOFF, J. N. The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. **Veterinary parasitology**, v. 153, n. 3, p. 214-219, 2008.

NAKASHIMA, T. **Fitoquímica experimental**. 1 ed., UFPR: Curitiba, 1994.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, s. 18, p. 718-723, 2008.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1705-1721, 2010.

OLIVO, C. J.; HEIMERDINGER, A.; ZIECH, M. F.; AGNOLIN, C. A.; MEINERZ, G. R.; BOTH, F.; CHARÃO, P. S. Aqueous extract of rope tobacco for the control of cattle ticks. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1131-1135, 2009.

OYAIZU, M. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition [Eiyogaku Zasshi]**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PEREIRA, J. R. Práticas de controle e prevalência de helmintos gastrintestinais parasitos de bovinos leiteiros em Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n.1, p. 16-22, 2011.

PERES, M. T. L. P. ; SIMIONATTO, E. ; HESS, S. C. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 897-901, 2009.

RAMOS, C. I.; SOUZA, A. P.; AVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOLL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.34, n. 6, p.1889-1895, 2004.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 98-102, 2005.

SAM, T. W. In: **Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination**; COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. Boca Raton, 1993.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2 ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia: Belo Horizonte, 2002.

SEN, R.; BANDYOPADHYAY. S.; DUTTA, A.; MANDAL, G.; GANGULY, S.; SAHA, P.; CHATTERJEE, M. J. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1213-1218, 2007.

SILVA, F. M. **Verificação da Eficiência dos Bioensaios com Extratos Aquosos no Diagnóstico de Potencial Alelopático: Contribuição ao Estudo de Espécies Nativas Brasileiras**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - (UFRGS), Porto Alegre, 2004. 96 f.

SOBRAL, F.E.S.; BRANDÃO, P.A.; ATHAYDE, A.C.R. Utilização de fitoterápicos no tratamento de parasitoses em galinhas caipira criadas em sistema semiextensivo. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2010.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

STERMITZ, F. R.; SCRIVEN, L. N.; TEGOS, G.; LEWIS, K. Two flavonols from *Artemisa annua* which potentiate the activity of berberine and norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Planta medica**, v. 68, n. 12, p. 1140-1141, 2002.

TODA, S. Antioxidative effects of polyphenols from leaves of *Artemisia princeps* PAMP on lipid peroxidation in vitro. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 305-312, 2005.

União Brasileira de Avicultura – UBABEF, 2012. Disponível em: <http://pecuaria.ruralbr.com.br/noticia/2012/01/avicultura-bate-recordes-historicos-em-2011-anuncia-ubabef-3625350.html>. Acessado em: 12 de dezembro de 2012.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; N'DRI, A.; LENGELER, C.; XIAO, S.; TANNER, M. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. **Lancet**, v. 355, p. 1320-1325, 2000.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERMEULEN, A. N.; SCHAAP, D. C.; SCHETTERS, T. H. P. M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 1-2, p. 13-20, 2001.

VIEIRA, L. S. **Alternativas de controle de verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes**. EMBRAPA CAPRINOS, Sobral, 2003 (Circular Técnica 29).

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; PEREIRA, M. F.; DANTAS, L. B.; XIMENES, J. F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North-East Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Medicine Veterinaire**, v. 150, n. 5, p. 447-452, 1999.

WALLAART, T. E.; PRAS, N.; BEEKMAN, A. C.; QUAX, W. J. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. **Planta medica**, v. 66, n. 1, p. 57-62, 2000.

WANG, M. L.; SUO, X.; GU, J. H.; ZHANG, W. W.; FANG, Q.; WANG, X. Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: effect on chicken coccidiosis and antioxidant status. **Poultry science**, v. 87, p. 11, p. 2273-2280, 2008.

WEATHERS, P. J.; ARSENAULT, P. R.; COVELLO, P. S.; MCMICKLE, A.; TEOH, K. H.; REED, D. W. Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 173-183, 2011.

WHO. **World malaria report 2005**. Genebra, 2005.

WILLCOX, M.; BODEKER, G.; BOURDY, G.; DHINGRA, V.; FALQUET, J.; FERREIRA, J. F. S.; GRAZ, B.; HIRT, H. M.; HSU, E.; MAGALHÃES, P. M.; PROVENDIER, D.; WRIGHT, C. W. **Artemisia annua as a traditional herbal antimalarial**. Traditional Medicinal Plants and Malaria, RC Press, Boca Raton, 2004; p. 43-59.

WU, J. H.; TUNG, Y. T.; WANG, S. Y.; SHYUR, L. F.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5917-5921, 2005.

YIN, G.; LIU, X.; ZOU, J.; HUANG, X.; SUO, X. Co-expression of reporter genes in the widespread pathogen *Eimeria tenella* using a double-cassette expression vector strategy. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 8, p. 813-816, 2011.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. J. Antioxidants in health and disease. **Journal of clinical pathology**, v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, v. 90, p. 199-206, 2005.

YUAN, C.; HUANG, X.; CHENG, L.; BU, Y.; LIU, G.; YI, F.; SONG, F. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 581-584, 2009.

ZHANG, L., JING, F., LI, F., LI, M., WANG, Y., WANG, G.; TANG, K. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 52, n. 3, p. 199-207, 2009.

ZHOU, K.; YU, L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, p. 717-721, 2004.

4. ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DE EXTRATOS DE *ARTEMISIA ANNUA* CONTRA PARASITOS GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS

RESUMO

Um dos maiores problemas enfrentados na caprinocultura é a resistência anti-helmintica encontrada em diversas populações de nematódeos gastrintestinais no mundo. O objetivo desse trabalho foi determinar a composição química e a eficácia *in vitro* de fitoterápicos obtidos a partir da *Artemisia annua* contra os parasitos gastrintestinais de caprinos. Foram produzidos três extratos: um extrato aquoso (Aq.), um hidroalcoólico de 7 dias (H.7) e outro de 30 dias (H.30). Realizou-se com eles a marcha fitoquímica completa; dosagem de artemisinina em HPLC; dosagem de fenóis totais; ensaios de atividade antioxidante e ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*. A seguir foram realizados os teste de eclodibilidade larvar (TEL) e teste de migração larvar em agar (TMLA), em seis replicatas, com diferentes concentrações (0,78 a 50 mg/mL⁻¹). No TEL, a eficácia do H.7 variou de 91,33±2,26 na maior concentração a 12,56±0,61% na menor concentração, no H.30 os valores foram de 91,08±3,21 a 11,67%±1,67% e no Aq. os valores de eficácia encontrados variaram de 79,66±3,26 a 2,89±2,58%. No teste TMLA os valores encontrados para o H.7 foram 85,44±2,26% a 2,37±0,55%, no H.7 obteve-se 83,34±1,97 a 2,14±0,78% e para o Aq. 69,97±1,29 a 1,83±0,67%. Nos exames fitoquímicos, foram evidenciados diversos compostos químicos com propriedades de combater os nematódeos, tanto direto como indiretamente. Os resultados obtidos evidenciaram que a planta possui um alto potencial de combater esses parasitas e que novos estudos necessitam serem realizados buscando maximizar a eficácia dos extratos, uma vez que eles demonstraram boas atividades em ambos os experimentos.

Palavras-chave: controle alternativo, fitoterapia, resistência parasitária

OVICIDAL AND LARVICIDAL ACTIVITY OF ARTEMISIA ANNUA EXTRACTS AGAINST GASTROINTESTINAL PARASITES OF GOATS

ABSTRACT

One of the biggest problems facing in goats production is anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in diverse populations around the world. Seeking a solution to this problem, the objective of this study was to analyze the chemical composition and to evaluate the in vitro efficacy of distinct herbal extracts from *Artemisia annua* against these parasites. Three extracts were produced: an aqueous (Aq.), a hydroalcoholic 7 days (H.7) and another 30 days (H.30) and were made the complete phytochemical march; dosage of artemisinin in HPLC; dosage of total phenols, antioxidant activity assays and toxicity test. The following tests were performed larval hatching (TEL) and migration test larvae on agar (TMLA) in six replicates, with different concentrations (from 0.78 to 50 mg/mL⁻¹). In TEL, the effectiveness of H.7 ranged from 91.33 ± 2.26 at the highest concentration to $12.56 \pm 0.61\%$ at the lowest concentration, H.30 values were 91.08 ± 3.21 to 11.67% and the Aq. efficacy values ranged from 79.66 ± 3.26 to $2.89 \pm 2.58\%$. In the test TMLA values were found for the H.7 $85.44 \pm 2.26\%$ and $2.37 \pm 0.55\%$ in H.7 gave 83.34 ± 1.97 to $2.14 \pm 0.78\%$, Aq. 69.97 ± 1.29 to $1.83 \pm 0.67\%$. In the phytochemical exams, were shown many chemical compounds with several properties to combat nematodes, both directly and indirectly. The results showed that the plant extracts have many important biological composts to combat *Eimeria* sp. and is a promissory potential phytoterapic to combat these parasites. Further studies need to be conducted to maximize the effectiveness of the extracts, since they showed good activity in both experiments.

Keywords: alternative methods, herbal medicine, parasite resistance

4.1 INTRODUÇÃO

O tamanho do rebanho brasileiro de caprinos é estimado em 9,5 milhões, representando assim uma importante atividade pecuária no país (COSTA *et al.*, 2011). Contudo, as parasitoses gastrintestinais causadas por nematódeos representam um dos principais entraves a produção, chegando em alguns casos a inviabilizá-la (VIEIRA 2008). Os prejuízos diretos causados por ela ocorrem principalmente pela diminuição da produção de leite, carne e também pela mortalidade de alguns animais (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2006). Já os indiretos resultam do dinheiro gastado para controlar as infecções.

Normalmente, o controle parasitário aplicado em caprinos é realizado com a utilização indiscriminada de anti-helmínticos pertencentes a diversas classes químicas, muitas vezes sem considerar os fatores epidemiológicos envolvidos (FALBO *et al.*, 2009). Contudo, essa utilização dos fármacos de modo supressivo aliado às falhas de manejo contribui para o estabelecimento de parasitas resistentes aos produtos (ALMEIDA *et al.*, 2010). A resistência parasitária é um fenômeno biológico no qual uma droga não produz a mesma eficácia frente aos nematódeos após certo tempo, quando utilizada nas mesmas condições (CONDER *et al.*, 1995). Devido ao efeito seletivo, a eficácia de qualquer fármaco antiparasitário pode diminuir bruscamente, favorecendo a permanência da população resistente e a eliminação de indivíduos susceptíveis (MOLENTO, 2005). Outro problema é a deposição de compostos químicos no meio ambiente decorrente do uso desses produtos, que pode acarretar em distúrbios ecológicos (BEYNON, 2012).

A busca por soluções frente a esses problemas levou a descoberta de diversas outras propostas de manejo e novas ferramentas biotecnológicas. Dentre estas novas inovações destacam-se o desenvolvimento de vacinas contra helmintos, utilização de raças de animais resistentes a parasitoses, fungos predadores e diversas estratégias de tratamento parasitário seletivo (AMARANTE, 2010). Todavia, essas metodologias ainda estão em fase de aprimoramento ou não resolvem o problema de maneira satisfatória (VASCONCELOS, 2010).

Por outro lado, os produtos fitoterápicos não deixarem resíduos tóxicos significativos em alimentos e no ambiente e apresentam baixo custo de produção

(OLIVO *et al.*, 2009). A fitoterapia é um ramo da medicina que vem crescendo notavelmente nos últimos anos (Oliveira *et al.*, 2009), devido ao crescente interesse da indústria em compostos a partir de extratos vegetais é estimulada pela necessidade de novos produtos que não sejam agressivos ao homem, aos animais e ao meio ambiente (MENDES *et al.*, 2007). O Brasil é um país privilegiado neste aspecto, tendo em vista que abriga um quarto da flora mundial conhecida (MARINHO *et al.*, 2007). Além disso, compostos antiparasitários a base de extratos vegetais são uma alternativa frente à resistência, uma vez que como os parasitas nunca foram expostos aos princípios ativos presentes nestes produtos o processo de resistência demorará a ocorrer (BROGLIO-MICHELETTI *et al.*, 2010).

O gênero *Artemisia* é o mais importantes na família Asteraceae, constituído por mais de 800 espécies amplamente distribuídas em todo o mundo (MIRJALILI *et al.*, 2007). Dentro do mesmo se encontra a *Artemisia annua*, erva medicinal de origem chinesa, uma das plantas mais estudadas atualmente para a produção de fitoterápicos (HASHMINIA *et al.*, 2011). O seu principal metabólito é uma lactona sesquiterpênica extraída de suas folhas, chamada artemisinina (RODRIGUES *et al.*, 2006). Além dela, também contém outras biomoléculas ativas como monoterpenóides, flavonóides, cumarinas, esteróides, purinas, fenólicos, terpenos, lipídios, e compostos alifáticos (BHAKUNI *et al.*, 2002).

Ela tem sido estudada em diversos centros de pesquisas do mundo e diversas são as atividades biológicas citadas (EFFERTH *et al.*, 2011). Na área da parasitologia foram comprovadas a sua atividade frente a diversos parasitas, entre os quais estão *S. mansoni* (UTZINGER *et al.*, 2000; UTZINGER *et al.*, 2007); *Schistosoma japonicum*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* e *Opisthorchis viverrini* (KEISER; UTZINGER, 2007); *Leishmania* sp. (MENON *et al.*, 2006), *Neospora caninum* (Kim *et al.*, 2002), *Trypanosoma* sp. (MISHINA *et al.*, 2007), *Toxoplasma gondii* (JONES-BRANDO *et al.*, 2006), *Eimeria* sp. (BRISIBE *et al.*, 2008; de ALMEIDA *et al.*, 2011) e *Plasmodium falciparum* (BRISIBE, 2006).

O presente estudo foi desenvolvido para avaliar a eficácia anti-helmíntica de extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas de *A.annua* sobre a eclodibilidade dos ovos e migração larval em testes *in vitro* contra nematódeos gastrointestinais de caprinos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Ver página 70.

4.2.2 Preparação dos extratos

Ver página 70.

4.2.3 Caracterização fitoquímica

Ver página 71.

4.2.4 Dosagem da artemisinina

Ver página 71.

4.2.5 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Ver página 72.

4.2.6 Determinação dos polifenóis totais

Ver página 72.

4.2.7 Ensaio antioxidantes

Ver página 73.

4.2.8 Recuperação dos ovos

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de caprinos previamente selecionados, com OPG superior a 2000. O pool de 20 gramas de fezes foi processada seguindo o protocolo de COLES et al. (1992), modificado por BIZIMENYERA et al. (2006). As fezes foram maceradas e homogeneizadas em água aquecida a 40°C e filtradas em uma sequência de peneiras com malhas contendo poros de 400 µm, 250 µm, 150 µm, 75 µm e 25 µm. Após esta sequência de lavagem com água destilada, os ovos coletados da última peneira e distribuídos em tubos tipo falcon de 50 mL para serem centrifugados. A primeira centrifugação ocorreu em 2000 rpm x 5 minutos, para em seguida ser descartado o sobrenadante e completar-se com solução salina saturada para a ressuspensão do sedimento. Novamente o material foi centrifugado nas mesmas condições que a anterior e o sobrenadante foi lavado na peneira de 25 µm com água destilada, até a retirada total da solução salina. O conteúdo da peneira foi transferido para um cálice de sedimentação, onde permaneceu por uma hora à temperatura ambiente. Por fim, os ovos foram recuperados, transferidos para um Becker e quantificados em alíquotas de 55 µL com aproximadamente 200 ovos.

4.2.9 Teste de eclodibilidade larvar (TEL - *Egg Hatch Test*)

O protocolo utilizado para TEL foi descrito por Coles et al. (1992), modificado por Bizimnyera et al. (2006). Aproximadamente 55 µL da suspensão contendo 200 ovos foram acondicionados em cada poço de placas de 24 poços. Calculado o volume final de 1 mL para cada poço, os tratamentos fitoterápicos foram preparados nas concentrações: 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.562 e 0.781 mg.mL⁻¹. Objetivando a melhor diluição do extrato, foi adicionado DMSO a 3%. Para completar o volume final foi adicionado água destilada nos poços. O controle negativo foi feito com água destilada, já os controles positivos foram realizados com o emulsificante DMSO a 3% e o outro com albendazol 0,63 mg.mL⁻¹. As placas foram identificadas e colocadas em B.O.D por 24h, com temperatura controlada em 27°C e umidade relativa acima de 80%. Transcorrido este tempo, adicionou-se uma gota de lugol em cada poço, para inibir possíveis eclosões, e então se fez a contagem dos ovos e das larvas que eclodiram (L₁) em microscópio invertido. Seis replicatas foram realizadas para cada tratamento e também para os controles. No cálculo da porcentagem de eficácia, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Eclodibilidade (\%)} = L1 / (\text{ovos} + L1) \times 100$$

4.2.10 Teste de migração de larvas em Ágar (TMLA – *Agar Larval Migration Assay*)

Nesta etapa o teste TMLA foi utilizado com a metodologia desenvolvida por D'Assonville *et al.* (1996) e modificada por Molento e Prichard (2001). Previamente foi realizada uma coprocultura de um pool de fezes de caprinos com alta carga parasitária. Após 7 dias, as larvas foram coletadas e identificadas: 86% *Haemonchus* sp., 11% *Trichostrongylus* sp., 3% *Strongyloides* sp. As larvas infectantes (L₃) foram colocadas em contato com solução de hipoclorito de sódio 0,08%, em estufa tipo B.O.D e à temperatura de 27°C, durante aproximadamente 2 h. Quando mais de 90% das larvas viáveis estavam sem a bainha, o material foi lavado três vezes com água destilada e separado em alíquotas de 0,5 mL, contendo aproximadamente 200 larvas. Então,

adicionou-se 0,5 mL de solução contendo os tratamentos em diferentes concentrações diluídos em DMSO 3% (50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.562 e 0.781 mg.mL⁻¹), adicionados de água destilada para completar o volume. O controle negativo foi feito com água destilada, já o controle positivo foi realizado com o emulsificante DMSO a 3% e o outro com moxidectina 0,63 mg.mL⁻¹. Após homogeneização, esta solução foi mantida na mesma estufa e nas mesmas condições por mais 6 h. Transcorrido este período, colocou-se 1 mL de solução de ágar, 1,4% a 45° C e se transferiu tudo para uma placa de Petri preparada para o teste. Esta placa foi mantida na B.O.D e exposta a luz incandescente com 4 lâmpadas de 60W, por 18 h. Após este tempo, a porção líquida foi transferida para um tubo plástico de 50 mL, centrifugadas a 2000 rpm por 3 min, para então serem transferidas para poços das placas de 24 poços. Por fim, fez-se a contagem das larvas migrantes em microscópio invertido. Seis replicatas foram realizadas para cada tratamento e também para os controles.

4.2.11. Análise estatística

Para analisar a toxicidade frente a *Artemia salina* se utilizou a análise de regressão não linear. Em todos os casos os resultados apresentados correspondem à média da triplicata (n=3) ± desvio padrão da média. Já para determinar a CL₅₀ dos extratos no teste de inibição da eclodibilidade e migração larvar, a média corresponde a 6 replicatas. Nos outros testes, os dados foram comparados por análise de variância pelo teste de ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.

4.3 RESULTADOS

Os resultados da marcha fitoquímica (Tabela 1), dosagem de artemisinina (Quadro 1), teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (Quadro 2), quantificação de fenóis totais (Quadro 3), ensaios antioxidantes (Gráfico 1, 2 e 3; Quadro 4) estão dispostos entre as páginas 76 a 82.

Os resultados da inibição da eclodibilidade larvar estão ilustrados na Tabela 2. Os melhores valores de eficácia obtidos foram encontrados na concentração de 50 mg/mL, no H.7 ($91,33 \pm 2,26\%$) e no H.30 ($91,08 \pm 3,21\%$), sendo estes valores semelhantes ao controle positivo (albendazol $0,63 \text{ mg.mL}^{-1}$) ($P > 0,05$). O extrato aquoso, obteve sua maior eficácia com $79,66 \pm 3,26\%$, sendo também nessa concentração. Nos três casos, os resultados demonstraram um efeito dose-dependente, onde quanto maior a concentração dos extratos, maior o efeito sobre os ovos.

TABELA 2 - PERCENTUAL MÉDIO (\pm DESVIO PADRÃO) DE INIBIÇÃO DA ECLOSÃO LARVAR DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS NO TESTE TEL COM OS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

Concentração (mg.mL^{-1})	Extratos		
	H.7	H.30	Aq.
50,0	$91,33 \pm 2,26\%$ Aa	$91,08 \pm 3,21\%$ Aa	$79,66 \pm 3,26\%$ Bb
25,0	$80,22 \pm 0,89\%$ Ab	$79,78 \pm 0,79\%$ Ab	$68,56 \pm 0,76\%$ Bc
12,5	$70,58 \pm 1,13\%$ Ac	$67,56 \pm 1,56\%$ Ac	$55,43 \pm 0,78\%$ Bd
6,25	$65,33 \pm 2,34\%$ Ac	$64,44 \pm 3,31\%$ Ac	$39,33 \pm 1,11\%$ Be
3,12	$39,37 \pm 1,34\%$ Ad	$39,67 \pm 2,24\%$ Ad	$17,84 \pm 1,03\%$ Bf
1,56	$22,87 \pm 1,67\%$ Ae	$22,99 \pm 2,89\%$ Ae	$3,67 \pm 0,89\%$ Bg
0,78	$12,56 \pm 0,61\%$ Af	$11,67 \pm 1,97\%$ Af	$2,89 \pm 2,58\%$ Bg
C -	$1,34 \pm 0,74\%$ Ag	$1,72 \pm 0,27\%$ Ag	$1,99 \pm 0,34\%$ Ag
DMSO (3%)	$1,04 \pm 0,67\%$ Ag	$1,26 \pm 0,89\%$ Ag	$1,57 \pm 0,97\%$ Ag
C +	$97,87 \pm 0,99\%$ Aa	$97,56 \pm 1,34\%$ Aa	$98,23 \pm 0,34\%$ Aa
CL ₅₀	$5,83 \text{ mg/mL}^{-1}$	$6,14 \text{ mg/mL}^{-1}$	$11,17 \text{ mg/mL}^{-1}$

Aq.= Extrato aquoso; H.7= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H.30= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; C - = Água destilada; C + = albendazol $0,63 \text{ mg.mL}^{-1}$; CL₅₀ = concentração letal para 50% dos ovos. Letras maiúsculas comparam médias nas linhas e letras minúsculas nas colunas; letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Os resultados do TMLA se encontram na Tabela 3. O extrato H.7 inibiu, na maior concentração utilizada, $85,44 \pm 2,26\%$ da migração larvar. Este valor é estatisticamente semelhante ($P < 0,05$) ao encontrado no H.30, que obteve $80,34 \pm 1,97\%$. Estes dois resultados são estaticamente diferentes ($P < 0,05$) ao controle positivo (moxidectina $0,63 \text{ mg/mL}^{-1}$) que apresentou mais de 98% de eficácia. O Aq. apresentou médias em todas as concentrações que diferiram dos demais extratos testados ($P > 0,05$), sendo que em 50 mg.mL^{-1} , obteve $69,97 \pm 1,29\%$ de eficácia Assim como no teste anterior, os dados sao totalmente dose-dependente.

TABELA 3 - PERCENTUAL MÉDIO (\pm DESVIO PADRÃO) DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS NO TESTE TMLA COM OS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

Concentração (mg.mL^{-1})	Extratos		
	H.7	H.30	Aq.
50,0	$85,44 \pm 2,26\% \text{Ab}$	$83,34 \pm 1,97\% \text{Ab}$	$69,97 \pm 1,29\% \text{Bb}$
25,0	$72,91 \pm 1,34\% \text{Ac}$	$70,26 \pm 0,91\% \text{Ac}$	$53,56 \pm 0,76\% \text{Bc}$
12,5	$59,03 \pm 1,47\% \text{Ad}$	$56,56 \pm 2,59\% \text{Ad}$	$35,14 \pm 1,45\% \text{Bd}$
6,25	$46,44 \pm 2,03\% \text{Ae}$	$43,34 \pm 1,69\% \text{Ae}$	$19,78 \pm 1,73\% \text{Be}$
3,12	$27,13 \pm 1,04\% \text{Af}$	$27,05 \pm 1,76\% \text{Af}$	$9,44 \pm 1,56\% \text{Bf}$
1,56	$13,14 \pm 2,34\% \text{Ag}$	$12,35 \pm 2,03\% \text{Ag}$	$2,16 \pm 0,55\% \text{Bg}$
0,78	$2,37 \pm 0,55\% \text{Ah}$	$2,14 \pm 0,78\% \text{Ah}$	$1,83 \pm 0,67\% \text{Ag}$
C -	$1,73 \pm 0,39\% \text{Ah}$	$1,43 \pm 0,77\% \text{Ah}$	$1,66 \pm 0,58\% \text{Ag}$
DMSO (3%)	$1,42 \pm 0,33\% \text{Ah}$	$1,56 \pm 0,39\% \text{Ah}$	$1,77 \pm 0,78\% \text{Ag}$
C +	$98,86 \pm 0,76\% \text{Aa}$	$98,25 \pm 0,93\% \text{Aa}$	$98,99 \pm 0,37\% \text{Aa}$
CL ₅₀	$6,72 \text{ mg/mL}^{-1}$	$10,88 \text{ mg/mL}^{-1}$	$23,07 \text{ mg/mL}^{-1}$

Aq.= Extrato aquoso; H.7= Extrato hidroalcoólico de 7 dias; H.30= Extrato hidroalcoólico de 30 dias; C - = Água destilada; C + = moxidectina $0,63 \text{ mg.mL}^{-1}$; CL₅₀ = concentração letal para 50% dos ovos. Letras maiúsculas comparam médias nas linhas e letras minúsculas nas colunas; letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

GRÁFICO 4 – CURVA DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE NO TESTE DE ECLODIBILIDADE LARVAR COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE 7 DIAS OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

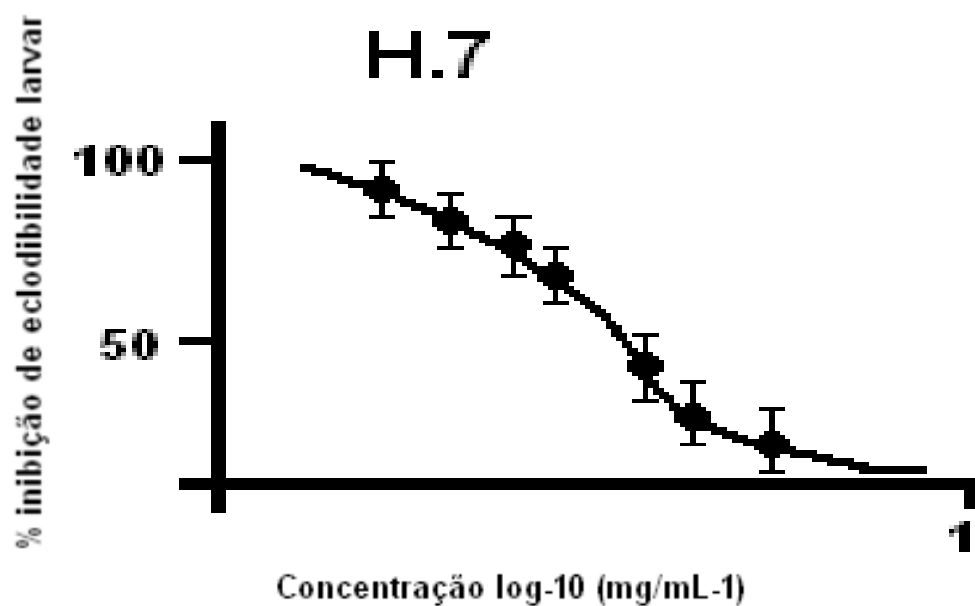


GRÁFICO 5 – CURVA DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE NO TESTE DE ECLODIBILIDADE LARVAR COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE 30 DIAS OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

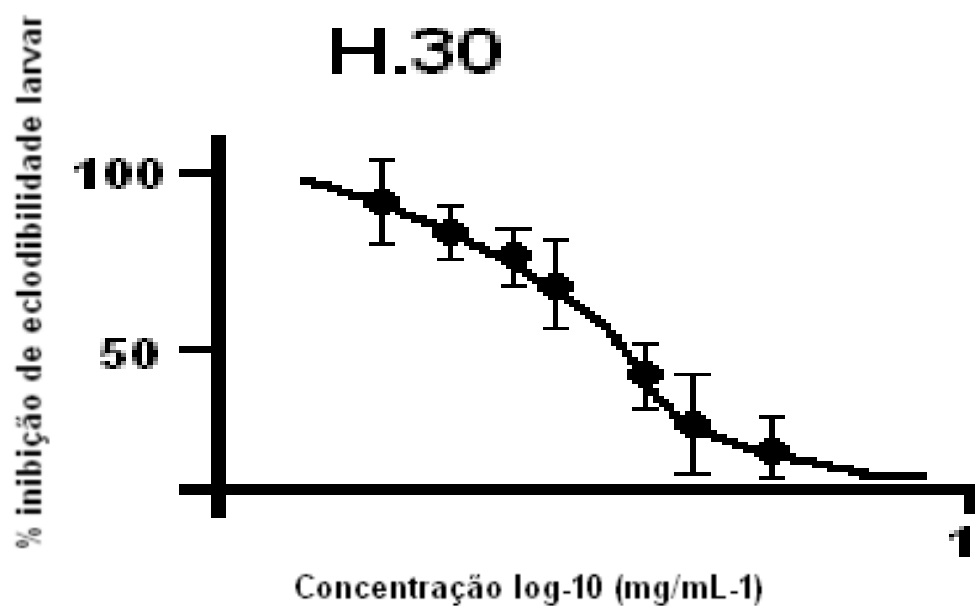


GRÁFICO 6 – CURVA DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE NO TESTE DE ECLODIBILIDADE LARVAR COM O EXTRATO AQUOSO OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

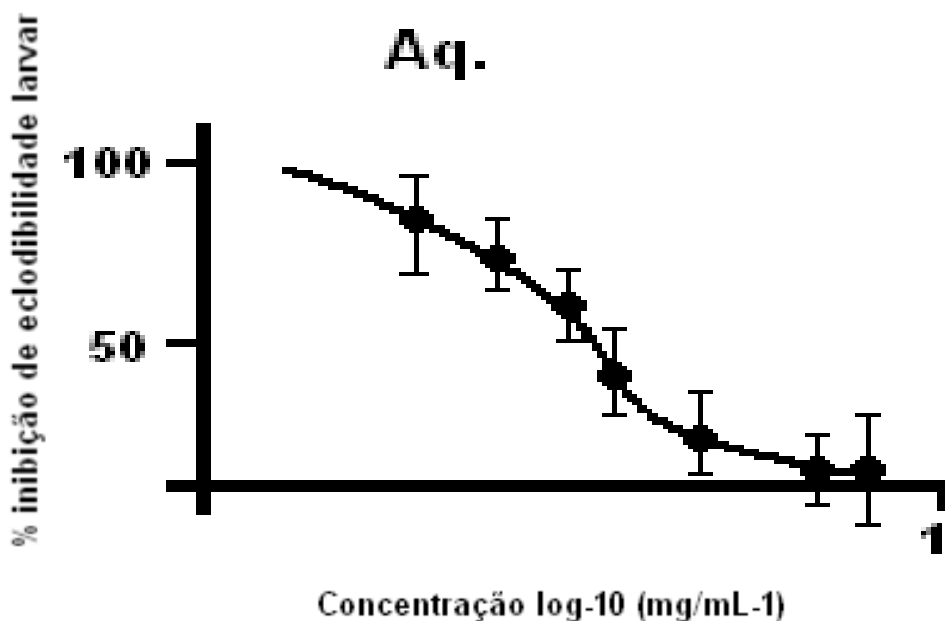


GRÁFICO 7 – CURVA DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM AGAR COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE 7 DIAS OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

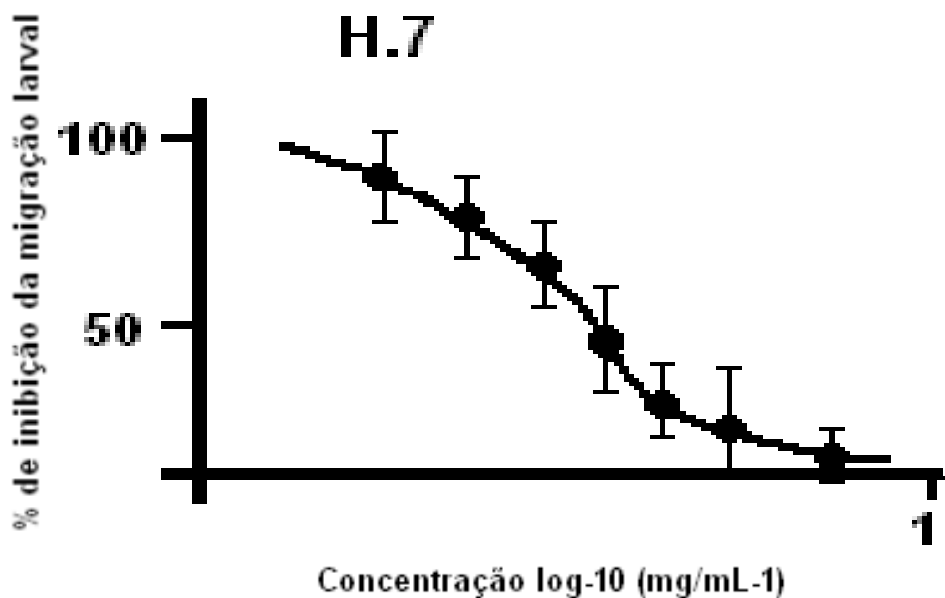


GRÁFICO 8 – CURVA DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM AGAR COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE 30 DIAS OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

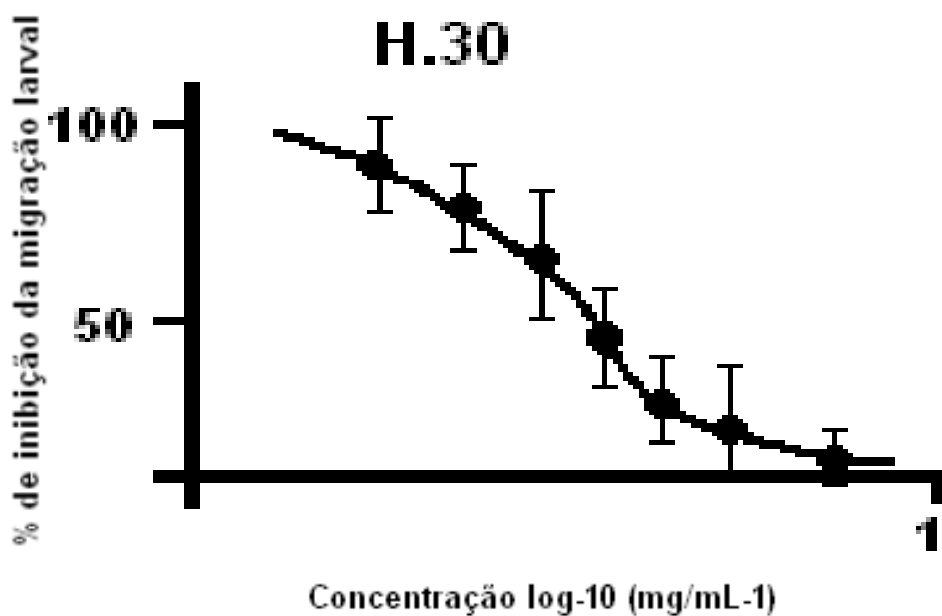
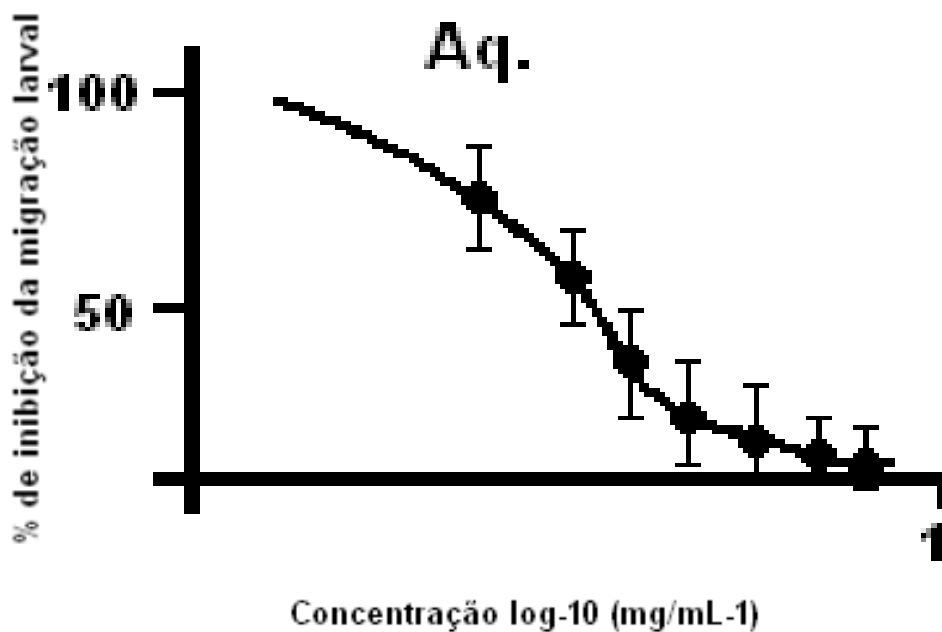


GRÁFICO 9 – CURVA DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM AGAR COM O EXTRATO AQUOSO OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.



4.4 DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade sobre a eclodibilidade de ovos e migração larvar de parasitas de caprinos, utilizando extratos fitoterápicos produzidos a partir da *Artemisia annua*. Estas duas técnicas analisam o potencial das substâncias utilizadas em inibir a eclosão de novos ovos e impedir a motilidade das larvas, respectivamente. (COLES *et al.*, 1992; D'ASSONVILLE, JANOVSKY, VERSTER, 1996). Os testes *in vitro* permitem uma avaliação da existência de propriedades anti-helmínticas nos extratos vegetais, constituindo desta maneira, uma etapa preliminar à caracterização dos possíveis compostos ativos presentes nos vegetais, possibilitando a criação de novas alternativas para o controle das parasitoses (MELO; BEVILAQUA, 2002).

Compostos fitoterápicos, de diferentes plantas com diferentes extrações, já foram pesquisados a fim de avaliar a eficácia frente à eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de caprinos. Na concentração de 50 mg/mL de uma extração com acetato de etila proveniente de *Azadirachta indica* inibiu a eclosão de larvas em 51,31% (COSTA *et al.*, 2008). Extrato hexânico das folhas de *Melia azedarach* inibiram a eclosão dos ovos em 16,92% (MACIEL *et al.*, 2006). Extrato aquoso e hidroalcoólico de *Melia azedarach*, na concentração de 12,5 mg/mL, apresentaram 99,4% e 100%, de eficácia nesse teste respectivamente (KAMARAJ *et al.* 2010). Os extratos etanólico e diclorometano produzidos da *Phytolacca icosandra* apresentaram inibição maior que 90%, utilizando-se doses a partir de 0,9 mg/mL (HERNANDES-VILLEGAS *et al.*, 2011). Contudo os mesmo autores relataram que a extração hexânica do mesmo vegetal não apresentou nenhuma atividade anti-helmíntica. Os produtos utilizados neste experimento demonstraram atividade de inibição da eclodibilidade larvar dose-dependente e atingiram eficácia maior que 90% somente nas duas extrações hidroalcoólicas e na concentração de 50 mg/mL.

Quanto aos resultados com os experimentos da migração larvar, nenhum dos extratos por nós utilizados, nas concentrações usadas, demonstrou eficácia superior a 90%, demonstrando claro efeito dose-dependente. Contudo foi evidenciada uma atividade superior de muitos extratos descritos na literatura. Na dose de 1200 mg/mL, os extratos de acetona das folhas frescas de *Acacia gaumeri*, *Brosimum*

alicastrum, *Havardia albicans* e *Leucaena leucocephala* foram inferiores a 50% de eficácia (ALONSO-DÍAZ *et al.*, 2011). Estudos utilizando extração com acetona para *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Ceratonia siliqua*, *Castanea sativa*, *Pyrus spinosa* e *Onobrychis viciifolia*, demonstraram que 1,2 mg/mL destes extratos inibiram em 79,1; 63,8; 61,5; 54,6; 47,4 e 38,9% a migração das larvas de *H. contortus*, respectivamente (MANOLARAKI *et al.*, 2010). Experimento com *Azadirachta indica* mostrou que 15,7 mg/mL do extrato foi necessário para inibir 50% do desenvolvimento das larvas (COSTA *et al.*, 2008).

As plantas do gênero *Artemisia* possui diversas plantas estudadas para os mais diversos fins, incluindo para nematódeos gastrintestinais em pequenos ruminantes. Iqbal *et al.* (2004) relataram uma redução significativa de até 67,2% de ovos desses parasitas em ovelhas 14 dias pós-tratamento com extrato em bruto aquoso de *A. brevifolia*. Valderrábano, Calvete e Uriarte (2010) descreveram uma diminuição significativa da carga parasitária de *H. contortus* em cordeiros quando fornecida uma dieta com 20% de forragem seca de *A. absinthium*. Todavia, esse é o primeiro relato para verificar a atividade *in vitro* contra parasitas gastrintestinais de caprinos de extratos produzidos a partir da *Artemisia annua*.

Para conseguir que todos os extratos tivessem resultado superior a 95% de eficácia, a concentração poderia ser aumentada. Com isso, a quantidade de solvente utilizada também aumentaria, podendo assim interferir nos resultados dos testes, uma vez que os parasitas são sensíveis ao mesmo (CARVALHO *et al.*, 2012). Outro ponto importante a ressaltar, é que extrapolando os estudos para testes *in vivo* cargas maiores do solvente poderiam provocar intoxicações nos animais (LU; MATTOS, 2001)

É primordial que seja realizada a análise química, para que um candidato a fitoterápico como agente antiparasitário ou outras ações, tenha sucesso. Estudos fitoquímicos possibilitam uma melhor avaliação da atividade terapêutica e também os requisitos de qualidade (MIGUEL; MIGUEL, 2004). Os dados encontrados na marcha fitoquímica realizada neste trabalho corroboram com achados na literatura, onde taninos, flavonóides, cumarinas, esteróides, fenóis, triterpenos, sesquiterpenos e catequinas também são citados como compostos presentes nos extratos de *A. annua* (BRISIBE *et al.*, 2009). Isto demonstra que mesmo, com diferentes extrações realizadas, os metabólitos, em diferentes concentrações, se mantiveram presentes. A partir disso, desses estudos, podemos indicar alguns dos principais responsáveis pelo

efeito anti-helmíntico do presente trabalho. Dentre eles, os que merecem um maior destaque são os taninos e os flavonóides.

Os taninos agem diretamente sobre os nematódeos gastrintestinais diminuindo a excreção dos ovos nas fezes, podendo diminuir a fertilidade das fêmeas adultas (PAOLINI *et al.*, 2003). Também atuam sobre as larvas, pois foi comprovado que extratos com grande concentração de taninos inibem a migração larvária (MOLAN *et al.*, 2000; MOLAN *et al.*, 2003). Estudos têm demonstrado que quando animais parasitados são colocados em pastos com diferentes tipos de forrageiras, estes preferem comer as plantas com alto teor de tanino (VILLALBA *et al.*, 2009; LISONBEE *et al.*, 2009). Os autores sugerem que os animais parasitados mudam o seu comportamento de ingestão, ao aprenderem que as plantas com alto teor deste composto aliviam a sua carga parasitária. Estas evidências de automedicação contra infecções parasitárias já foi bem descrita para primatas (HUFFMAN, 2003; KRIEF *et al.*, 2004; KRIEF *et al.* 2005; HUFFMAN, 2006).

Os flavonóides há muito tempo vêm sendo relacionados com efeitos positivos na saúde geral dos animais que os consomem (SILVA *et al.*, 2008). Grande parte desses benefícios é atribuída à sua atividade antioxidante (HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA; 2002) e também pela melhora indireta do sistema imune (FERREIRA *et al.*, 2010). Devido às suas propriedades redox, assumiu-se que uma dieta rica em flavonóides reduz o envelhecimento celular, peroxidação lipídica e probabilidade de ocorrência de câncer (FERREIRA *et al.*, 2010). No caso da *A. annua*, este composto é o principal responsável pela atividade antioxidante (CAO *et al.*, 1996). Na parasitologia, já comprovou-se sua eficácia contra *Trypanossoma* sp. (MAMANI-MATSUDA *et al.*, 2004), *Leishmania* sp (KIRMIZIBEKMEZ *et al.*, 2004), *Toxoplasma* sp. (WEISS *et al.*, 1998), e *Plasmodium falciparum* (HOANG *et al.*, 2012).

O biocomposto mais importante presente nessa planta é a artemisinina, a qual é apontada como o principal responsável por suas ações anti-helmínticas (RODRIGUES, 2006). Os mecanismos de ação que fazem com que este metabólito tenha tamanha importância, ocorrem devido a interferência nas proteínas de transporte na função mitocondrial do parasita, modulação da função imune do hospedeiro e inibição da angiogênese (GOLENSER *et al.*, 2006). Também é relatado que a artemisinina pode destruir certas proteínas do parasita, embora o alvo molecular específico ainda não tenha sido descoberto (O'NEILL, BARTON, WARD; 2010).

Contudo, se algum dos compostos descritos acima for isolado, provavelmente sua ação será baixa, pois os efeitos dos compostos presentes na planta trabalham de forma sinérgica (ENSERINK, 2005). Mesmo os flavonóides, taninos e artemisinina sendo os principais responsáveis pela ação anti-helmíntica, existe ainda as cumarinas, triterpenóides, compostos esteróides, fenóis, purinas, lipídeos e alifáticos, que juntos aos demais podem potencializar sua atividade antioxidante (FERREIRA; JANICK, 2009). Algumas outras moléculas presentes, melhoram a absorção dos extratos, aumentando sua atividade farmacológica e ainda sua permanência no organismo (BLANKE *et al.*, 2008). Indiretamente ocorre uma estimulação do sistema imune, pois muitos metabólitos encontrados na *A. annua* são potentes imunomoduladores, sendo este mecanismo de vital importância para cabras parasitadas (LIGHTBODY *et al.*, 2001; HOSTE *et al.* 2010). Por fim, alguns compostos possuem alta capacidade de produzir rápidas respostas pró-inflamatórias, as quais são muito importantes para o efeito anti-tumoral da planta (LAI; SINGH, 2006) e também para os desafios parasitários dos animais (GARCÍA-LAFUENTE *et al.* 2009).

Observando os resultados encontrados nos ensaios antioxidantes, é possível observar que os extratos hidroalcoólicos apresentaram uma ótima atividade. Mesmo o extrato aquoso, que apresentou um efeito reduzido, pode-se considerar como satisfatório. Extrações aquosas tendem a possuir uma menor atividade antioxidante, devido a menor quantidade de compostos com ação mais polar e que seriam retidos durante a extração (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, SANTOS; 2004). Possivelmente, a alta atividade relatada nesse ensaio se deve ao elevado conteúdo fenólico presente na planta, com mais de 50 compostos, e que pertence ao grupo dos flavonóides (FERREIRA; LUTHRIA; SASAKI, 2010).

A *Artemisia annua* possui um dos maiores níveis de capacidade de absorção do oxigênio radical (ORAC), o que faz dela uma das plantas com maior atividade antioxidante (BRISIBE *et al.*, 2009). Os antioxidantes são muito importantes, pois ajudam a reduzir os danos dos radicais livres causados pela atividade celular normal e auxiliam na recuperação de lesões na mucosa gastrintestinal (NIKI, 2002). Eles também são conhecidos por serem ativos moduladores do sistema imune em animais e em seres humanos (KANG *et al.*, 2009). Os compostos antioxidantes estabilizam ou desativam os radicais livres antes que estes ataquem as células (ATOUI *et al.*, 2005), por meio retardatório ou inibitório da oxidação de substratos oxidáveis (MORAIS *et al.*,

2009). Logo, uma boa atividade antioxidante é uma característica positiva na formulação de um fitoterápico com potencial antiparasitário, quer seja pela defesa direta do organismo dos danos oxidativos ou pela melhora do estado imunológico do indivíduo (FLOHE; HECHT; STEINERT, 1999).

Avaliar se o extrato é tóxico para os animais e/ou para o meio ambiente é outro ponto chave que pode e deve ser abordado na metodologia *in vitro* (CARVALHO *et al.*, 2009). Para estabelecer a toxicidade dos fitoterápicos, o ensaio de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* apresenta-se como um método de alta especificidade (Meyer *et al.*, 1982; LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006). O uso deste crustáceo no teste tem como principais vantagens: 1. baixo custo, onde os organismos são vendidos na forma de cistos; 2. possuir distribuição cosmopolita, 3. ser seguro de manipular, e 4. ser razoavelmente prático de executar (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005; KOUTSAFTIS; AOYAMA, 2007). A metodologia possui alta confiabilidade para testar o efeito tóxico de produtos fitoterápicos (MCLAUGLIN; CHANG; SMITH, 1991). Os resultados encontrados nos testes fitoquímicos aliados ao resultado neste teste fazem com que se conheça o efeito dos extratos produzidos como antiparasitários e atóxicos ao meio ambiente. RAMAZARI *et al.* (2010) pesquisando a toxicidade, com o mesmo teste por nós realizado, com cinco plantas diferentes de *Artemisia* sp. verificou que a *A. scoparia* e *A. dracuncululus* demonstraram toxicidade mediana (DL_{50} 100–500 $\mu\text{g/ml}$). Já *A. vulgaris*, *A. annua* e *A. absinthium* apresentaram baixa toxicidade ($DL_{50} > 1,000 \mu\text{g/ml}$). Portanto, os dados obtidos neste trabalho corroboram com os da literatura.

Ensaio *in vitro* servem como uma indicação inicial da atividade a ser pesquisada, permitindo assim a seleção dos extratos mais promissores, diminuindo gastos, além de evitar perda de tempo e o uso indiscriminado de animais de experimentação (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2005). Testes realizados com caprinos possuem uma grande variação nas condições experimentais, pois são muitas vezes limitadas ao número de animais e a possibilidade de não poder ser facilmente usado para identificar os componentes ativos das plantas ou seu mecanismo de ação (SQUIRES *et al.*, 2011). Contudo, existem discrepâncias entre os resultados encontrados nos dois métodos, pois nem sempre se consegue reproduzir em laboratório os diversos efeitos que estão embutidos no teste *in vivo*, como: microbiota ruminal, alimentação, raça, farmacocinética, estado sanitário do animal, entre outros

(VANDAMME, ELLIS; 2004; HOSTE *et al.*, 2006). Ainda assim, os testes *in vitro* devem ser utilizados como uma triagem entre os diversos candidatos a anti-helmínticos (IQBAL *et al.*, 2004).

4.5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que todos os extratos demonstraram serem candidatos a fitoterápicos antiparasitários para nematódeos de caprinos. Os exames bioquímicos apontaram a presença de diversos compostos químicos que possuem a capacidade de combater parasitas, tanto direto como indiretamente. Os resultados obtidos apontam para um possível sucesso no controle antihelmíntico na caprinocultura mundial. Contudo, novos estudos devem ser realizados buscando maximizar a eficácia dos extratos e posteriormente aplicá-los em testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.A.; GARCIA, K.C.; TORGERSON, P.R.; AMARANTE, A.F. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622–625, 2010.

ALMEIDA, G. F.; HORSTED, K.; THAMSBORG, S. M.; KYVSGAARD, N. C.; FERREIRA, J. F. S.; HERMANSEN, J. E. Use of *Artemisia annua* as a natural coccidiostat in free-range broilers and its effects on infection dynamics and performance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 178–187, 2012.

ALMEIDA, G. F.; HORSTED, K.; THAMSBORG, S. M.; KYVSGAARD, N.C.; FERREIRA, J. F. S.; HERMANSEN J. E. Use of *Artemisia annua* as a natural coccidiostat in free-range broilers and its effects on infection dynamics and performance, **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 178–187, 2012.

AMARANTE A.F.T. **Controle de endoparasitoses em ovinos**, 2010. Disponível em <www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/repman4.htm> Acessado em: 12 de dezembro de 2012.

ATOUI, A. K. ; MANSOURI, A. ; BOSKOU, G. ; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BEYNON, S. A. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 1, p. 113–124, 2012.

BHAKUNI, R. S.; JAIN, D. C.; SHARMA, R. P. Phytochemistry of *Artemisia annua* and the development of artemisinin-derived antimalarial agents. In **Artemisia**, Taylor & Francis: Londres, RU, 2002. p. 211-248.

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

BLANKE, C.H.; NAISABHA, G.B.; BALEMA, M.B.; MBARUKU, G.M.; HEIDE, L.; MULLER, M.S. Herba *Artemisiae annuae* tea preparation compared to sulfadoxine-

pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double-blind clinical trial. **Tropical Documents**, v. 38, p. 113-116, 2008.

BRISIBE, E. A. Challenges and opportunities in the local production of artemisinin-based combination therapies against malaria in Nigeria. **Journal of Pharmaceutical Science and Pharmaceutical Practical**, v. 8, p. 49–59, 2006.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; OWAI, P. U.; BRISIBE, F. Dietary inclusion of dried *Artemisia annua* leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p. 4083–4092, 2008.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P. M.; FERREIRA, J. F. S.; LUTHRIA, D.; WU, X.; PRIOR, R. L. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. **Food chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1240-1246, 2009.

BROGLIO-MICHELETTI; S. M. F.; DIAS, N. S.; VALENTE, E. C. N.; SOUZA, L. A.; LOPES, D. O. P. ; SANTOS, J. M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p. 46-50, 2010.

CAMPBELL, C.; FUENTES, A.; MACKINNON, K.; PANGER, M.; BEARDER, S. **Primates in Perspective**, University of Oxford Press, Oxford, RU, p. 677–689, 2006.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3426-3431, 1996.

CARVALHO, C.; MATTA, S.; MELO, F.; ANDRADE, D.; CARVALHO, L.; NASCIMENTO, P.; SILVA, M.; ROSA, M. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers–Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 51 - 57, 2009.

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

CONDER, G.A.; CAMPBELL, W.C. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**, v.35, p.1-83, 1995.

COSTA JÚNIOR, G. S.; MENDONÇA, I. V.; CAMPELO, J. E. G.; CAVALCANTE, R. R.; DANTAS FILHO, L. A.; NASCIMENTO, I. M. R.; ALMEIDA, E. C. R.; CHAVES, R. M. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 279-286, 2005.

COSTA, C.T.C, MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito Ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 11, p. 57-60, 2002.

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

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**, v. 31, n. 1, p. 65-71, 2011.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.

DEL CACHO, E.; GALLEGO, M.; FRANCESCH, M.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Efeito da artemisinina em oocisto a formação da parede e esporulação durante *Eimeria tenella* infecção. **Parasitology Internacional**, v. 4, p. 506-511, 2010.

DONDORP, A. M.; NOSTEN, F.; YI, P.; DAS, D.; PHYO, A. P. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 455–467, 2009.

EFFERTH, T.; HERRMANN, F.; TAHRANI, A.; WINK, M. Cytotoxic activity of secondary metabolites derived from *Artemisia annua* L. towards cancer cells in comparison to its designated active constituent artemisinin. **Phytomedicine**, v. 18, p.959–969, 2011.

FALBO, M. K.; SANDINI, I. E.; ISHIY, H. M.; FÁVERO, J. L.; SANTOS, C. E.; BASTOS, S.; ROGIGHERI, D.; GUZZO, D. Atividade anti-helmíntica do fruto de *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 881-886, 2008.

FERREIRA, J. F. S.; JANICK, J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*.. In: J. JANICK, J. **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, p. 579-584, 1996.

FERREIRA, J. F.; LUTHRIA, D. L.; SASAKI, T.; HEYERICK, A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. **Molecules**, v. 15, p. 3135-3170, 2010.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova**, v. 31, p. 1427-1430, 2005.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.; MARTÍNEZ, J. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammatory Research**, v. 58, n. 9, p. 537–552, 2009.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GOLENSER, J.; WAKNINE, J. H.; KRUGLIAK, M.; HUNT, N.; GRAU, G. E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1427–1441, 2006.

HASHEMINIA, S. M.; SENDI, J. J.; JAHROMI, K. T.; MOHARRAMIPOUR, S. The effects of *Artemisia annua* L. and *Achillea millefolium* L. crude leaf extracts on the toxicity, development, feeding efficiency and chemical activities of small cabbage *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). **Pesticidal and Biochemistry Physiology**, v. 99, p. 244–249, 2011.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacologic Therapeutic**, v. 96, n.2-3, p. 67-202, 2002.

HAYNES, R. K.; CHAN, W. C.; LUNG, C. M.; UHLEMANN, A. C.; ECKSTEIN, U.; TARAMELLI, D.; PARAPINI, S.; MONTI, D.; KRISHNA, S. The Fe²⁺-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: The unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. **ChemMedChem**, v. 2, p. 1480–1497, 2007.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 253–261, 2006.

HOSTE, H.; SOTIRAKI, S.; LANDAU, S. Y.; JACKSON, F.; BEVERIDGE, I. Goat-nematode interactions: think differently. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 376–381, 2010.

HUFFMAN, M. A. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 371–381, 2003.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; ASHRAF, M.; JABBAR, A. Atividade anti-helmíntico de *Artemisia brevifolia* em ovinos. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 265-268, 2004.

JONES-BRANDO, L.; D'ANGELO, J.; POSNER, G. H.; YOLKEN, R. *In vitro* inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 4206–4208, 2006.

KAMARAJ, C.; ABDUL-RAHUMAN, A.; BAGAVAN, A.; MOHAMED, M. J.; ELANGO, G.; RAJAKUMAR, G.; ZAHIR, A. A.; SANTHOSHKUMAR, T.; MARIMUTHU, S. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Parasitology Research**, v. 106, p. 1071–1077, 2010.

KANG, J. H.; COOK, N. R.; MANSON, J. E.; BURING J. E.; ALBERT, C. M.; GRODSTEIN, F. Vitamin E, vitamin C, beta carotene, and cognitive function among women with or at risk of cardiovascular disease: the Women's Antioxidant and Cardiovascular Study. **Circulation**, v. 119, p. 2772–2780, 2009.

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

KEISER, J.; UTZINGER, J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p. 605–612, 2007.

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUEGNARD, F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 116–128, 2008.

KIM, J.-T.; PARK, J.-Y.; SEO, H.-SU; OH, H.-G.; NOH, J.-W.; KIM, J.-H.; KIM, D.-Y.; YOUN, H.-J. *In vitro* antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 53–63, 2002.

KIRMIZIBEKMEZ, H.; CALIS, I.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; DONMEZ, A. A.; LINDEN, A.; RUEDI, P.; TASDEMIR, D. Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis, **Planta Medica**, v. 70, n. 8, p. 711-717, 2004.

KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA, I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the total environment**, v. 387, n. 1, p. 166-174, 2007.

KRIEF, S.; HLADIK, C. M.; HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 1–15, 2005.

KRIEF, S.; MARTIN, M. T.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SÉVENET, T. Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 3196–3199, 2004.

LAI, H.; SINGH, N.P. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in rat. **Cancer Letters**, v.231, p.43-48, 2006.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 16, p. 158-163, 2006.

LIGHTBODY, J. H.; STEVENSON, L. M.; JACKSON, F.; DONALDSON, K.; JONES, D. G. Comparative aspects of plasma antioxidant status in sheep and goats, and the

influence of experimental abomasal nematode infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, p. 192–199, 2001.

LISONBEE, L. D.; VILLALBA, J. J.; PROVENZA, F. D.; HALL, J. O. Tannins and self-medication: Implications for sustainable parasite control in herbivores. **Behavior Processes**. v. 82, p. 184–189, 2009.

LU, C. ; MATTSON, M. P. Dimethyl sulfoxide suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. **Experimental Neurologist**, v. 170, n.1, p. 180–185, 2001.

MACIEL, M. V. ; Morais, S. M. ; BEVILAQUA, C. M. L. ; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. ; COSTA, C. T. C. ; CASTRO, C. M. S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 98-104, 2006.

MAKKAR, H. (2006). Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. In: Sandoval-Castro, C.; Howell, F. D.; Torres-Acosta, J. J.; Ayala-Burgos, A.; **The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds**. Nottingham University Press, p. 235-249, 2006.

MAMANI-MATSUDA, M.; RAMBERT, J.; MALVY, D.; LEJOLY-BOISSEAU, H.; DAULOUEDE, S.; THIOLAT, D.; COVES, S.; COURTOIS, P.; VINCENDEAU, P.; MOSSALAYI, M. D. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. **Antimicrobial Agents Chemother**. v. 48, n. 3, p. 924-929, 2004.

MANOLARAKI, F.; SOTIRAKI, S.; STEFANAKIS, A.; SKAMPARDONIS, V.; VOLANIS, M.; HOSTE, H. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 137, p. 685–696, 2010.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007.

McLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. In: **Studies in Natural Products Chemistry**; Rahman, A. U. 1 ed.; Elsevier Applied Science: Londres, 1991, p. 383-409.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. (2002). Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão. **Ciência Animal**, v. 12, n. 1, p. 35-45, 2002.

MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; PRADO, A. P. Determinação da frequência de realização de bioensaios para o monitoramento da resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 87-93, 2007.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E., MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 2 ed. São Paulo: Robe Editorial, 2004.

MIN, B. R.; HART S. P. Tannins for suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 102-109, 2003.

MIRJALILI, M. H.; TABATABAIE, S. M. F.; HADDIAN, J.; NEJAD, S.; EBRAHIMI; SONBBOLI, A. Phenological variation of the essential oil of *Artemisia scoparia waldst.et* Kit from Iran. **Journal of Essencial Oil Research**, v. 19, p. 326-329, 2007.

MISHINA, Y. V.; KRISHNA, S.; HAYNES, R. K.; MEADE, J. C. Artemisinins inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* in in vitro growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1852-1854, 2007.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A.R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 527-541, 2000.

MOLAN, A.; DUNCAN, A.; BARRY, T.; MCNABB, W. Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. **Parásitology**, v. 52, p. 209-218, 2003.

MOLAN, A.L.; WAGHORN, G.C.; MIN, B.R.; MCNABB, W.C. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. **Folia Parasitologica**, v. 47, p. 39-44, 2000.

MOLENTO, M. B. PRICHARD, R. K. Efeito de drogas moduladoras da resistência múltipla na atividade da ivermectina e moxidectina contra larvas infectantes selecionadas de *Haemonchus contortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p.117-121, 2001.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitaria em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p.1469–1477,2005.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

NIEZEN, J. H.; CHARLESTON, W. A. G.; ROBERTSON, H. A.; SHELTON, D.; WAGHORN, G. C.; GREEN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p.229–245, 2002.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18, p. 524–525, 2002.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin—The debate continues. **Molecules**, v. 15, p. 1705-1721, 2010.

OLIVEIRA, L. M. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; BARROS, R. S. RODRIGUES, A.C.M.,CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., MORAIS, S.M., LIMA, Y.C., VIEIRA, L.S., NAVARRO, A.M.C., 2009. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 55-59.

OLIVO, C. J.; HEIMERDINGER, A.; ZIECH, M. F.; AGNOLIN, C. A.; MEINERZ, G. R.; BOTH, F.; CHARÃO, P. S. Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. **Ciências Rural**, v. 39, n. 4, 2009.

OLUMNESE, P. WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2006. WHO, Genebra

PAOLINI, V.; BERGAUD, J.P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, PH.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.113, p. 253-261, 2003.

RAMAZANI, A.; SARDARI, S.; ZAKERI, S.; VAZIRI, B. In vitro antiplasmodial and phytochemical study of five *Artemisia* species from Iran and *in vivo* activity of two species. **Parasitology research**, v. 107, n. 3, p. 593-599, 2010.

RODRIGUES, R.A.F.; FOGGIO, M.A.; BOAVENTURA JR., S.; SANTOS, A.S.; REHDER V.L.G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, p. 368-372, 2006.

RUSTAIYAN, A.; MASOUD, S. Chemical constituents and biological activities of Iranian *Artemisia* species. **Phytochemistry Letters**, v. 247, p. 440-447, 2011.

SEN, G.; MANDAL, S.; SAHA ROY, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BISWAS, T. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. **Free Radical Biological Medicine**, v. 38, n. 9, p. 1257-1264, 2005.

SILVA, V. C.; CARVALHO, M. G.; BORBA, H. R.; SILVA, S. L. C.. Atividade anti-helmíntica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 18, n.4, p. 573-576, 2008.

SMITH, D. L.; DUSHOFF, J.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. The entomological inoculation rate and *Plasmodium falciparum* infection in African children. **Nature**, v. 438, p. 492–495, 2005.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SQUIRES, J. M.; FERREIRA, J. F. S.; LINDSAY, D. S.; ZAJAC, A. M. Effects of artemisinin and artemisia extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 103–108, 2011.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; N'DRI, A.; LENGELER, C.; XIAO, S.; TANNER, M. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. **Lancet**, v. 355, p.1320–1325, 2000.

UTZINGER, J.; XIAO, S. H.; TANNER, M.; KEISER, J. Artemisinins for schistosomiasis and beyond, **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 8, n. 2, p.105–116, 2007.

VANDAMME, T. H. F.; ELLIS, K. J. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1415-1436, 2004.

VASCONCELOS, A. L. C. F. **Alternativas para o controle das nematodioses gastrintestinais de ovinos e caprinos**, 2010. Disponível em <www.higieneanimal.ufc.br/1shsa/index.php> Acessado em: 28 de dezembro de 2012.

VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista da Ciência e Tecnologia Agropecuária**, v. 2, p. 28-31, 2008.

WEISS, L. M.; MA, Y. F.; TAKVORIAN, P. M.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. **Infection and Immunology**, v. 66, n. 7, p. 3295-3302, 1998.

YUAN, C.; HUANG, X.; CHENG, L.; BU, Y.; LIU, G.; YI, F.; SONG, F. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 581-584, 2009.

5. EFEITO ANTICOCCIDIANO DE EXTRATOS DE *ARTEMISIA ANNUA* EM CAMAS DE AVES CONTAMINADAS COM *EIMERIA* SP.

RESUMO

Devido ao modo de utilização massiva dos princípios anticoccidianos e da demanda dos consumidores por produtos mais ecologicamente corretos, novas estratégias para combater a coccidiose estão sendo estudadas. O objetivo do presente estudo foi analisar a composição química e avaliar a eficácia de extratos obtidos da *Artemisia annua* para combater oocistos de *Eimeria* sp. em camas contaminadas por faisões. Foram produzidos três extratos: um extrato aquoso (Aq.), um hidroalcoólico de 7 dias (H.7) e outro de 30 dias (H.30). Então, foram realizados os mesmos testes que estão descritos no capítulo 3. Para testar a atividade anticoccidiana, foram contaminadas com faisões positivos para eimeriose 48 camas de aves, contendo 2,18 m². Nestes locais, foram aspergidos, em triplicata e de maneira aleatória, 600 mL dos extratos em diferentes concentrações (6; 9 e 12 mg.mL⁻¹), nas cama e coletadas triplicatas de 10 cm² de cada local, aleatoriamente, nos tempos: 0; 3; 6; 24; 48; e 72 horas após a aplicação dos extratos. O extrato H.7 na concentração de 12 mg.mL⁻¹ apresentou eficácia entre 44,25 a 40,71%, sendo esta semelhante estatisticamente a eficácia do H.30 (42,53-37,93%) (P>0,05). Já o extrato aquoso apresentou o menor efeito (28,57-23,81%), também nesta dosagem. Nas outras concentrações a eficácia foi ainda menor, nos três casos. Os exames bioquímicos demonstraram um grande número de compostos com propriedades anticoccidianas. O exame de toxicologia demonstrou que os três extratos possuem baixa toxicidade, não sendo os mesmos tóxicos ao meio ambiente. Apesar da eficácia não ser superior a 45%, os resultados obtidos neste trabalho são de grande valor, tendo em vista a magnitude da enfermidade em questão e da dificuldade em se destruir oocistos de *Eimeria*. Novos estudos necessitam ser realizados, uma vez que se obtiveram resultados promissores, para elucidar as reais propriedades destes fitoterápicos e buscar aumentar a sua eficácia.

Palavras-chave: Coccidiose, fitoterapia, métodos alternativos.

ANTICOCCIDIAL EFFECT OF *ARTEMISIA ANNUA* EXTRACTS IN AVIAN BEDS CONTAMINATED WITH *EIMERIA* SP.

ABSTRACT

Because of massive use of anticoccidial principles and consumer demand for greener products, new strategies to combat coccidiosis are being studied. The aim of this study was to analyze the chemical composition and evaluate the effectiveness of *Artemisia annua* extracts to fight *Eimeria* sp. in contaminated beds for pheasant. Three extracts were produced: an aqueous extract (Aq), a hydroalcoholic 7 days (H.7) and another 30 days (H.30). We made the same phytochemical tests were described in chapter 3. To test the anticoccidial activity, were contaminated 48 avian beds, containing 2.18 m², with pheasants positive for eimeriosis. In these places, were sprayed in triplicate and randomly, 600 mL of the extracts at different concentrations (6, 9 and 12 mg.ml⁻¹), in bed and collected triplicates of 10 cm² each site, randomly, at times: 0, 3, 6, 24, 48, and 72 hours after application of the extracts. The extract H.7 in concentration of 12 mg.ml⁻¹ exhibited efficacy ranging from 44.25 to 40.71%, this being statistically similar effectiveness of H.30 (42.53 to 37.93%) (P> 0.05). Since the aqueous extract showed the lowest effect (28.57 to 23.81%), this dose also. In other concentrations efficacy was even lower in all three cases. Biochemical tests showed a large number of compounds with anticoccidial properties. The toxicological examination showed that all three extracts possess low toxicity, they are not toxic to the environment. Despite the effectiveness is not more than 45%, the results obtained in this study are of great value in view of the magnitude of the disease in question and to the difficulty to destroy oocysts of *Eimeria* sp. Further studies should be performed, since it had promising results, to elucidate the actual properties of herbal medicines and seek to improve their efficiency.

Keywords: Alternative methods, coccidiosis, herbal medicine.

5.1 INTRODUÇÃO

A avicultura é uma atividade zootécnica em franca expansão, e que nos últimos anos apresentou um grande aumento na produção de proteína animal de baixo custo. Atualmente é o segundo espécie de carne mais consumido no planeta, ficando atrás somente da carne suína (FAO, 2011). O Brasil está consolidado com um dos principais produtores de frango, sendo o terceiro maior produtor mundial desses animais e o primeiro em termos de exportação (USDA, 2011). A Região Sul é tradicionalmente o local que concentra a maior parcela da produção avícola do país (GARCIA, 2005). Porém, a fim de atender uma demanda interna e externa crescente, essa produção tem se expandido, nos últimos anos, para outros estados do país em busca de ganhos produtivos e maior proximidade com os pólos fornecedores de grãos, base da alimentação dos animais (BELUSSO; HESPANHOL, 2010).

Devido aos avanços no manejo sanitário, higienização dos galpões e curto período de vida dos animais, grande parte das parasitoses em aves criadas no sistema intensivo industrial de produção foram praticamente extintas (KINNAIRD *et al.*, 2004). Contudo, essa tecnificação da produção pecuária dificilmente consegue acabar com as doenças gastrintestinais causadas por protozoários. Isso faz com que a coccidiose, também chamada como eimeriose, seja a principal enfermidade parasitária existente na criação de aves contemporânea (DALLOUL; LILLEHOJ, 2006).

Esta doença é causada pelo protozoário do gênero *Eimeria*, pertencente ao subfilo Apicomplexa, Família Eimeriidae, que pode afetar aves e mamíferos (DING *et al.*, 2004). Trata-se de um parasito intracelular obrigatório que causa doença pela destruição das células em seu processo de replicação. Em galinhas, *E. tenella* é a espécie mais patogênica, invadindo a mucosa cecal, onde causa inflamação e danos aos enterócitos (DU *et al.*, 2005). Todavia, outras seis espécies também possuem importância na infecção desse animal e têm sido reconhecidas infectando galinhas: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix* e *E. praecox* (LUCHESE *et al.*, 2007). Cada uma delas possui como características próprias à patogenicidade, local de infecção e imunogenicidade.

A coccidiose causa graves prejuízos econômicos, devido a episódios de diarreia e mortes em animais jovens (CARDOZO *et al.*, 2004). Porém, na maioria dos casos

apresenta-se de forma sub-clínica afetando o desempenho dos animais e aumentando o custo de produção para os agricultores (FANATICO, 2006). No Brasil, estima-se que das perdas produtivas por essa enfermidade, 17% são decorrentes do tratamento e 80% devido a queda no desempenho e a mortalidade dos animais (SILVA *et al.*, 2009).

A forma usual de controle das enfermidades parasitárias em aves produzidas em sistemas industriais é o uso preventivo de drogas antiparasitárias de forma intensiva, em altas concentrações e com rápida troca de produtos (LI *et al.*, 2004). Este uso indiscriminado acarreta na seleção de organismos resistentes, que é um fenômeno no qual uma droga não consegue manter a mesma eficácia contra os parasitos, quando utilizada nas mesmas condições, após um determinado período de tempo (CONDER; CAMPBELL, 1995). Com isso, a população resistente ao princípio ativo não é danificada pelo produto químico e passa os seus genes de resistência para as futuras gerações, aumentando assim a quantidade de indivíduos resistentes (MOLENTO, 2005). Este é, destacadamente, um dos problemas mais sérios enfrentados não só na avicultura comercial, mas nas demais cadeias produtivas de proteína de origem animal (MOLENTO, 2004).

Para resolver tal problema, a fitoterapia representa uma alternativa ecologicamente viável, contribuindo inclusive para o aumento da lucratividade pecuária, uma vez que reduz o uso de anti-helmínticos convencionais, além de estender a vida útil dos produtos químicos disponíveis (VIEIRA *et al.*, 1999). Além disso, os produtos fitoterápicos são de fácil acesso e obtenção por parte dos produtores em farmácias de manipulação, não deixam resíduos contaminantes em alimentos e ainda apresentam baixo custo para sua fabricação (OLIVO *et al.*, 2009).

A *Artemisia* é um dos gêneros mais estudados na produção de fitoterápicos (WILLCOX *et al.*, 2004). A *Artemisia annua* ocorre naturalmente como parte da vegetação das planícies ao norte das províncias Chadar e Suiyuan, na China (MARCHESE, 1999). Na medicina tradicional chinesa é utilizada, há muito tempo, no combate a febres além de ser um potente agente antimalárico (MUELLER *et al.*, 2004), apresentando pouco ou nenhum efeito colateral (WHO, 2005).

Em diversos locais do mundo é utilizada popularmente para o tratamento de diversas doenças como hepatite, hipertensão, hemorróida, icterícia, inflamações e infecções fúngicas, bacterianas e virais (RUSTAIYAN; MASOUDI, 2011). Em parasitologia, os extratos produzidos a partir da planta já tiveram efeitos comprovados

frente a diversos parasitas, como: *Schistosoma japonicum* e *S. mansoni* (UTZINGER *et al.*, 2000; UTZINGER *et al.*, 2007), *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* e *Opisthorchis viverrini* (KEISER; UTZINGER, 2007); *Leishmania* sp. (MENON *et al.*, 2006), *Trypanosoma* sp. (MISHINA *et al.*, 2007). Contudo destaca-se o seu potencial frente a protozoários do filo Apicomplexa (ARAB *et al.*, 2006), entre eles *Plasmodium* sp. e *Eimeria* sp. (BRISIBE *et al.*, 2008).

Apesar das várias pesquisas desenvolvidas até o momento, existe a necessidade de estudar o efeito da aplicação externa de fitoterápicos sobre oocistos livres. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da utilização de extratos produzidos com *A. annua* presentes no local de permanência de aves, composto por cepilho de árvore raspado contaminadas com oocistos de *Eimeria* sp.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal

Ver página 70.

5.2.2 Preparação dos extratos

Ver página 70.

5.2.3 Caracterização fitoquímica

Ver página 71.

5.2.4 Dosagem da artemisinina

Ver página 71.

5.2.5 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Ver página 72.

5.2.6 Determinação dos polifenóis totais

Ver página 72.

5.2.7 Ensaio antioxidantes

Ver página 73.

5.2.8 Experimento no local de permanência das aves contaminada com *Eimeria* sp.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Criação e Incubação de Animais Alternativos, Silvestres e Exóticos (LACRIAS), encontrado na Fazenda Experimental do Canguiri, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, UFPR, localizada no município de Pinhais, região metropolitana de Curitiba.

Foram utilizados 36 faisões fêmeas e 12 faisões machos, da raça *Phasianus colchicus* L., naturalmente contaminados com *Eimeria* sp e sem tratamento antiparasitário por um período de 90 dias antes da fase experimental. Os oocistos por grama de fezes (OoPG) dos animais estavam acima de 1200. Os animais foram divididos em 12 grupos homogêneos, contendo três fêmeas e um macho, abrigados em boxes contendo as dimensões de 2,1m de altura por 1,5m de comprimento e 1,45m de largura. Cada alojamento era separado por uma parede de tijolos e cerca visando evitar contaminação cruzada entre os ambientes e continha uma cama de cepilho raspado. Os comedouros eram do tipo tubular, sendo que os animais consumiram ração balanceada, composta a base de farelo de milho e farelo de soja, sendo isonutritiva e isoenergética. Os bebedouros utilizados eram do tipo automático copinho e fornecimento de água limpa *ad libitum*.

Passados 20 dias após serem alojadas, as aves foram retiradas de seus boxes e colocadas em outros com as mesmas características dos iniciais, para serem mantidas

por mais 20 dias nestes locais contaminando as camas. Os grupos foram divididos em quatro tratamentos, com diferentes concentrações do extrato, sendo: G1: 12 mg/mL; G2: 9 mg/mL; G3: 6 mg/mL; e C-: água (controle negativo). O objetivo do uso das aves foi apenas para contaminar as camas com oocistos viáveis para se realizar futuramente a aplicação dos extratos nas mesmas. Então com as camas sem animais o produto foi aspergido por meio de uma bomba de aspersão no volume de 600 mL em cada grupo, de forma que toda a cama ficasse igualmente com aspecto úmido. Os tratamentos foram realizados em triplicata para cada concentração. Com o auxílio de um quadrado de madeira com 10cm², foram coletadas amostras de cada cama, de maneira aleatória, nos tempos: 0; 3; 6; 24; 48; e 72 h após a aplicação dos extratos. O material foi acondicionado em embalagem plástica hermeticamente fechada e colocada em isopor com gelo reciclável, para conservar os oocistos.

Transcorridos 20 dias desde que as aves foram abrigadas no novo box, elas foram novamente retiradas do ambiente e abrigadas em outro box. Esta prática foi repetida mais duas vezes até que os três extratos produzidos fossem testados, mantendo um período de vazio sanitário suficiente (20 dias) para a eliminação do efeito do tratamento anterior.

5.2.9 Análise das amostras de camas

O material foi levado ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná. Cada amostra repousou por 15 minutos em Becker, com capacidade de 1L, contendo o material retirado, água destilada e duas gotas de detergente neutro. Transcorrido esse tempo, o material foi lavado de maneira consecutiva em peneiras com as dimensões dos poros de 250, 150, 75 e 20 µm. Após esta sequência de lavagem com água destilada, o conteúdo da última peneira foi coletado e distribuído para tubos de 50 mL para serem centrifugados. A primeira centrifugação ocorreu em 2000 rpm x 5 min, onde foi descartado o sobrenadante. O volume foi completado com solução salina saturada para a ressuspensão do sedimento. Novamente o material foi centrifugado nas mesmas condições que a anterior e então se colocou uma lâmina de vidro sobre o tubo. Após 15 minutos a lâmina foi retirada e a contagem de oocistos foi realizada em microscópio eletrônico em aumento de 10 x.



FIGURA 2 – AMBIENTE INTERNO DAS BAIAS ONDE ESTAVAM ALOJADOS OS FAISÕES (*Phasianus Colchicus L.*), FAZENDA EXPERIMENTAL CANGUIRI, 2012.



FIGURA 3 – AMBIENTE INTERNO DOS GALPÕES QUE ABRIGAVAM OS FAISÕES (*Phasianus Colchicus L.*), FAZENDA EXPERIMENTAL CANGUIRI, 2012.

5.2.10 Análise estatística

Para analisar a toxicidade frente a *Artemia salina* se utilizou a análise de regressão não linear. Em todos os casos os resultados apresentados correspondem à média da triplicata ($n=3$) \pm desvio padrão da média. Nos outros testes, os dados foram comparados por análise de variância pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.

5.3 RESULTADOS

Os resultados da marcha fitoquímica (Tabela 1), dosagem de artemisinina (Quadro 1), teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (Quadro 2), quantificação de fenóis totais (Quadro 3), ensaios antioxidantes (Gráfico 1, 2 e 3; Quadro 4) estão dispostos entre as páginas 75 à 81 desse documento.

Já os resultados da diminuição do número de oocistos de *Eimeria* sp. após o intervalo de tempo “T” de aplicação do extrato H.7 está disposto na Tabela 4 e mostraram um efeito dose-dependente. Os melhores valores de eficácia foram encontrados com a utilização do extrato na concentração de 12 mg.ml^{-1} , variando de 44,25% a 40,71%. Os resultados do G2 (9 mg.ml^{-1}) variaram de 29,66% a 27,12%, sendo estes estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) dos resultados do G1 e também aos encontrados no G3 (6 mg.ml^{-1}). Por fim, o G3 (6 mg.ml^{-1}) teve uma eficácia estatisticamente igual ($P > 0,05$) ao grupo controle no instante “T = 3 horas” sendo as demais diferentes ao C- e aos demais grupos. Quando comparadas as eficácias dentro do mesmo tratamento, em todos os grupos, os valores foram semelhantes entre si ($P > 0,05$), exceto quando comparados com o intervalo inicial (T = 0h).

TABELA 4 - NÚMERO MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO (EFICÁCIA DO TRATAMENTO %) DE OOCISTOS DE *EIMERIA* SP. NO INTERVALO DE TEMPO "T" APÓS A APLICAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE 7 DIAS OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

Horas (T)	Concentração (mg.mL ⁻¹)	
	C-	G1
0	44,33 \pm 7,02 (0%)Ab	37,67 \pm 8,50 (0%)Ab
3	37,67 \pm 8,08 (13,08%)Ca	22,00 \pm 2,65 (41,59%)Aa
6	38,67 \pm 6,66 (10,77%)Da	21,00 \pm 1,00 (44,25%)Aa
24	37,33 \pm 4,04 (10,00%)Da	22,33 \pm 0,58 (40,71%)Aa
48	40,67 \pm 12,10 (8,46%)Da	22,00 \pm 5,29 (41,59%)Aa
72	39,33 \pm 1,53 (9,23%)Da	21,33 \pm 2,31 (43,36%)Aa

Horas	Concentração (mg.mL ⁻¹)	
	G2	G3
0	39,33 \pm 8,50 (0%)Ab	27,33 \pm 8,02 (0%)Ab
3	28,00 \pm 2,65 (28,81%)Ba	23,00 \pm 7,55 (15,85%)Ca
6	27,67 \pm 3,79 (29,66%)Ba	22,33 \pm 8,14 (18,29%)Ca
24	28,33 \pm 4,51 (27,97%)Ba	22,33 \pm 4,73 (18,29%)Ca
48	28,67 \pm 3,51 (27,12%)Ba	22,67 \pm 7,51 (17,07%)Ca
72	28,00 \pm 2,00 (28,81%)Ba	23,33 \pm 6,51 (14,63)Ca

G1, 12 mg/mL; G2, 9 mg/mL; G3, 6 mg/mL; C - = Água (controle negativo); Letras maiúsculas comparam as eficácias nas mesmas linhas e letras minúsculas nas colunas; letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Na Tabela 5 estão os resultados encontrados após a aplicação do H.30, os quais também evidenciaram um nítido efeito dose-dependente. Novamente as maiores eficácias foram visualizadas no G1, oscilando entre 42,53 a 37,93%. Estes resultados foram estatisticamente diferentes aos obtidos nos demais grupos ($P < 0,05$). As eficácias do G2 variaram de 28,30 a 25,47% e também são diferentes aos obtidos nos demais grupos ($P < 0,05$). Já o G3 apresentou no instante "T = 72 horas" uma eficácia semelhante esteticamente a obtido no grupo C- ($P < 0,05$), sendo as demais estatisticamente distintas aos demais grupos ($P > 0,05$). Quando comparadas as eficácias dentro do mesmo tratamento, nos grupo G1, G2 e C- os valores foram

semelhantes entre si ($P < 0,05$), exceto quando comparados com o intervalo inicial ($T = 0$ hora). Contudo no G3, além do intervalo inicial, a média do instante " $T = 72$ h" também foi estatisticamente diferente as demais ($P > 0,05$).

TABELA 5 - NÚMERO MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO (EFICÁCIA DO TRATAMENTO %) DE OOCISTOS DE *EIMERIA* SP. NO INTERVALO "T" APÓS A APLICAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE 30 DIAS OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

Horas (T)	Concentração (mg.mL ⁻¹)	
	C-	G1
0	29,33 \pm 4,16 (0%)Ab	29,00 \pm 4,58 (0%)Ab
3	26,67 \pm 5,51 (9,09%)Ca	17,67 \pm 3,51 (39,08%)Aa
6	27,00 \pm 6,93 (7,95%)Da	16,67 \pm 4,93 (42,53%)Aa
24	26,33 \pm 4,04 (10,23%)Da	17,00 \pm 5,00 (41,38%)Aa
48	27,33 \pm 2,52 (6,82%)Da	18,00 \pm 2,00 (37,93%)Aa
72	27,00 \pm 4,58 (7,95%)Ca	17,67 \pm 4,16 (39,08%)Aa

Horas	Concentração (mg.mL ⁻¹)	
	G2	G3
0	35,33 \pm 9,45 (0%)Ab	32,00 \pm 7,21 (0%)Ac
3	26,33 \pm 7,51 (25,47%)Ba	27,00 \pm 6,56 (15,63%)Ca
6	25,33 \pm 6,81 (28,30%)Ba	26,33 \pm 5,13 (17,71%)Ca
24	26,00 \pm 9,54 (26,42%)Ba	26,33 \pm 7,09 (17,71%)Ca
48	25,67 \pm 10,60 (27,36%)Ba	27,67 \pm 2,89 (13,54%)Ca
72	26,33 \pm 14,64 (25,47%)Ba	30,00 \pm 8,19 (6,25%)Cb

G1, 12 mg/mL; G2, 9 mg/mL; G3, 6 mg/mL; C - = Água (controle negativo); Letras maiúsculas comparam as eficácias nas mesmas linhas e letras minúsculas nas colunas; letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Por fim, na Tabela 6 estão os resultados depois da utilização do Aq e também apresentaram um efeito dose-dependente. Pode-se observar que as eficácias do G1 são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) as dos demais grupos, oscilando entre 28,30% a 25,47%. Os valores dos grupos G2 e G3 são todos semelhantes estatisticamente entre si ($P < 0,05$). O mesmo também ocorre quando comparamos os valores no instante

“T = 3h”, “T = 24h” e “T = 72h” encontrados nestes tratamentos e comparamos aos encontrados no C-. Nos tempos “T = 6h” e “T = 48h” os valores do grupo C- são diferentes estatisticamente aos dos demais tratamentos ($P < 0,05$). Quando comparadas as eficácias dentro do mesmo tratamento, nos grupo G1, G2 e G3 os valores foram semelhantes entre si ($P < 0,05$), exceto quando comparados com o intervalo inicial (T = 0 hora). Todavia, no C-, além do intervalo inicial, a média do instante “T = 6 h” e “T = 48h” também foram estatisticamente diferentes as demais e semelhantes entre si ($P > 0,05$).

TABELA 6 - NÚMERO MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO (EFICÁCIA DO TRATAMENTO %) DE OOCISTOS DE *EIMERIA* SP. NO INTERVALO “T” APÓS A APLICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO A PARTIR DA *ARTEMISIA ANNUA*.

Horas (T)	Concentração (mg.mL ⁻¹)	
	C-	G1
0	33,67 \pm 3,79 (0%)Ac	35,00 \pm 6,56 (0%)Ab
3	30,33 \pm 4,51 (9,90%)Ba	26,33 \pm 5,13 (24,76%)Aa
6	32,33 \pm 2,89 (3,96%)Cb	26,00 \pm 1,73 (25,71%)Aa
24	30,67 \pm 4,04 (8,91%)Ba	26,67 \pm 5,13 (23,81%)Aa
48	32,00 \pm 2,65 (4,95%)Cb	25,00 \pm 7,00 (28,57%)Aa
72	30,00 \pm 4,36 (10,89%)Ba	25,67 \pm 4,04 (26,67%)Aa

Horas	Concentração (mg.mL ⁻¹)	
	G2	G3
0	32,33 \pm 8,02 (0%)Ab	31,33 \pm 7,09 (0%)Ab
3	28,33 \pm 7,02 (12,37%)Ba	28,00 \pm 5,00 (10,64%)Ba
6	29,00 \pm 7,55 (10,31%)Ba	27,67 \pm 7,64 (11,70%)Ba
24	29,33 \pm 7,23 (9,28%)Ba	28,33 \pm 4,93 (9,57%)Ba
48	28,00 \pm 7,21 (11,34%)Ba	28,67 \pm 6,43 (8,51%)Ba
72	28,00 \pm 7,21 (13,40%)Ba	27,33 \pm 4,51 (12,77%)Ba

G1, 12 mg/mL; G2, 9 mg/mL; G3, 6 mg/mL; C - = Água (controle negativo); Letras maiúsculas comparam as eficácias nas mesmas linhas e letras minúsculas nas colunas; letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

Manter o ambiente com uma carga de *Eimeria* sp. baixa é recomendável, pois faz com que o animal entre em contato com o parasita e assim estimula o sistema imune a desenvolver uma resposta frente ao agente. Ao mesmo faz com que essa infecção seja controlada, não provocando graves lesões e assim não interferindo no estado geral do animal (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Foi escolhida a *Artemisia annua* para ser testada, pois diversos experimentos já comprovaram a eficácia dessa planta no combate a eimeriose. Allen *et al.* (1997), relataram efeitos preventivos contra a infecção por *Eimeria tenella* e *E. acervulina*. Com o fornecimento de folhas secas de *A. annua* para as galinhas. Brisibe *et al.* (2009), identificaram que além de ajudar a combater a coccidiose, a suplementação com 20% de folhas secas na dietas das galinhas melhorou o ganho de peso e a qualidade da gema dos ovos. Almeida *et al.* (2011), concluíram que o uso preventivo de *A. annua*, a um nível diário superior a 4 mg de artemisinina por kg de peso corporal, pode reduzir significativamente a eliminação de oocistos em frangos naturalmente infectados com o protozoário.

Os resultados obtidos na marcha fitoquímica corroboram com os encontrados na literatura (BRISIBE *et al.*, 2009). Entre eles estão compostos que possuem comprovado efeito antiparasitário, como os taninos (MCCANN *et al.*, 2006) e flavonóides (NAIDOO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). Estes metabólitos secundários são potentes estimulantes do sistema imune animal, melhorando muito a resposta frente a desafios infecciosos, inflamatórios e parasitários (BRISIBE *et al.*, 2009; AZANDO *et al.*, 2011). Logo, quando os dois estão presentes em quantidades significativas, é um bom indicio de que a planta possui boas propriedades anti-helmínticas (VAN KRIMPEN *et al.*, 2010; KAKITI *et al.*, 2013).

A resistência aos anticoccidianos é um problema antigo na avicultura (PEEK; LANDMAN, 2003). Além disso, hoje em dia, os consumidores solicitam produtos de aves que estão livres de todos os tipos de resíduos químicos (HARPER; MAKATOUNI, 2002). Logo, a utilização de produtos naturais, como uma alternativa aos fármacos pode ser a melhor solução para esta demanda do consumidor (REMMAL *et al.*, 2011). A eficácia dos extratos no presente experimento ficou abaixo de 45%. Contudo, o

resultado apresentado neste trabalho teve uma clara ação dose-dependente. McDonnell e Russell (1999) classificam os oocistos como os agentes etiológicos mais resistentes à destruição, após os príons. A eliminação dos oocistos do ambiente é difícil devido a sua alta resistência à destruição por produtos químicos (BELLI, SMITH, FERGUSON; 2006). Esse sucesso à desinfecção química a qualquer agente químico, até mesmo a ácidos ou bases fortes, se deve a parede do oocisto, estrutura que o protege e é vital para o parasita, sendo composta de múltiplas camadas de diferentes composições, tornando o protozoário virtualmente indestrutível (BOWMAN et al., 2006; MAI et al., 2011).

Remmal et al., (2011), incubaram oocistos de *Eimeria* sp. com quatro óleos essenciais, incluindo *Artemisia*, com o objetivo de destruir a parede de oocistos. Os dados *in vitro* obtidos via leitura em espectrofotômetro, demonstraram que a máxima destruição ocorreu após 6 h de contato entre o protozoário e os fitoterápicos. Nesse experimento, apesar de ter sido utilizada uma boa quantidade de fitoterápico nas camas não se pode garantir que elas tenham ficado inteiramente impregnadas com a solução contendo os extratos. Com isso, o tempo de contato entre os produtos e os parasitos pode ter sido prejudicado, fazendo com que a eficácia observada tenha ficado abaixo do esperado.

Os melhores resultados foram encontrados nos extratos H.7 e H.30, sendo os dois iguais estatisticamente ($P > 0,05$). O menor efeito foi observado no extrato aquoso. Acredita-se que isso tenha ocorrido pelo fato de o extrato aquoso possuir uma menor quantidade de artemisinina, o principal composto da planta. Outra importante causa pode ter sido devido à menor porcentagem de fenóis totais encontrado no mesmo extrato. A classe dos compostos fenólicos abrange uma vasta gama de metabólitos secundários presentes nos vegetais superiores, entre eles estão os flavonóides e taninos (ÂNGELO; JORGE, 2007). Estes três últimos compostos citados, são apontados com os principais responsáveis pela ação da *A. annua* frente a eimeriose (BRISIBE et al., 2009).

Os flavonóides geralmente são os compostos com maior responsabilidade pela atividade antioxidante das plantas (GONZALEZ-GALLEGO, SANCHEZ-CAMPOS, TUNON; 2007). Essa propriedade confere a este composto um elevado efeito anti-helmíntico (MOLAN et al., 2003). Os taninos reduzem o metabolismo do parasita, por se ligar aos nutrientes e indisponibilizá-los (MAKKAR et al., 2006). O principal metabólito da

planta, que possui a maior parcela de responsabilidade pelas atividades anti-helmínticas, é a artemisinina (DEBNATH *et al.*, 2011). Este composto interfere nas proteínas de transporte na mitocôndria do parasita e modula a função imune do hospedeiro (GOLENSER *et al.*, 2006). Também é reportado que a artemisinina pode alquilar certas proteínas do parasita, embora o alvo molecular específico ainda não tenha sido descoberto (O'NEILL, BARTON, WARD; 2010). Mais especificamente, para coccidiose, acredita-se que ocorra uma interferência no sistema reprodutivo do protozoário, fazendo com que novas proles não sejam formadas e com isso não aumente a população do parasita (ARAB *et al.*, 2006). Outro mecanismo de ação do composto ocorre pela redução na capacidade dos oocistos eliminado esporular ou sobreviver no ambiente, devido a alterações no metabolismo do protozoário (DEL CACHO *et al.*, 2010). Contudo, muitos estudos vêm sendo realizados para elucidar a atividade da artemisinina frente ao protozoário e esclarecer melhor os métodos já descobertos (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Há indícios que a ação do gênero *Artemisia* provavelmente ocorra devido ao seu potencial antioxidante e ainda pelo sinergismo dos metabólitos presentes na planta, que aumentam sua atividade farmacológica (BLANKE *et al.*, 2008). Ao visualizar os resultados dos testes antioxidantes, vemos que os extratos H.7 e H.30, apresentaram os melhores resultados. A *A. annua* possui um dos maiores níveis de capacidade de absorção do oxigênio radical (ORAC), o que faz dela uma das plantas com maior atividade antioxidante existente (BRISIBE *et al.*, 2009). Essa alta atividade se deve ao elevado conteúdo fenólico presente na planta, sendo mais de 50 compostos distintos, sendo a maioria pertencente ao grupo dos flavonóides (FERREIRA; LUTHRIA; SASAKI, 2010). Plantas que apresentam boa atividade antioxidante são de grande interesse científico, uma vez que a presença de radicais livres está associada a diversos fatores; como mutação do DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, que contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose, câncer, diabetes, envelhecimento celular e processos inflamatórios (FINKEL; HOLBROOK, 2000; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Para fitoterápicos testados *in vivo*, uma elevada atividade antioxidante é uma característica desejável, tanto pela defesa direta do organismo e os danos oxidativos, quanto pela melhoria do estado imunológico do animal (YUAN *et al.*, 2009).

Para estabelecer a toxicidade dos fitoterápicos, foi usado o ensaio de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, por possuir alta confiabilidade para testar o efeito tóxico de fitoterápicos com propriedades antiparasitárias (FERNÁNDEZ-CALIENES VALDÉS *et al.*, 2009). RAMAZARI *et al.* (2010) pesquisaram, com o mesmo teste por nós realizado, cinco diferentes espécies de *Artemisia* sp. e verificaram que a *A. scoparia* e *A. dracunculus* demonstraram toxicidade mediana (DL50 100–500 µg/ml). Já a *A. vulgaris*, *A. annua* e *A. absinthium* apresentaram baixa toxicidade (DL50 >1,000 µg/ml). Extratos com alta toxicidade neste teste (DL50 < 1,000 µg/ml) mostram boa correlação com uma atividade inseticida (UCHIDA *et al.*, 2005) e tripanossomicida (ALVES *et al.*, 2000). Todavia, extratos com baixa toxicidade (DL50 > 1,000 µg/ml) possuíam propriedades desejáveis para utilização no controle de parasitas no ambiente (RUIZ *et al.*, 2005).

Os resíduos de anti-helmíntico no meio ambiente são de grande preocupação, pois muitos deles não são degradáveis e ficam por muito tempo no ambiente contaminado (solo, rios e lençóis freáticos) até serem degradados (HORVAT *et al.*, 2012). No presente experimento, o extrato pulverizado na cama das aves, teve um efeito nos oocistos e pelo teste de toxicidade realizado demonstrou que não ocorra contaminação ambiental. O objetivo do uso deste fitoterápico é que o produtor possa aplicá-lo no momento de vazio sanitário quando da entrada de um novo lote de aves e mesmo em criações totalmente orgânicas que o mesmo possa ser pulverizado até mesmo quando as aves estejam no ambiente, seja galpão ou em pequenas áreas abertas.

Os resultados encontrados nos testes fitoquímicos aliados ao resultado neste teste fazem com que os extratos produzidos possuam propriedades antiparasitárias e ao mesmo tempo não sejam tóxicos ao meio ambiente.

5.5 CONCLUSÃO

Os exames bioquímicos demonstraram que os extratos possuem uma grande quantidade de compostos que possuem características anticoccidianas. Quanto aos tratamentos aplicados e analisando a dimensão do problema causado pela *Eimeria* sp., concluímos que os extratos hidroalcoólicos de 7 e de 30 dias apresentaram um efeito satisfatório, ao passo que o extrato aquoso possuiu uma menor eficácia. Todavia, os três produtos demonstraram uma clara ação dose-dependente. Novos estudos necessitam ser realizados, uma vez que se obtiveram resultados promissores, para elucidar as reais propriedades destes fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

ALBERT, J.; LINGLE, C. J.; MARDER, E.; O'NEIL, M. B. A GABA-activated chloride conductance not blocked by picrotoxin on spiny lobster neuromuscular preparations. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 771-779, 1986.

ALLEN, P. C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. **Poultry Science**, v. 76, p.1156–1163, 1997.

ALMEIDA, G. F.; HORSTED, K.; THAMSBORG, S. M.; KYVSGAARD, N.C.; FERREIRA, J. F. S.; HERMANSEN J. E. Use of *Artemisia annua* as a natural coccidiostat in free-range broilers and its effects on infection dynamics and performance, **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 178–187, 2012.

ALMEIDA, P. A.; DA SILVA, T. M. S.; ECHEVARRIA, A. Mesoionic 5-alkyl-1, 3-dithiolium-4-thiolates: Synthesis and brine shrimp toxicity. **Heterocyclic Communications**, v. 8, n. 6, p. 593-600, 2011.

ALVES, T. M. D.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARAB, H. A.; RAHBARI, S.; RASSOULI, A.; MOSLEMI, M. H.;KHOSRAVIRAD, F. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. **Tropical animal health and production**, v. 38, n. 6, p.497-503, 2006.

AZANDO, E. V. B.; HOUNZANGBÉ-ADOTÉ, M. S.; OLOUNLADÉ, P. A.; BRUNET, S.; FABRE, N.; VALENTIN, A.; HOSTE, H. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the excystation of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, p. 292-297, 2011.

BELLI, S. I.; SMITH, N. C.; FERGUSON, D. J. The coccidian oocyst: a tough nut to crack!. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 9, p. 416-423, 2006.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso**, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BLANKE, C. H.; NAISABHA, G. B.; BALEMA, M. B.; MBARUKU, G. M.; HEIDE, L.; MÜLLER, M. S. Herba Artemisiae annuae tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double-blind clinical trial, **Tropical doctor**, v. 38, n. 2, p. 113-116, 2008.

BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. São Paulo, Manole, 2006. 60p.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P. M.; FERREIRA, J. F. S.; LUTHRIA, D.; WU, X.; PRIOR, R. L. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. **Food chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1240-1246, 2009.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; OWAI, P. U.; BRISIBE, F. Dietary inclusion of dried *Artemisia annua* leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p. 4083–4092, 2008.

CARDOZO, S. P.; YAMAMURA, M. H. Parasitas em produção de frangos nos sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 1, p. 63-74, 2004.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CONDER, G. A.; CAMPBELL, W. C. Chemoterapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**, v.35, p. 1-84, 1995.

DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 143–163, 2006.

DEBNATH, C.; DOBERNIG, A.; SAHA, P.; ORTNER, A. Electrochemical Determination of Artemisinin in *Artemisia annua* L Herbal Tea Preparation and Optimization of Tea Making Approach. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 55, n. 1, p. 57-62, 2011.

DEL CACHO, E.; GALLEGO, M.; FRANCESCH, M.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 506-511, 2010.

DEL CACHO, E.; GALLEGO, M.; LÓPEZ-BERNARD, F.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 3-4, p. 287-300, 2004.

DING, X., LILLEHOJ, H. S., QUIROZ, M. A., BEVENSEE, E., & LILLEHOJ, E. P. Protective immunity against *Eimeria acervulina* following in ovo immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes. **Infection and immunity**, v. 72, n. 12, p. 6939-6944, 2004.

DU, A.; HU, S.; WANG, S. *Eimeria tenella*: Ginsenosides-enhanced immune response to the immunization with recombinant 5401 antigen in chickens. **Experimental parasitology**, v. 111, n. 3, p. 191-197, 2005.

Fanatico, A. Parasite Management for Natural and Organic Poultry: Coccidiosis. **NCAT Agriculture Specialist**: p. 1-11, 2006.

FERNÁNDEZ-CALIENES VALDÉS, A.; MENDIOLA MARTÍNEZ, J.; MONZOTE FIDALGO, L.; GARCÍA PARRA, M.; SARIEGO RAMOS, I.; ACUÑA RODRÍGUEZ, D.; LIZAMA, R. C.; GUTIÉRREZ GAITÉN, Y. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 61, n. 3, p. 254-258, 2009.

FERREIRA, J. F. S.; LUTHRIA, D. L.; SASAKI, T. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3135-3170, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 480, p. 239-247, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, FAOSTAT – FAO Statistics Division/ProdSTAT: livestock (primary and processed). 2011.

GARCIA, L. A. F. **Economias de escala na produção de frangos de corte no Brasil.** Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2003; 136p.

GOLENSER, J.; WAKNINE, J. H.; KRUGLIAK, M.; HUNT, N.; GRAU, G. E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1427–1441, 2006.

GONZALEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUNON, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutrición Hospitalaria**, v. 22, n.3, p. 287-293, 2007.

HARPER, G. C.; MAKATOUNI, A. Consumer perception of organic food production and farm animal welfare. **British Food Journal**, v. 104, n. 3/4/5, p. 287-299, 2002.

HORVAT, A. J.; PETROVIĆ, M.; BABIĆ, S.; PAVLOVIĆ, D. M.; AŠPERGER, D.; PELKO, S.; MANCE, A. D.; KAŠTELAN-MACAN, M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 61-84, 2011.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p. 605–612, 2007.

KINNAIRD, J. H.; BUMSTEAD, A. M.; MANN, D. J.; RYAN, R.; SHIRLEY, M. W.; SHIELS, B. R.; TOMLEY, F. M. EtCRK2, A cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the *Eimeria tenella* life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 683-692, 2004.

LI, G. Q.; KANU, S.; XIANG, F. Y.; XIAO, S. M.; ZHANG, L.; CHEN, H. W.; YE, H. J. Isolation and selection of ionophore-tolerant *Eimeria* precocious lines: *E. tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*. **Veterinary parasitology**, v. 119, n. 4, p. 261-276, 2004

LUCHESI, F. C.; PERIN, M.; AITA, R. S.; MOTTIN, V. D.; MOLENTO, M. B.; MONTEIRO, S. G. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Sciences**, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

MAI, K.; SMITH, N. C.; FENG, Z. P.; KATRIB, M.; ŠLAPETA, J.; ŠLAPETOVA, I., WALLACH, M. G.; BELLI, S. I. Peroxidase catalysed cross-linking of an intrinsically unstructured protein via dityrosine bonds in the oocyst wall of the apicomplexan

parasite, *Eimeria maxima*. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 11, p. 1157-1164, 2011.

MAKKAR, H. Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. In: Sandoval-Castro, C.; Howell, F. D.; Torres-Acosta, J. J.; Ayala-Burgos, A.; **The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds**. Nottingham University Press, p. 235-249, 2006.

MARCHESE, J. A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1999; 88p.

MCCANN, M. E. E.; NEWELL, E.; PRESTON, C.; FORBES, K. The use of mannan-oligosaccharides and/or tannin in broiler diets. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 9, p. 873-879, 2006.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MENON, R. B.; KANNOTH, M. M; TEKWANI, B. L.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; AVERY, M. A. A new library of C-16 modified artemisinin analogs and evaluation of their anti-parasitic activities. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 9, n. 10, p. 729-741, 2006.

MISHINA, Y. V.; KRISHNA, S.; HAYNES, R. K.; MEADE, J. C. Artemisinins inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1852–1854, 2007.

MOLAN, A. L.; MEAGHER, L. P.; SPENCER, P. A.; SIVAKUMARAN, S. Effect of flavan-3ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*, **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 1691-1698, 2003.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1469-1477, 2005.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Ricketioses, Ouro Preto - MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, s. 1, p. 82-87, 2004.

MUELLER, M. S.; RUNYAMBO, N.; WAGNER, I.; BORRMANN, S.; DIETZ, K.; HEIDE, L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 318–321, 2004.

NAIDOO, V.; MCGAW, L. J.; BISSCHOP, S. P. R.; DUNCAN, N.; ELOFF, J. N. The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. **Veterinary parasitology**, v. 153, n. 3, p. 214-219, 2008.

NIANG, T. M. S. **Suplementação de betaína em rações de frangos de corte infectados experimentalmente com *Eimeria acervulina* (Tyzzer, 1929)**. Dissertação (Mestrado) -: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFFRJ), Seropédica – RJ, 2005; 90p.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues, **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1705-1721, 2010.

OLIVEIRA, U. C.; FRAGA, J. S.; LICOIS, D.; PAKANDL, M.; GRUBER, A. Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Parasitology**, v. 176, n.2, p. 275-280, 2011.

OLIVO, C. J.; HEIMERDINGER, A.; ZIECH, M. F.; AGNOLIN, C. A.; MEINERZ, G. R.; BOTH, F.; CHARÃO, P. S. Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. **Ciências Rural**, v. 39, n. 4, p. 1131-1135, 2009.

PEEK, H. W.; LANDMAN, W. J. M. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. **Avian Pathology**, v. 32, n. 4, p. 391-401, 2003.

REMMAL, A.; ACHAHBAR, S.; BOUDDINE, L.; CHAMI, N.; CHAMI, F. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.182, p. 121–126, 2011.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 98-102, 2005.

RUSTAIYAN, A.; MASOUD, S. Chemical constituents and biological activities of Iranian *Artemisia* species. **Phytochemistry Letters**, v. 247, p. 440-447, 2011.

SILVA, M. K.; LOVATTO, P. A.; ANDRETTA, I.; LEHNEN, C. R.; FRAGA, B. N. Relação entre infecção por coccídeos com dados epidemiológicos e clínicos em frangos de corte: uma meta-análise. **III Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos, Dois Vizinhos – PR, 2009.

UCHIDA, R.; IMASATO, R.; YAMAGUCHI, Y.; MASUMA, R.; SHIOMI, K.; TOMODA, H. New sesquicillins, insecticidal antibiotics produced by albophoma sp. FKI-1778. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 6, p. 397-404, 2005.

USDA - United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. disponível em http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2008/livestock_poultry_10-2008.pdf, acessado em 12 de abril de 2011.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; N'DRI, A.; LENGELER, C.; XIAO, S.; TANNER, M. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial, **Lancet**, v. 355, p. 1320–1325, 2000.

UTZINGER, J.; XIAO, S. H.; TANNER, M.; KEISER, J. Artemisinins for schistosomiasis and beyond, **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 8, n. 2, p.105–116, 2007.

VAN KRIMPEN, M. M.; BINNENDIJK, G. P.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GAASENBEEK, C. P. H. Anthelmintic effects of phytogetic feed additives in *Ascaris suum* inoculated pigs. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 3, p. 269-277, 2010.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; PEREIRA, M. F.; DANTAS, L. B.; XIMENES, L. J. F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North – East Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes, **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 150, n. 5, p. 447-452, 1999.

WANG, M. L.; SUO, X.; GU, J. H.; ZHANG, W. W.; FANG, Q.; WANG, X. Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: effect on chicken coccidiosis and antioxidant status. **Poultry science**, v. 87, p. 11, p. 2273-2280, 2008.

WILLCOX, M.; BODEKER, G.; BOURDY, G.; DHINGRA, V.; FALQUET, J.; FERREIRA, J. F. S.; GRAZ, B.; HIRT, H. M.; HSU, E.; MAGALHÃES, P. M.; PROVENDIER, D.; WRIGHT, C. W. ***Artemisia annua* as a traditional herbal antimalarial**. Traditional Medicinal Plants and Malaria, *RC Press, Boca Raton*, 2004; p. 43-59.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2005**. Geneva, 2005, 294p.

YUAN, C.; HUANG, X.; CHENG, L.; BU, Y.; LIU, G.; YI, F.; ZHENGMEI, Y.; SONG, F. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 581-584, 2009.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coccidiose é a principal parasitose na avicultura contemporânea, tanto nas produções industriais como nas agroecológicas, causando grandes prejuízos econômicos aos produtores. Na caprinocultura, este espaço é ocupado pelos nematódeos gastrintestinais, que causam uma grande redução na produção de carne e leite, além de causar inúmeros transtornos à saúde dos hospedeiros.

Os dois problemas são normalmente solucionados com o uso de produtos químicos antiparasitários. Contudo com o uso indiscriminado e sem conhecimento epidemiológico dos fatores envolvidos nas infecções, esses produtos acabaram perdendo gradativamente a sua eficácia, chegando ao ponto em que muitos deles não são mais eficazes frente aos seus parasitas alvos. Este fenômeno biológico é denominado resistência parasitária, e ocorre quando uma droga não consegue manter a mesma eficácia, se utilizada nas mesmas condições, após um determinado período de tempo. Estes parasitas sobreviventes, passam os genes da resistência para a sua prole, agravando cada vez mais o quadro.

Entre as diversas ferramentas existentes para contornar a ineficácia das drogas, a fitoterapia é uma das mais promissoras. Diversos centros de pesquisas vêm desenvolvendo estudos com diversas plantas, buscando analisar a sua composição e assim entender os seus mecanismos de ação. A *Artemisia annua* é um espécime que está sendo muito trabalhado, pois já demonstrou possuir eficácia frente à diversos patógenos e possui em sua constituição diversos compostos com excelentes propriedades antiparasitárias.

Os dados levantados pela presente dissertação corroboram o que foi citado anteriormente, pois demonstramos por meio dos estudos bioquímicos desenvolvidos, que os extratos fitoterápicos produzidos da planta possuem diversos metabólitos secundários com propriedades tanto anticoccidianas como anti-helmintícas. Também há outros que podem melhorar tanto direto como indiretamente o sistema imunológico dos animais.

Ao testarmos os efeitos sobre a inibição da motilidade larvar e da eclodibilidade dos ovos de nematódeos gastrintestinais de caprinos, evidenciou-se que os extratos

possuem um enorme potencial antiparasitário. O mesmo ocorreu ao aplicarmos estes em camas de aves contaminadas com oocistos de *Eimeria* sp.

Em conclusão, observamos que novas técnicas de extração podem ser realizadas, com o intuito de buscar uma maximização nos resultados obtidos. Uma nova ferramenta *in vitro* necessita ser desenvolvida para avaliar o real efeito anticoccidiano dos extratos, uma vez que mesmo demonstrando o seu efeito no experimento realizado, este não possibilitou a expressão do potencial total dos produtos. As pesquisas com *A. annua* estão apenas no começo e pretendemos expandir os estudos dos fitoterápicos produzidos a partir desse vegetal, visando descobrir novas aplicações para estes fitoterápicos.

7. ANEXOS

7.1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	163
7.2 – MAPA ESQUEMÁTICO DO GALPÃO DOS FAISÕES.....	164
7.3 – VITA.....	165

|

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Curitiba, 30 de novembro de 2012.

Of. No. 025/2012, CEUA-SCA

Para: Lew Kan Sprenger
Assunto: Protocolo 031/2012

Prezado Lew Kan Sprenger,

Em relação ao projeto sob sua responsabilidade, avaliado por esta Comissão sob o protocolo número 031/2012 e intitulado "Investigação da atividade antiparasitária de extratos fitoterápicos de *Artemisia annua* em doenças parasitárias", vimos através deste informar que não cabe à Comissão de Ética no Uso de Animais avaliar experimentos realizados em animais não vertebrados.

Atenciosamente,



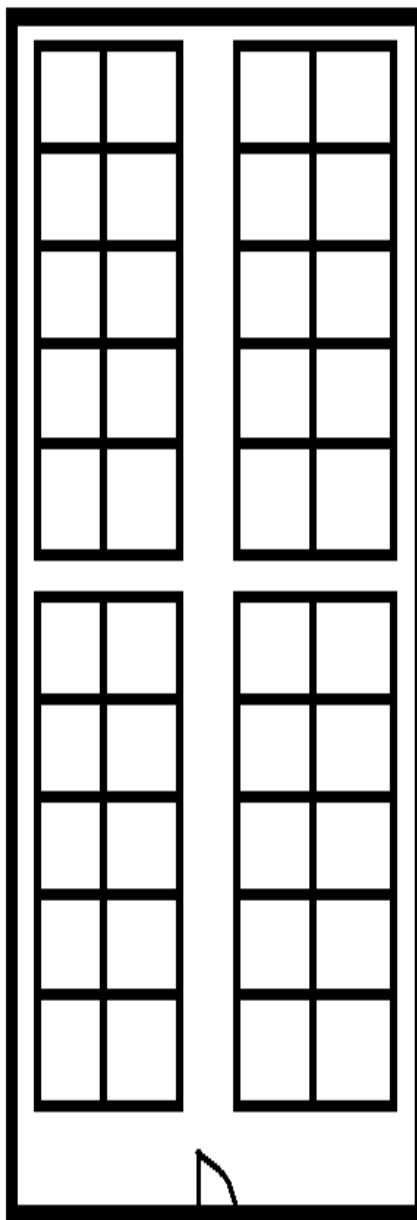
Patrick Schmidt
Presidente



Rosângela Locatelli Dittrich
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná

CIENTE: 
Lew Kan Sprenger
Proponente
DATA: 07/12 / 2012

MAPA ESQUEMÁTICO DO GALPÃO DOS FAISÕES

VITA

Lew Kan Sprenger é médico veterinário formado pela Universidade Federal do Paraná em 2011. Tem experiência na área de medicina Veterinária Preventiva, com ênfase em Doenças Parasitárias e Saúde Pública Veterinária, atuando nos temas: doenças parasitárias dos animais domésticos, epidemiologia, fitoterapia e zoonoses.

Durante a graduação, foi bolsista de projetos de extensão, iniciação científica e monitoria. Realizou estágio na Secretária Estadual de Saúde do Paraná – Divisão de Zoonoses, durante o período de dezembro de 2009 a janeiro de 2011. Ganhou o prêmio de melhor trabalho de iniciação científica no ano de 2010, durante o 18º Evento de Iniciação Científica da UFPR.