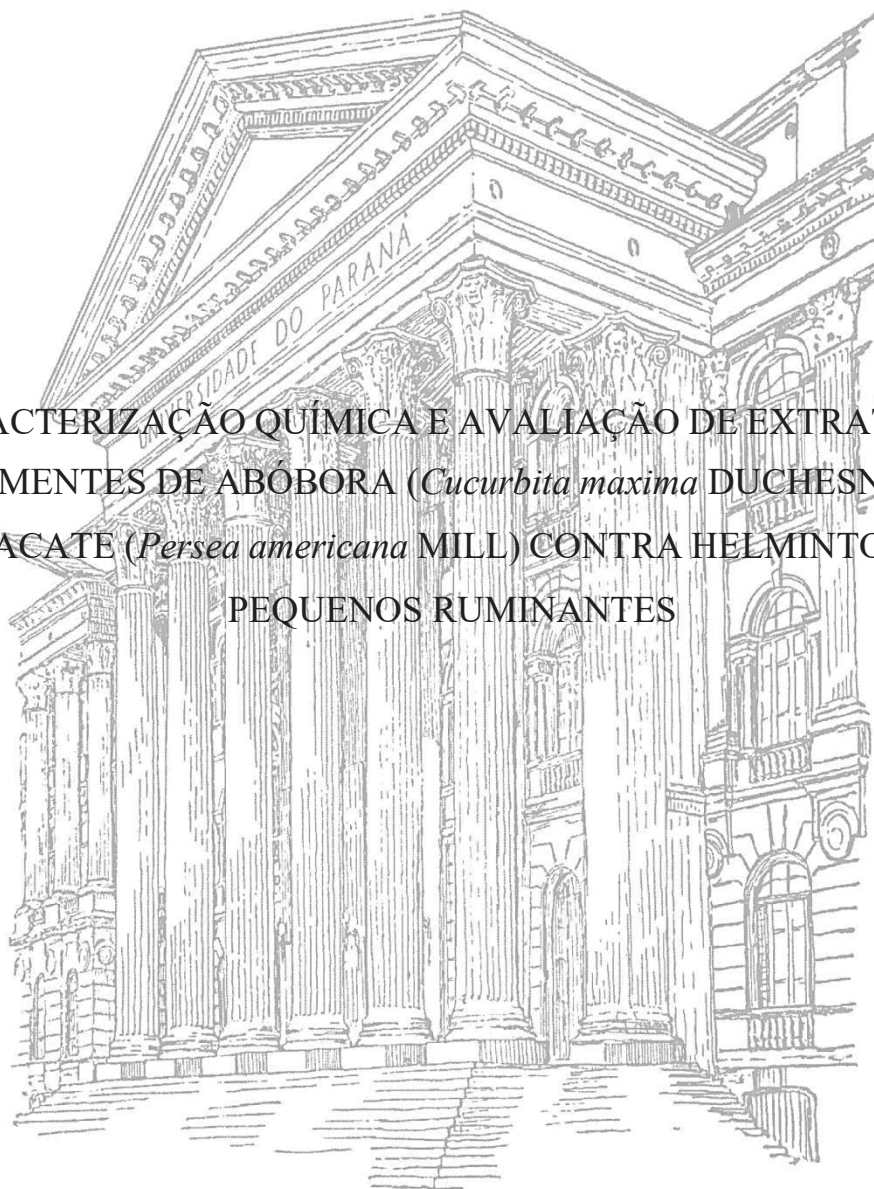


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA SOLDERA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE
SEMENTES DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima* DUCHESNE) E
ABACATÊ (*Persea americana* MILL) CONTRA HELMINTOS DE
PEQUENOS RUMINANTES



CURITIBA

2018

ANDRESSA SOLDERA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE
SEMENTES DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima* DUCHESNE) E ABACATE
(*Persea americana* MILL) CONTRA HELMINTOS DE PEQUENOS
RUMINANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências–Bioquímica, do Departamento de Ciências Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Bello Baron Maurer

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940).

Silva, Andressa Soldera da
Caracterização química e avaliação de extratos de sementes de abóbora
(*Cucurbita maxima* Duchesne) e abacate (*Persea americana* Mill) contra
helmintos de pequenos ruminantes. / Andressa Soldera da Silva. – Curitiba,
2018.

58 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Bello Baron Maurer.

Coorientador: Marcelo Beltrão Molento.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –
Bioquímica.

1. Abóbora. 2. Abacate. 3. Helmintos. 4. Fitoterapia. I. Título. II. Maurer,
Juliana Bello Baron. III. Molento, Marcelo Beltrão. IV. Universidade Federal
do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências – Bioquímica.

CDD (20. ed.) 615.32



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANDRESSA SOLDERA DA SILVA** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE SEMENTES DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima* DUCHESNE) E ABACATE (*Persea americana* MILL) CONTRA HELMINTOS DE PEQUENOS RUMINANTES**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Agosto de 2018.


JULIANA BELLO BARON MAURER
Presidente da Banca Examinadora


RODRIGO DANIEL OLLHOFF
Avaliador Externo


JONAS AUGUSTO RIZZATO PASCHOAL
Avaliador Externo


PEDRO MELILLO DE MAGALHÃES
Avaliador Externo


CARMELINDA DE OLIVEIRA PETROWICZ
Avaliador Interno

DEDICATÓRIA

À Deus, por dar força nas horas difíceis,
aos animais, por serem o ponto central deste trabalho
e aos amigos que tornaram essa jornada mais feliz.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus, meu grande companheiro de todas das horas! Agradeço pela vida, pela força e perseverança que muitas vezes foi o que me manteve firme nos meus objetivos.

Agradeço aos meus pais Edite e Pacheco por sempre me apoiarem e estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida. Aos meus irmãos de sangue Francine, Rodrigo e Pedro por fazer meus dias mais felizes só por existirem! À minha bonequinha preciosa que, apesar de eu não ter sido tão presente quanto gostaria nesses últimos quatro anos, sempre está nas minhas falas e sempre faz parte dos meus assuntos, Dudinha, a “madinha” te ama!

Ao meu amado Anderson, que durante esses anos sempre me motivou, apoiou e ajudou no que pode, o maior obrigado que eu posso dar. Obrigado não só por estar presente neste momento, mas também por realizar meus sonhos e possibilitar que outros surjam tendo a certeza de que juntos poderemos conquistar qualquer coisa. Obrigado meu amor, meu anjo da guarda!

Não posso deixar de agradecer aos amigos que, muitas vezes deixei de lado para trabalhar neste projeto, obrigado por compreenderem e sempre apoiarem! Às amigas e parceiras de tudo, Melina e Raquely, minhas irmãs científicas, obrigada pelos cafés, pelos churrascos, pelos experimentos, pela parceria nas coletas, pela cumplicidade e pela amizade pura e simples, obrigada por ser o meu abrigo.

Às professoras Juliana e Selma que me acompanham há 7 anos sempre com paciência e amizade, obrigada por serem minha inspiração, por formarem a cientista que sou hoje e pelas risadas sinceras e carinhosas sempre. Ao Luciano, meu tio Lu mais querido, obrigada por me ensinar a manusear o BOB, por todos os outros conhecimentos adquiridos nesses 7 anos de convivência e pela amizade de sempre. À Fabíola que deixou de ser uma professora admirada para ser uma parceira de trabalho e amiga, por nunca se esquecer de mim e acreditar no meu potencial. E ao professor Marcelo Molento pela oportunidade de trabalhar com técnicas e ambientes completamente diferentes dos vividos no mestrado.

Agradeço à EMBRAPA Pecuária Sul, à Rossana e ao Alessandro Minho por cederem gentilmente o espaço, tempo e compartilharem as técnicas que foram aplicadas no TML. E também à Prof^a Alda por permitir as coletas no LAPOC (Laboratório de Pesquisa em Ovinos e Caprinos) da UFPR.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica pelo apoio e incentivo e às professoras Selma F. Z. Baggio (Departamento de Bioquímica - UFPR) e Simone Tostes de Oliveira Stedile (PPG em Ciências Veterinárias - UFPR) pelas sugestões e correções dos relatórios.

À CAPES pela bolsa e ao CNPq e Proex – Carboidratos pelo apoio financeiro.

E por fim, agradeço a todos que de alguma forma possibilitaram que eu chegasse até aqui, obrigada.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Hoje em dia a contaminação das ovelhas por parasitas é global e o tratamento e metodologias de controle não são eficientes. O frequente tratamento destes animais com medicamentos alopatícos selecionou parasitas resistentes por isso, é necessário que outras formas de tratamentos sejam pesquisadas, uma delas é a fitoterapia. O objetivo deste estudo foi caracterizar os extratos e frações de sementes de *Persea americana* Mill. (Abacate) e *Cucurbita maxima* (abóbora), determinando a composição e a atividade anti-helmíntica *in vitro* contra larvas de terceiro estágio (L3) de *Haemonchus contortus*, parasito de ruminantes. As sementes de abacate e abóbora frescas (F) e secas (H) foram submetidas à extração com água quente (W-PAF, W-PAH - abacate e W-CMF, W-CMH - abóbora), etanol (E-PAF, E-PAH, E-CMF, E-CMH - abóbora) ou metanol a 70% (v/v) e partição com solventes de polaridade crescente [*n*-hexano (H-PAF, H-PAH - abacate, H-CMF, H-CMH - abóbora), clorofórmio (C-PAF, C-PAH - abacate, C-CMF, C-CMH - abóbora), acetato de etila (Ea-PAF, Ea-PAH - abacate, Ea-CMF, Ea-CMH - abóbora) e *n*-butanol (B-PAF, BPAH - abacate, B-CMF, B-CMH - abóbora)], produzindo um total de 14 extratos, também denominado de frações, para cada espécie. Depois de considerar o rendimento, a solubilidade em água e os resultados do teste de migração larval (TML), os extratos/frações E-PAF, E-PAH, H-PAF, H-PAH, H-CMF e H-CMH foram selecionadas para experimentos posteriores. E-PAH apresentou concentração de eficiência de 50% (EC₅₀) de 36 µg/mL e H-CMH de 63 µg/mL no TML. E-PAH mostrou a maior eficiência, quando sua EC₅₀ foi comparada às demais frações extraídas das sementes de abacate (E-PAF = 147 µg/mL, H-PAF = 800 µg/mL, H-PAH = 77 µg/mL). Em seguida, o extrato E-PAH foi caracterizado quimicamente, considerando seus teores de polifenólicos e flavonoides quantitativos por técnicas colorimétricas e cromatográficas. E-PAH apresentou 50, 38 e 24 mg/g de matéria seca de fenol total, taninos condensados (TC) e de flavonoides, respectivamente. Utilizando análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o extrato E-PAH mostrou ter epicatequina (4,7 µg/mL), rutina (2,8 µg/mL), ácido clorogênico (1,4 µg/mL) e quercetina (não quantificado), como seus principais constituintes. Estes compostos foram avaliados utilizando o TML para relacionar a composição com a atividade anti-helmíntica observada para a E-PAH. Quercetina (EC₅₀ = 7,8 µg/mL) e epicatequina (EC₅₀ = 10 µg/mL) apresentaram maior eficiência que a rutina (EC₅₀ = 30 µg/mL). O ácido clorogênico também foi testado com o TML, mas não apresentou eficiência significativa. De acordo com os resultados, a composição fenólica do extrato E-PAH e de valores de EC₅₀ obtidos para os fenóis isolados, pode-se sugerir que, além do teor de TC, a presença de epicatequina e rutina contribuíram para a atividade antiparasitária/larvicida da E-PAH. Na eclodibilidade de ovos, E-PAH atingiu 0% de eclosão e esta atividade pode estar associada à presença de ácido clorogênico no extrato. H-CMH apresentou concentração de eficiência de 50% (EC₅₀ =) menor quando comparada às demais frações extraídas das sementes de abóbora (H-CMF = 700 µg/mL). Em seguida, a fração H-CMH foi caracterizada química e fitoquimicamente, considerando seus teores de polifenólicos e flavonoides quantitativos por técnicas colorimétricas. H-CMH apresentou 64 e 5 mg/g de matéria seca de carboidrato total e TC, respectivamente. Na eclodibilidade de ovos, o extrato E-CMF atingiu 8% de eclosão e esta atividade pode estar relacionada com a presença de cucurbitacina B, uma vez que este composto foi identificado no extrato metanólico de *C. moschata*, uma abóbora do mesmo gênero. Em conclusão, as sementes de abacate e abóbora podem ser usadas como fonte de polifenóis com aplicações anti-helmínticas promissoras.

Palavras-chave: *Persea americana*, *Cucurbita maxima*, fitoterapia, *Haemonchus contortus*, anti-helmíntico, teste de migração larval, teste de eclosão de ovos, etnoveterinária.

ABSTRACT

Today, the contamination of sheep by parasites is a global problem and the treatment and control methodologies are not efficient. The frequent treatment of these animals with synthetic drugs has triggered resistance in the parasites so it is necessary that other forms of treatments be researched, one of them is phytotherapy. The aim of this study was to characterize the extracts and fractions of *Persea americana* Mill. (avocado) and *Cucurbita maxima* (pumpkin) seeds and to determine the composition and the in vitro anthelmintic activity against third stage larvae (L3) of *Haemonchus contortus*. The fresh (F) and dried (H) seeds of avocado (PA) and pumpkin (CM) were subjected to extraction with hot water (W-PAF, W-PAH - avocado / W-CMF, W- E-PAH / E-CMF, E-CMH - pumpkin) or methanol 70% (v/v), and partition with solvents of increasing polarity [*n*-hexane (H-PAF, H-PAH - avocado / H-CMF , H-CMH (pumpkin), chloroform (C-PAF, C-PAH-avocado / C-CMF, C-CMH- pumpkin), ethyl acetate (Ea-PAF, Ea-PAH- avocado / Ea - CMF, Ea – CMH – pumpkin) and *n*-butanol (B-PAF, B-PAH-avocado / B-CMF, B-CMH-pumpkin)] yielding a total of 14 extracts/ fractions for each species. After considering the yield, water solubility, and the preliminary results of the larval migration test (LMT), the E-PAF, E-PAH, H-PAF, and H-PAH were selected for further experiments. E-PAH presented an efficiency concentration of 50% (EC₅₀) of 36 µg/mL on the LMT. E-PAH showed the greatest efficiency when its EC₅₀ was compared to the other fractions (E-PAF=147 µg/mL; HPAF = 801 µg/mL; H-PAH = 77 µg/mL). After that, the E-PAH was chemically characterized, considering its quantitative polyphenolic and flavonoid contents by colorimetric and chromatographic techniques. E-PAH presented 50, 38, and 24 mg/g of dry matter of total phenol, condensed tannins (CT), and flavonoid contents, respectively. Using high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, E-PAH had shown to have epicatechin (4.7 µg/mL), rutin (2.8 µg/mL), and chlorogenic acid (1.4 µg/mL) as its main constituents besides quercetin. These isolated compounds were evaluated using the LMT in order to relate the composition to the anthelmintic activity observed for E-PAH. Quercetin (EC₅₀=7.8 µg/mL) and epicatechin (EC₅₀=10 µg/mL) presented a higher efficiency than rutin (EC₅₀=30 µg/mL). Chlorogenic acid was also tested with the LMT but did not present a significant efficiency. According to the results, the phenolic composition of E-PAH and the EC₅₀ values obtained for the isolated phenols, it can be suggested that, besides the CT content, the presence of epicatechin and rutin contributed to the larvicidal activity of E-PAH. In egg hatchability, E-PAH reached 0% of hatching and this activity may be associated to the presence of chlorogenic acid in the extract H-CMH presented the greatest EC₅₀ when its was compared to the other fractions extracted from pumpkin seeds (H-CMF = 700 µg / mL). After that, the H-CMH fraction was characterized chemically and phytochemically, considering its polyphenolic and quantitative flavonoid contents by colorimetric techniques. H-CMH presented 64 and 5 mg / g of total carbohydrate dry matter and condensed tannins (TC) respectively. In egg hatchability, the E-CMF extract reached 8% of hatching and this activity may be related to the presence of cucurbitacin B, since this compound was identified in the methanolic extract of *C. moschata*, a pumpkin of the same genus. In conclusion, avocado and pumpkin seeds can be used as a source of polyphenols with promising anthelmintic applications.

Key-words: *Persea americana*, *Cucurbita maxima*, phitotherapy, *Haemonchus contortus*, anthelmintic test, larval migration test, egg hatch test, etnoveterinary.

LISTA FIGURAS

FIGURA 1. BIOSÍNTESE RESUMIDA DE QUERCETINA E RUTINA.....	10
FIGURA 2. EXEMPLOS DE TANINOS HIDROLISÁVEIS. A: EXEMPLO DE GALOTANINO (2-O-DIGALOIL-1,3,4,6-TETRA-O-GALOIL-B-D-GLUCOPIRANOSE). B: EXEMPLO DE ELAGITANINO (TELIMAGRANINA II).	12
FIGURA 3. TANINOS CONDENSADOS MAIS FREQUENTES NA NATUREZA.....	12
FIGURA 4. ESTRUTURA DO ESQUELETO DAS CUCURBITACINAS	16
FIGURA 5. FÓRMULA GERAL DO CUCURBITOSÍDEO.....	17
FIGURA 6. ESQUEMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DAS SEMENTES DE ABACATE (PA) E ABÓBORA (CM) (A) E DENOMINAÇÃO DAS FRAÇÕES (B).	21
FIGURA 7. APARATO UTILIZADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL	25
FIGURA 8. FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABACATE (<i>Persea americana</i>) E INFORMAÇÕES SOBRE RENDIMENTOS E SOLUBILIDADE.	28
FIGURA 9. PLANO DE SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABACATE (<i>Persea americana</i>) UTILIZANDO O ENSAIO BIOGUIADO.....	29
FIGURA 10. EFICIÊNCIA (%) PRELIMINAR DAS FRAÇÕES (A)W-PAF, (B) W-PAH. (C) E-PAF, (D) E-PAH, (E) H-PAF E (F) H-PAH SELECIONADAS PELO ENSAIO BIOGUIADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE <i>Haemonchus contortus</i>	31
FIGURA 11. EFICIÊNCIA (%) DE E-PAF (A; EC ₅₀ = 147 µG/ML), E-PAH (B; EC ₅₀ = 36 µG/ML), H-PAF (C; EC ₅₀ = 801 µG/ML) E H-PAH (D; EC ₅₀ = 77 µG/ML) DE SEMENTES DE PERSEA AMERICANA NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE <i>Haemochus contortus</i>	34
FIGURA 12. PERFIL DE CLAE A 280 HM DOS PADRÕES FENÓLICOS (A), E-PAH (B) E E-PAH SUBMETIDOS AS 0, 2H, 4,5H E 6H DE EXPOSIÇÃO À LUZ (C).....	36
FIGURA 13. EFICIÊNCIA DOS PADRÕES COMERCIAIS (%) DE EPICATEQUINA (A; EC ₅₀ = 10 µG/ML), QUERCETINA (B; EC ₅₀ = 8 µG/ML), RUTINA (C; EC ₅₀ = 30 µG/ML) E ÁCIDO CLOROGÊNICO (D; EC ₅₀ NÃO CALCULADO) USANDO O	

TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE <i>Haemonchus contortus</i>	38
FIGURA 14. ECLODIBILIDADE DE OVOS (%) DOS EXTRATOS E-PAF (A) E E-PAH (B)	39
FIGURA 15. ESQUEMA DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABÓBORA (<i>Cucurbita maxima</i>) E INFORMAÇÕES SOBRE RENDIMENTOS E SOLUBILIDADE.....	41
FIGURA 16. PLANO DE SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABÓBORA (<i>Cucurbita maxima</i>) UTILIZANDO O ENSAIO BIOGUIADO.	42
FIGURA 17. EFICIÊNCIA (%) PRELIMINAR DAS FRAÇÕES (A)W-CMF, (B) W-CMH. (C) E-CMF, (D) E-CMH, (E) H-CMF E (F) H-CMH SELECIONADAS PELO ENSAIO BIOGUIADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE <i>Haemonchus contortus</i>	43
FIGURA 18. EFICIÊNCIA (%) DE H-CMF (A; EC ₅₀ = 700 µG/ML) E H-CMH (B; EC ₅₀ = 63 µG/ML) DE SEMENTES DE CUCURBITA MAXIMA NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE <i>Haemochus contortus</i>	45
FIGURA 19. ECLODIBILIDADE DE OVOS (%) DOS EXTRATOS E-CMH (A) E E-CMF (B).....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MEDICAMENTOS USADOS PARA O TRATAMENTO DE HELMINTOSES EM RUMINANTES.	5
TABELA 2. TIPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	9
TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS CONDENSADOS DE ACORDO COM O PADRÃO DE HIDROXILAÇÃO DA MOLÉCULA.....	12
TABELA 4. TEOR DE CARBOIDRATOS E TANINOS CONDENSADOS DOS EXTRATOS (E-PAF, E-PAH) E FRAÇÕES (H-PAF, H-PAH) OBTIDOS DAS SEMENTES DE ABACATE.....	32
TABELA 5. TEOR DE CARBOIDRATOS E TANINOS CONDENSADOS DAS FRAÇÕES H-CMF E H-CMH OBTIDOS DAS SEMENTES DE ABÓBORA.....	44
TABELA 6. COMPOSTOS FITOQUÍMICOS IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO H-CMH.	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ATP	Adenosina trifosfato
B-CMF	Fração butanólica de sementes frescas de <i>C. maxima</i>
B-CMH	Fração butanólica de sementes secas de <i>C. maxima</i>
B-PAF	Fração butanólica de sementes frescas de <i>P. americana</i>
B-PAH	Fração butanólica de sementes secas de <i>P. americana</i>
C-CMF	Fração clorofórmica de sementes frescas de <i>C. maxima</i>
C-CMH	Fração clorofórmica de sementes secas de <i>C. maxima</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C-PAF	Fração clorofórmica de sementes frescas de <i>P. americana</i>
C-PAH	Fração clorofórmica de sementes secas de <i>P. americana</i>
Ea-CMF	Fração acetato de etila de sementes frescas de <i>C. maxima</i>
Ea-CMH	Fração acetato de etila de sementes secas de <i>C. maxima</i>
Ea-PAF	Fração acetato de etila de sementes frescas de <i>P. americana</i>
Ea-PAH	Fração acetato de etila de sementes secas de <i>P. americana</i>
EC ₅₀	Concentração necessária para atingir 50% da eficiência
E-CMF	Extrato etanólico de sementes frescas de <i>C. maxima</i>
E-CMH	Extrato etanólico de sementes secas de <i>C. maxima</i>
E-PAF	Extrato etanólico de sementes frescas de <i>P. americana</i>
E-PAH	Extrato etanólico de sementes secas de <i>P. americana</i>
EPI	Epicatequina
GAE	Ácido gálico
GluCl	Canais iônicos com barreira de glutamato
H-CMF	Fração hexânica de sementes frescas de <i>C. maxima</i>
H-CMH	Fração hexânica de sementes secas de <i>C. maxima</i>
H-PAF	Fração hexânica de sementes frescas de <i>P. americana</i>
H-PAH	Fração hexânica de sementes secas de <i>P. americana</i>
IgE	Imunoglobulina E
kDa	kilo Daltons
L1	Larva estágio 1 de desenvolvimento
L2	Larva estágio 2 de desenvolvimento
L3	Larva estágio 3 de desenvolvimento
M-CMF	Extrato metanólico de sementes frescas de <i>C. maxima</i>
M-CMH	Extrato metanólico de sementes secas de <i>C. maxima</i>
M-PAF	Extrato metanólico de sementes frescas de <i>P. americana</i>
M-PAH	Extrato metanólico de sementes secas de <i>P. americana</i>
RUT	Rutina
TC	Taninos condensados
TH	Taninos hidrolisáveis

Th1	Resposta imunológica inata
Th2	Resposta imunológica adquirida
TML	Teste de migração larval
v/v	Volume/volume
W-CMF	Extrato aquoso de sementes frescas de <i>C. maxima</i>
W-CMH	Extrato aquoso de sementes secas de <i>C. maxima</i>
W-PAF	Extrato aquoso de sementes frescas de <i>P. americana</i>
W-PAH	Extrato aquoso de sementes secas de <i>P. americana</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. OVINOS E PARASITOSE	3
2.2. CONTROLE DE PARASITOSSES.....	4
2.3. PLANTAS MEDICINAIS	8
2.3.1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	8
2.3.2. <i>Persea americana</i> MILL.....	14
2.3.3. <i>Cucurbita maxima</i> DUCHESNE	15
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	20
4.2. ENSAIO BIOGUIADO.....	22
4.3. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E QUÍMICA	22
4.3.1. ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	22
4.3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	23
4.3.2. TESTE DE ESTABILIDADE A LUZ DA FRAÇÃO E-PAH	23
4.4. TESTES ANTIPARASITÁRIOS.....	24
4.4.1. COLETA DE FEZES E COPROCULTURA	24
4.4.2. TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS – TML MODIFICADO.....	24
4.4.3. TESTE DE ECLODIBILIDADE DE OVOS – TEO	25
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA, ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1. RESULTADOS REFERENTES A SEMENTES DE <i>Persea americana</i>.....	27
5.1.1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SELECIONADOS POR ENSAIO BIOGUIADO	27

5.1.2.	TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL E DETERMINAÇÃO DO EC ₅₀ DOS EXTRATOS/FRAÇÕES SELECIONADOS	32
5.1.3.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE E-PAH.....	33
5.1.5.	TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL E DETERMINAÇÃO EC ₅₀ DOS PADRÕES.....	37
5.1.6.	INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) DAS FRAÇÕES ETANÓLICAS DE <i>Persea americana</i>	39
5.2.	RESULTADOS REFERENTES AS SEMENTES DE <i>Cucurbita maxima</i>	40
5.2.1.	SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SELECIONADOS POR ENSAIO BIOGUIADO	40
5.2.2.	TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL E DETERMINAÇÃO DO EC ₅₀ DAS FRAÇÕES SELECIONADAS.....	44
5.2.3.	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA FRAÇÃO H-CMH.....	45
5.2.4.	INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) DAS FRAÇÕES ETANÓLICAS DE <i>Cucurbita maxima</i>	46
6.	CONCLUSÕES.....	48
7.	REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

As ovelhas foram os primeiros animais a serem domesticados e criados para a subsistência do ser humano. Além de proverem o leite e a carne para a alimentação, delas se extrai a lã, pelo e couro utilizados para a confecção de tecidos para o vestuário (CRUZ, 2002). No Brasil, o rebanho de ovinos chegou a 18,4 milhões de cabeças em 2016, sendo a região Nordeste do país a responsável por 63% da produção nacional de ovinos (EMBRAPA, 2017).

Ovinos são sensíveis a parasitoses, o que dificulta a sua criação. O uso de meios para prevenir a infestação por parasitas bem como a sua propagação é uma atitude imprescindível para a manutenção do rebanho (NETO, 2011). Dentre as parasitoses que mais afetam os ovinos estão aquelas causadas por helmintos gastrintestinais. Estes parasitas podem limitar o aproveitamento econômico dos animais, uma vez que são capazes de atingir todas as faixas etárias. Animais infectados apresentam atraso no desenvolvimento corpóreo, qualidade da carne e da lã inferiores quando comparados com animais saudáveis e, até mesmo a morte, sobretudo de animais jovens (CALVETE, et al., 2014).

O principal helminto causador de patologias gastrintestinais em ovinos é o *Haemonchus contortus*. Esse parasita é objeto de pesquisa desde os anos 60, principalmente no Brasil, onde é predominante. O ciclo de vida deste parasita apresenta duas fases distintas: a de vida livre, a qual ocorre no ambiente e, a de vida parasitária, que ocorre no interior dos ovinos (KUMARASINGHA, et al., 2016).

Para o tratamento das parasitoses causadas por este parasita são utilizados medicamentos disponíveis no mercado e que podem ser adquiridos no Brasil sem a necessidade de receita médica. Devido à alta frequência na vermifugação dos animais, há um problema global de resistência aos medicamentos disponíveis no mercado (MULCAHY, et al., 2004; CAVALCANTE, et al., 2009). Além disso, a alta frequência da vermifugação pode promover danos ao ambiente, pois os resíduos destes fármacos são eliminados pelas fezes dos animais contaminando solo e água e consequentemente atingindo outros organismos não-alvo prejudicando sua sobrevivência (HORVAT, et al., 2012).

Além do uso de drogas sintéticas, existem outras maneiras de se realizar o combate dos helmintos, uma delas é o uso de plantas medicinais. Diferentes partes de diversas plantas vêm sendo exploradas para este fim e a maior parte do conhecimento a respeito destas plantas vêm de fontes etnoveterinárias (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006). O efeito anti-helmíntico destas plantas contribui para atenuar a dinâmica da infecção e ainda causar

efeitos positivos na resiliência do hospedeiro. Estes efeitos, geralmente estão associados à presença de metabólitos secundários, como por exemplo, taninos e outros polifenóis (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011).

As plantas a serem estudadas neste trabalho são a *Persea americana*, conhecida como abacate e a *Cucurbita maxima*, popularmente conhecida como abóbora moranga. O abacate pertence a família Lauraceae, é originário das regiões tropicais do novo mundo e cultivado em todo o planeta. Sua polpa é amplamente consumida crua ou utilizada na culinária latino-americana, principalmente a mexicana (DABAS, et al., 2013, JIMÉNEZ-ARELLANES, et al., 2013). A abóbora é pertencente à família Cucurbitaceae, originária das Américas e cultivada em todo o planeta. É amplamente utilizada na culinária, principalmente em datas festivas nos EUA, como o dia das bruxas (SANTOS, 2009; PATEL, 2013). As sementes de ambas apresentam indícios de atividade antiparasitária em helmintos (PATEL, 2013; DABAS, et al., 2013)

Tendo em vista a dificuldade de criação de um rebanho saudável de ovinos devido a recorrentes infecções parasitárias, a problemática de parasitas resistentes aos medicamentos comerciais e a alternativa com o uso de plantas medicinais no tratamento de parasitoses, a hipótese deste trabalho é que extratos das sementes de *P. americana* e *C. maxima* tem ação anti-helmíntica *in vitro* contra parasitas intestinais de ovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OVINOS E PARASITOSE

A maior parte da produção mundial de ovinos, cerca de 60%, ocorre em regiões temperadas, onde as condições de pastejo são ideais. A partir destes animais é possível se obter carne, lã, leite e pele, demonstrando o valor comercial da produção dos mesmos, uma vez que um animal pode gerar mais de um produto (MORRIS, 2017).

A produção mundial de ovelhas caiu nos últimos anos (MORRIS, 2017) e isso se deve aos altos custos de reprodução e reposição dos animais aos rebanhos. Contudo, esses animais tem a capacidade de se adaptar a terras desfavoráveis para outras formas de agricultura, tais como montanhas, onde o gado não consegue pastar e por isso ainda é uma boa opção para os criadores (MORRIS, 2009).

Além do alto custo para a manutenção do rebanho (MORRIS, 2017), há outros problemas que interferem na produção de ovinos. Um deles é a alta taxa de parasitose, principalmente pelo helminto hematófago *H. contortus*, responsável pela maior perda econômica no empreendimento de pequenos ruminantes (MUCHIUT, et al., 2010). Cada parasita pode ingerir até 30µL de sangue por dia, causando anemia de diversas severidades, podendo levar a morte de indivíduos, quando a infecção é maior que 500 vermes por animal (EMERY; HUNT; LE JAMBRE, 2016).

O ciclo de vida deste helminto ocorre em duas fases: de vida livre e parasitária, cada uma em um local específico. A fase de vida livre ocorre inteiramente fora do hospedeiro. Na fase parasitária, fêmeas adultas colocam os ovos no abomaso, que são eliminados juntamente com as fezes. Em condições adequadas de temperatura e umidade, após 24h forma-se uma larva no interior do ovo. Esta larva de primeiro estágio (L1) eclode e se alimenta de microrganismos presentes nas fezes. Se as condições ambientais permanecerem adequadas, em até 5 dias a L1 sofre duas mudas para L2 e L3. A larva L3 é a forma infectante do parasita, que quando ingerida dará continuidade ao ciclo de vida parasitário. Esta larva não se alimenta, é resistente às mudanças ambientais e consegue se deslocar das fezes, podendo ser encontrada em regiões sombreadas da pastagem e em gotas de orvalho (MONTEIRO, 2011). O *H. contortus* é um helminto sensível ao frio e à falta de umidade, tendo sua atividade inibida quando a temperatura está abaixo dos 10 °C. O sombreamento também é um fator importante para a sobrevivência das larvas, uma vez que a sombra é um ambiente mais úmido e protegido

dos raios UV, que também podem danificar o parasita (MELO, 2005). A larva L3 pode permanecer no ambiente por até 150 dias, se as condições ambientais forem propícias (MONTEIRO, 2011).

Na fase de vida parasitária, a larva L3 é ingerida pelos animais juntamente com o pasto e direcionada ao abomaso, onde a larva se infiltra na mucosa. Neste local, a larva sofre uma muda e volta para o rúmen do órgão e se transforma em indivíduo adulto capaz de reproduzir e liberar ovos. O tempo desde a ingestão até a liberação dos primeiros ovos é, em média, de 18 a 21 dias. Os principais sinais clínicos que os animais infectados apresentam são o baixo desenvolvimento corporal, pelos sem brilho e arrepiados, diarreia, edema mandibular, anemia e perda do apetite (GIRARDI; BRAGA, 1997).

2.2. CONTROLE DE PARASITOSSES

De maneira geral, existem três formas diferentes de se interromper o ciclo de vida do *H. contortus*: limitar o contato entre hospedeiro e a forma infectiva do parasita através do manejo do pasto; aumentar a resistência/resiliência do hospedeiro por diferentes meios e eliminar os vermes do hospedeiro através de diferentes tipos de tratamento (KEARNY, et al., 2016).

Muitos produtores utilizam o manejo de pasto como uma forma de limitar o contato entre parasitas e hospedeiros. A metodologia é a rotatividade de pastos, em que foi possível reduzir a contaminação dos pastos e conseqüentemente a reinfecção pelo parasita (SANTOS; SILVA; AMARANTE, 2012; KEARNEY, et al., 2016).

Um conceito importante a ser lembrado sobre a relação parasita/hospedeiro é a resiliência. Segundo Alberts e colaboradores (1987), resiliência é a “habilidade do hospedeiro manter um nível razoável de produtividade diante de um desafio parasitário”, ou seja, a capacidade de hospedeiro e parasita coexistirem de tal maneira que a saúde do animal não seja muito afetada. Uma maneira de se aumentar a resiliência dos hospedeiros é o aumento de proteínas na dieta diária dos animais, o que leva a um aumento na resistência aos efeitos adversos causados pelos parasitas, gerando uma melhor produção (KHAN; SAHOO; KARIM, 2017). Outra maneira de se aumentar a resiliência no rebanho é a seleção ou criação de animais geneticamente resistentes (EMERY; HUNT; LE JAMBRE, 2016).

O método FAMACHA é outra alternativa para evitar que esta pressão de seleção seja maior que o desejado. Este método é baseado em sinais clínicos apresentados pelos hospedeiros, tais como coloração da conjuntiva ocular, porcentagem de ovos por grama de fezes (OPG) e condição corporal do animal. Somente os animais que apresentarem sinais

clínicos ruins (grau de anemia) serão tratados, os que, apesar da infecção, não apresentarem sinais clínicos ruins não são tratados. Desta maneira a população de refúgia (população susceptível aos medicamentos) é mantida (KEARNEY, et al., 2016).

Com o intuito de eliminar o parasita do hospedeiro e evitar que o rebanho se contamine, os criadores de pequenos ruminantes utilizam medicamentos antiparasitários com diferentes princípios ativos que agem de diferentes formas (ALBUQUERQUE, et al., 2017). A TABELA 1 mostra os anti-helmínticos utilizados com maior frequência em ruminantes.

TABELA 1. MEDICAMENTOS USADOS PARA O TRATAMENTO DE HELMINTOSES EM RUMINANTES.

Classes	Medicamentos
Benzimidazois	Oxfendazol
	Fenbendazol
	Albendazol
	Praziquantel
	Triclabendazol
Imidazóis	Levamisol
Lactonas Macrocíclicas	Ivermectina
	Abamectina
	Doramectina
	Moxidectina
Derivados de amino acetoneitrila	Monepantel
Salicinidinas / fenois substituídos	Closantel
	Disofenol
	Rafoxanide
	Nitroxinil
Benzenofunamida	Clorsulon
Organofosforado	Triclofon

FONTE: Adaptado de AMARANTE, 2014.

Benzimidazois têm sua estrutura química muito semelhante, variando somente seu radical que está diretamente relacionado com a toxicidade do composto. Contudo, o mecanismo de ação é comum a todos: inibição da formação de microtúbulos. Com isso, a manutenção da homeostase celular é comprometida resultando na morte do parasita (FURTADO; BELLO; RABELO, 2016).

Os imidazois estão disponíveis no mercado desde os anos 1970 e compreendem uma grande quantidade de medicamentos. Um deles é o levamisol que possui como mecanismo de ação a abertura dos canais iônicos transportadores de acetilcolina dos parasitas causando uma despolarização de membrana e consequentes espasmos musculares do mesmo. Desta maneira, o parasita é impossibilitado de aderir à mucosa estomacal do hospedeiro e é expelido do

organismo. Outra ação deste medicamento é o bloqueio da enzima succinato desidrogenase, o qual bloqueia a produção de ATP pelas células do parasita (CHANDY, et al, 2016). Nesta classe de medicamentos é comum a bioacumulação e contaminação de carne e leite. O mesmo acontece com medicamentos de outras classes como o nitroxinil e o closantel (salicidina), em que a legislação recomenda que os produtos dos animais não sejam destinados ao consumo humano antes de 60 e 30 dias, respectivamente (AMARANTE, 2014).

Dentre as lactonas macrocíclicas, temos duas classes principais de medicamentos: as avermectinas e as milbemicinas. A ivermectina é a principal avermectina utilizada para o controle do *H. contortus*. Ela é conhecida como um fármaco semissintético antiparasitário com mecanismo de ação relacionado à alteração na motilidade das larvas, agindo como agonista do neurotransmissor GABA, nas células do sistema nervoso e de ligantes dos canais de cloro, ativados por glutamato em células neuronais e musculares (LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017). No entanto, o aumento da população parasitária resistente a esta droga tem sido verificada e vários autores relatam a situação atual de resistência a drogas, relacionando-se com as principais famílias de anti-helmínticos do mundo (GAUDIN, et al., 2016; CAMPOS, et al., 2017). Ainda entre as avermectinas, há outras moléculas comumente utilizadas com o mesmo propósito, por exemplo: abamectina, eprinomectina, doramectina e selamectina. As milbemicinas são representadas pelas moléculas de moxidectina e milbemicima oxima. Todas as moléculas da classe das lactonas macrocíclicas possuem um anel de 16 membros, as avermectinas possuem um dissacarídeo ligado ao C13 do anel, nas milbemicinas esta estrutura é ausente. O mecanismo de ação destes compostos é o bloqueio dos canais iônicos com barreira de glutamato (GluCl_s) presentes em nematódeos. Os medicamentos promovem uma hiperpolarização da membrana plasmática, que inibe a contração muscular do parasita, imobilizando-o (GODOY, et al., 2015). Assim como o nitroxinil e closantel, os produtos dos animais tratados com lactonas macrocíclicas também possuem uma carência de 28 a 35 dias dependendo da legislação do local (AMARANTE, 2014).

Além do impacto nos animais e seus produtos, os resíduos destes fármacos podem causar impactos no ambiente, uma vez que eles são eliminados pelas fezes dos animais. Deste modo solo, água e plantas presentes em ambientes próximos de locais onde há criação de ovinos podem ser contaminados com estes resíduos e prejudicar outros animais não alvo que dependam destes recursos para a sua sobrevivência. Dentre todos os medicamentos descritos neste trabalho, os benzimidazóis são os que apresentam menores efeitos negativos para o ambiente. O levamisol demonstrou efeito tóxico em diversas espécies aquáticas importantes

que atuam como bioindicadores de qualidade da água. As lactonas macrocíclicas são as que apresentam efeitos mais severos no ambiente, pois grande parte do do medicamento (98%) administrado no animal é eliminada nas fezes de maneira intacta. Estes fármacos podem causar efeitos maléficos na reprodução e variadas funções biológicas de animais. Para a ivermectina, 45% do total administrado nos animais são eliminados de maneira intacta nas fezes e tem durabilidade variável no ambiente (de 7 dias a meses dependendo das condições meteorológicas). Foi demonstrada a mortalidade em crustáceos que entraram em contato com a ivermectina, comprometendo a reprodução e crescimento destes animais, além de aumentar a frequência de machos nas proles. Também foi relatado que a frequência de fêmeas diminui nestas proles, o que pode levar a extinção destas espécies (AMARANTE, 2014; HORVAT, et al., 2012).

O uso de medicamentos é a primeira atitude dos produtores para a eliminação do parasita. No entanto, o uso frequente e indiscriminado destes produtos fez com que populações resistentes de parasitas fossem selecionadas. O monepantel foi o último medicamento alopático lançado no mercado e após quatro anos de uso já foram detectados casos de resistência em diferentes partes do mundo. Isso demonstra que quanto mais frequente é a administração destes medicamentos maior é a pressão de seleção feita nos parasitas fazendo com que sobrevivam os resistentes ao medicamento (ALBUQUERQUE, et al., 2017).

Os produtores podem utilizar outras maneiras para eliminar o parasita dos hospedeiros. Uma delas é a utilização de plantas medicinais, pois causam menos efeitos colaterais nos animais e quase não geram resíduos para o ambiente. Além disso, o uso destas plantas é mais viável e barato para o uso pelos produtores. Estas plantas vêm sendo utilizadas de diversas maneiras, uma delas é como suplemento em forragens bioativas; São extraídos compostos ativos de plantas medicinais de diferentes maneiras e de diferentes partes da planta e agem como diferenciais anti-helmínticos. Além disso, também funcionam como um meio de aumentar a imunidade dos animais (UDOBI, et al., 2018; KEARNEY, et al., 2016).

Na cultura etnoveterinária há muitas plantas com propriedades anti-helmínticas descritas, no entanto não são utilizadas somente para este fim. O uso eficaz destas plantas é limitado pela falta de conhecimento científico sobre seus reais efeitos, mecanismo de ação, dosagens, preparações, administração corretas e possível toxicidade. Há muitas plantas descritas como antiparasitárias, que quando passaram por testes científicos não apresentaram bons resultados, assim como também há plantas em que se obtêm resultados melhores do que esperados. Por estes motivos é necessária a pesquisa científica ajudar determinar os reais

efeitos das plantas sob condições conhecidas e verificáveis para que elas sejam utilizadas da melhor maneira possível (KEARNEY, et al., 2016).

2.3. PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais são utilizadas na busca pela cura de diferentes doenças desde tempos muito antigos. No início, elas eram utilizadas de acordo com os instintos, observações de animais e experiência de vida, sem qualquer conhecimento científico: de forma empírica. O primeiro relato de uso das plantas medicinais data de 5000 anos atrás, encontrado em Nagpur (Índia) em lajes de argila (*clay slab*) (PETROVSKA, 2012). Com o avanço da ciência, diferentes princípios ativos foram descobertos e comercializados e com isso, o uso das plantas *in natura* caiu em desuso. No entanto, devido aos efeitos colaterais e contraindicações que alguns medicamentos geraram, as plantas medicinais voltaram à tona. Hoje em dia há variadas farmacopeias espalhadas pelo mundo, onde se descrevem as aplicações das plantas medicinais com base nas observações e conhecimentos da medicina popular, adquiridos desde os tempos mais remotos, podendo ser usadas isoladamente ou em conjunto com medicamentos alopáticos (PETROVSKA, 2012).

Dentre os compostos presentes nas plantas medicinais que apresentam atividades biológicas, encontramos duas principais classes: os metabólitos primários, responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e estrutura das plantas, e os metabólitos secundários, produzidos a partir dos metabólitos primários e que possuem ações como atração de polinizadores e defesa da planta (SCHMIDT & CHENG, 2017). Mesmo com variados estudos sobre as ações das plantas medicinais, envolvendo o estudo sobre seus constituintes e seus princípios bioativos, ainda existem muitas plantas sem qualquer estudo científico sobre seus reais efeitos sobre mamíferos (FOGLIO, et al., 2006). Além disso, as plantas medicinais também podem apresentar toxicidade e ou até gerar alergias (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

2.3.1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Metabólitos secundários são conhecidos como essenciais para a aclimação e defesa da planta, no entanto não fazem parte de processos vitais da planta, como as vias metabólicas de produção de energia (fotossíntese e respiração celular). São metabólitos numerosos, acredita-se que existam mais de 100.000 metabólitos diferentes conhecidos somente para os sistemas de defesa da planta. Estes compostos possuem alto valor medicinal, uma vez que

desempenham um papel dinâmico na adaptação das plantas ao meio ambiente (WINK, 2003). No entanto, sua distribuição é limitada a algumas plantas e muitas vezes a regiões específicas delas, o que dificulta a obtenção de grandes quantidades para estudá-los (JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2017).

Metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com sua estrutura em: terpenos, fenólicos, compostos nitrogenados e compostos sulfurados (JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2017). A TABELA 2 apresenta os tipos de metabólitos secundários e suas subdivisões.

Terpenos correspondem à classe mais diversificada dentre os metabólitos secundários e são interligados entre si pela sua via biossintética provenientes do acetil-CoA ou intermediários da via glicolítica. Sua função, assim como os compostos sulfurados, é a de proporcionar a defesa das plantas sendo consideradas como toxinas. Os compostos nitrogenados, como os alcaloides, possuem ações farmacológicas conhecidas podendo agir como bloqueadores de canais iônicos, inibidores de enzimas, interferirem na neurotransmissão produzindo alucinações, perda de coordenação motora, convulsões, vômitos e morte. Assim como os terpenos e os compostos sulfurados, os compostos fenólicos também possuem função de defesa para as plantas. Também são conhecidos por seus efeitos anti-inflamatório, antioxidante, anticarcinogênico, entre outras funções biológicas importantes podendo agir como protetores contra efeitos oxidativos derivadas de doenças e estresse (TIWARI & RANA, 2015; BRANDÃO, et al., 2010).

TABELA 2. TIPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS		
TERPENOS derivados do isopreno	FENÓLICOS possuem anel benzênico/OH	NITROGENADOS possuem nitrogênio
Monoterpenos	Cumarinas	Alcaloides
Sesquiterpenos	Furano-cumarinas	Glucosídeos cianogênicos
Diterpenos	Lignina	Aminoácidos não proteicos
Sesterpenos	Flavonoides	
Triterpenos	Isoflavonoides	
Sesquaraterpenos	Taninos	
Tetraterpenos	Ácidos fenólicos simples	
Politerpenos		

Os flavonoides pertencem ao grupo dos compostos fenólicos responsáveis pelos pigmentos das flores, frutas e sementes. São moléculas que podem ser derivadas das chalconas, ácido chiquímico e dos fenilpropanoides. Trata-se de uma estrutura de baixa massa molecular (300 a 3000 Da) composta por 15 carbonos distribuídos em três anéis (DORNAS, et al., 2007; PETRUSSA, et al., 2013). Quercetina é um flavonoide com atividades biológicas tais como anti-inflamatória, anticancerígena e antioxidante. Devido a presença de grupos hidroxil em sua estrutura, a quercetina pode inibir a peroxidação lipídica por sua capacidade de doar elétrons e agir como quelante de radicais livres. A quercetina pode ser substituída com unidades de L-ramnose, D-glucose, galactose ou arabinose formando os flavonoides glicosilados (FIGURA 1) (NARAYANA, et al., 2001; LIN; ZHANG; CHENG, 2018).

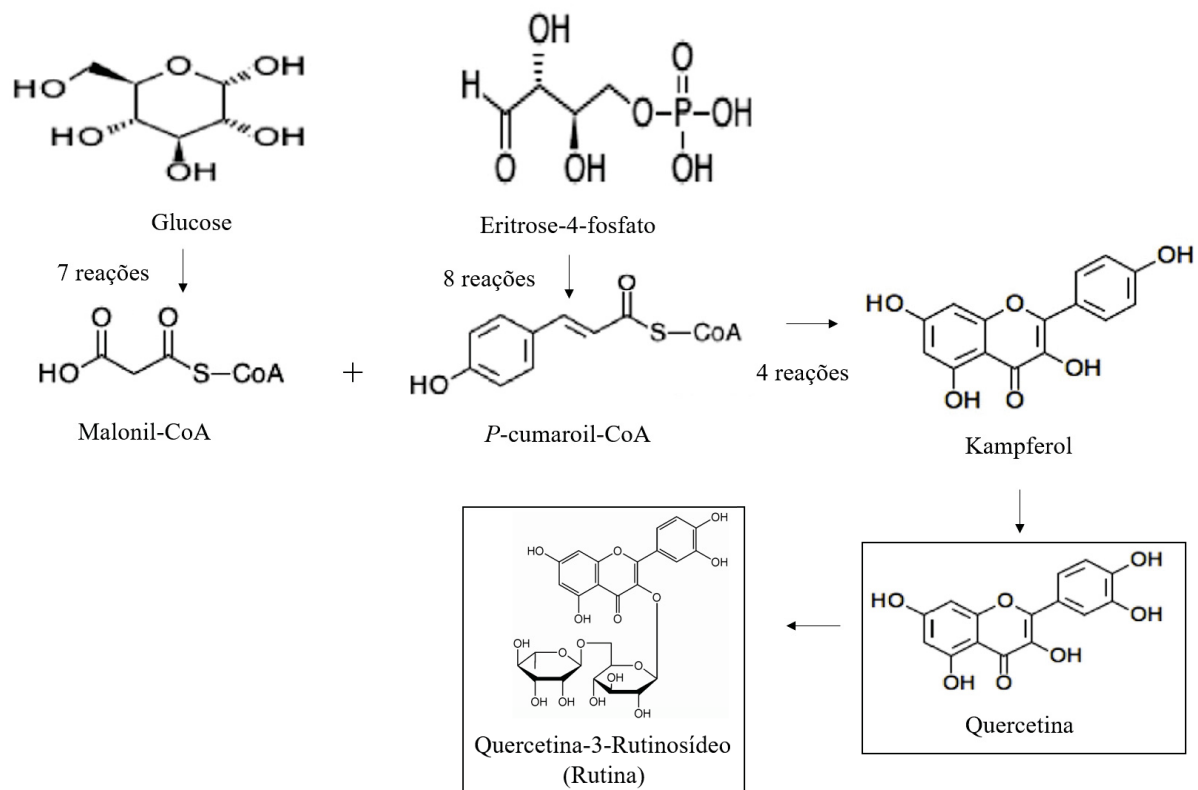


FIGURA 1. BIOSÍNTESE RESUMIDA DE QUERCETINA E RUTINA.
FONTE: Adaptado de LIN; ZHANG; CHENG, 2018.

Taninos são metabólitos secundários polifenólicos de plantas superiores (KHANBABAEE & REE, 2001) que apresentam um grande valor econômico e ecológico por serem adstringentes e muitas vezes impalatáveis podendo atuar como preventivo natural à herbivoria. Além disso, diversos estudos mostram sua potencial ação contra alguns microorganismos. Também foram identificados potenciais como agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática, no entanto estas características estão relacionadas com a

utilização do composto em altas doses e do tipo de tanino. Dietas ricas em taninos demonstraram seu potencial uso como anti-inflamatórios e cicatrizantes (MONTEIRO, et al., 2005).

Plantas taníferas podem possuir até 10% da matéria seca de suas folhas constituídas de taninos (JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2017). Sua estrutura química possibilita a formação de pontes de hidrogênio intra- e intermoleculares e sofrem oxidação facilmente ocasionando escurecimento das plantas e soluções. Taninos também tem a capacidade de formar complexos com proteínas, íons metálicos e outras macromoléculas como polissacarídeos (MONTEIRO, et al., 2005). De acordo com a sua estrutura, taninos podem ser classificados como hidrolisáveis, compostos por ésteres de ácido gálico e ácido elágico glicosilados, ambos formados a partir do ácido chiquímico, e de condensados, que consistem de proantocianidinas (flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol) provenientes do metabolismo do fenil propanol (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

Taninos hidrolisáveis (TH) constituídos de unidades repetidas de ácido gálico são denominadas de galotaninos (MACÁKOVÁ, et al., 2015). Sua estrutura possui um anel central de glucose rodeado por unidades de ácido gálico. Enquanto que os taninos hidrolisáveis do tipo elangitaninos são compostos por ácido hexahidrodistânico em sua estrutura (FIGURA 2) (MACÁKOVÁ, et al., 2015).

Taninos condensados (TC) são polímeros compostos por unidades repetidas de catequinas (KHANBABAEE & KEE, 2001). Também podem ser chamadas de proantocianidinas por serem precursores das antocianidinas. Os taninos condensados mais frequentes são os polímeros de catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e epigalocatequina galato (FIGURA 3). Sua diversidade estrutural é causada pela variação no padrão de hidroxilação das moléculas, bem como estereoquímica do centro quiral e a localização e tipo de ligação interflavana. Há também a presença de derivados *O*-metilados, *C*- e *O*-glicosilados e *O*-galoilados. De acordo com o padrão de hidroxilação, os taninos condensados podem ser classificados de acordo com a TABELA 3. As procianidinas podem ser classificadas de acordo com o número de monômeros presentes na molécula: procianidina A (dois monômeros ligados por 2 ligações), procianidina B (dois monômeros ligados por uma ligação interflavana) e procianidina C (três monômeros ligados por ligações interflavanas) (MACÁKOVÁ, et al., 2015).

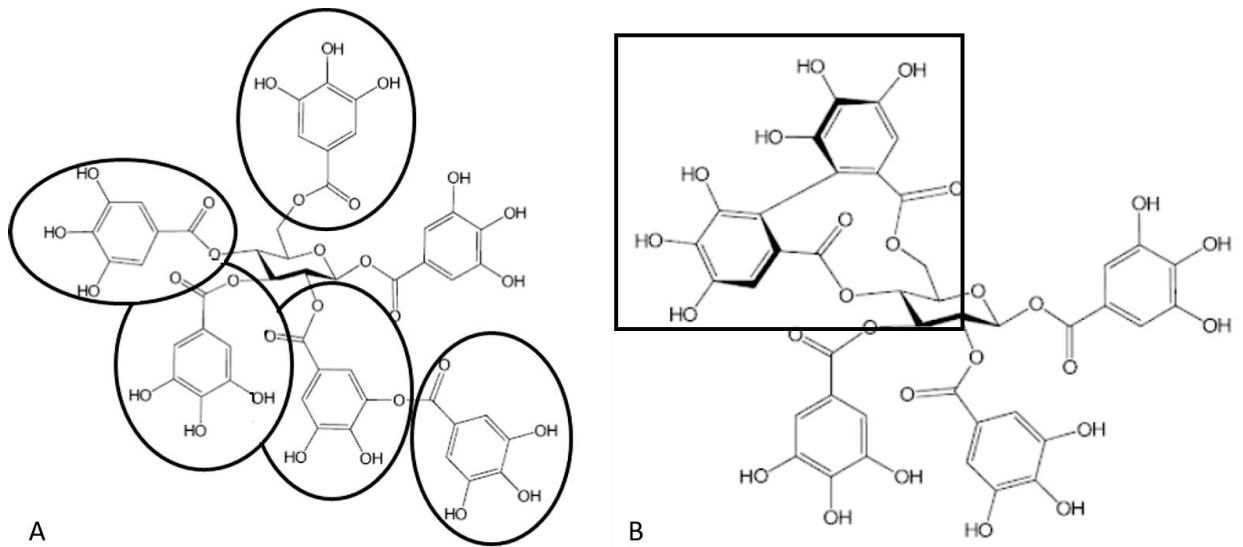


FIGURA 2. EXEMPLOS DE TANINOS HIDROLISÁVEIS. A: EXEMPLO DE GALOTANINO (2-O-DIGALOIL-1,3,4,6-TETRA-O-GALOIL-B-D-GLUCOPIRANOSE). B: EXEMPLO DE ELAGITANINO (TELMAGRANDINA II).

NOTA: Círculos evidenciam unidades de ácido gálico e retângulo evidencia uma unidade de ácido hexahidrodifênico

FONTE: Adaptado de MACÁKOVÁ, et al., 2015

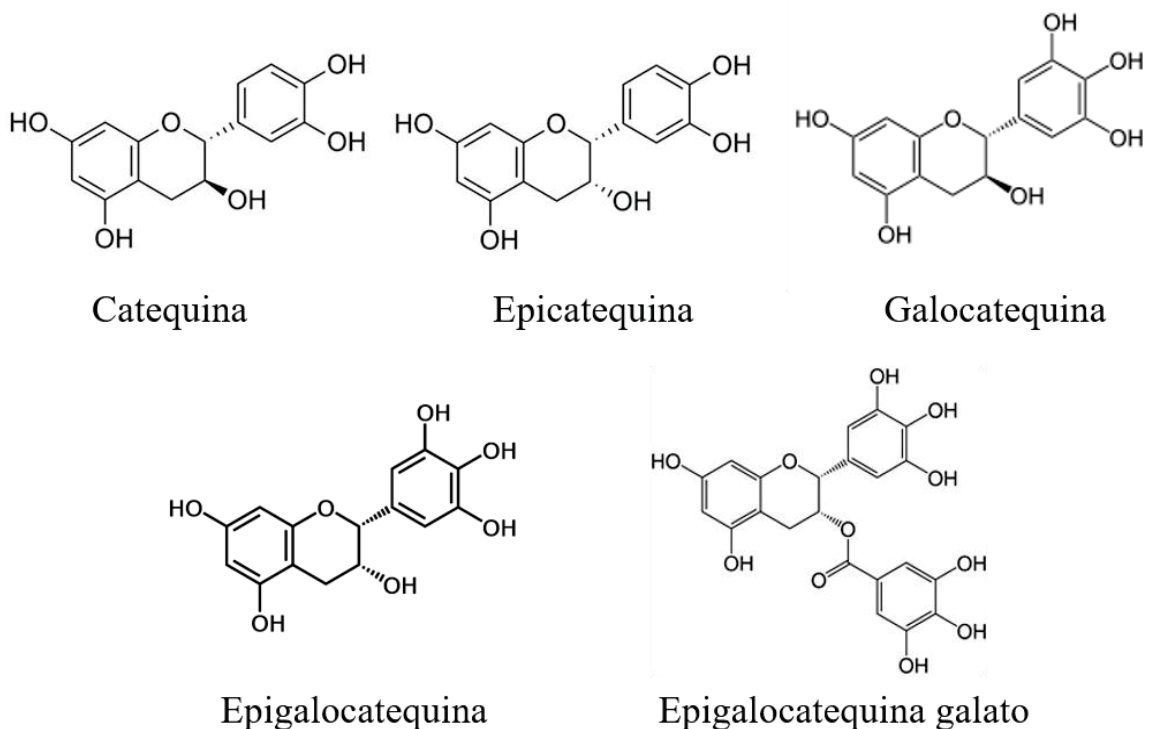


FIGURA 3. TANINOS CONDENSADOS MAIS FREQUENTES NA NATUREZA.

FONTE: Adaptado de MACÁKOVÁ, et al., 2015

TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS CONDENSADOS DE ACORDO COM O PADRÃO DE HIDROXILAÇÃO DA MOLÉCULA.

Nome	Posição das hidroxilas
Procianidinas	3,5,7,3',4'
Prodelfinidinas	3,5,7,3',4',5'
Propelargonidinas	3,5,7,4'
Profisetinidinas	3,7,3',4'
Prorobinetinidinas	3,5,7,4'
Proguibourtinidinas	3,7,4'
Proteracacinidinas	3,7,8,4'
Promelacacinidinas	3,7,8,3',4'

FONTE: Adaptado de MACÁKOVÁ, et al., 2015

TC são amplamente utilizados nas dietas de ruminantes devido à sua capacidade de complexar com proteínas, protegendo-as da sua degradação pelas bactérias do rúmen e aumentando sua degradação no duodeno, tornando-as disponíveis para absorção pelo animal (ORLANDI, et al., 2015). Isso se deve à característica de estes compostos formarem ligações de hidrogênio com as proteínas, principalmente as ricas em prolina, em pH neutro, tornando-se insolúveis no pH ácido do abomaso. Quando atingem o duodeno do animal, estes complexos proteína-tanino se desfazem por causa do pH alcalino presente, disponibilizando as proteínas para digestão. No entanto, os efeitos biológicos que alguns taninos causam são conflitantes, quando administrados em altas concentrações causam efeito na nutrição animal por inibirem o forrageio e a digestibilidade de vários nutrientes, uma vez que inibem enzimas digestivas, além de interferirem na fermentação ruminal (PILLUZA; SULAS; BULLITTA, 2013; ORLANDI, et al., 2015; GERLACH; PRIES; SÜDEKUM, 2018).

Além da ação na nutrição animal, os TC também agem em doenças estomacais de ruminantes. Devido à ingestão de proteínas solúveis pelo animal durante o seu forrageio, há a formação de espuma estável no rúmen, gerando uma retenção de gases que causam alteração nas taxas de proteólise, formação de biofilme e inchaço dos animais que pastam. Pelo fato de taninos condensados terem uma relação intrínseca com as proteínas, estas condições também são evitadas. Outra vantagem de se utilizar taninos condensados na dieta de ruminante é o fato de que estes compostos apresentam atividade anti-helmíntica, problema discutido nesta tese (PILLUZA; SULAS ; BULLITTA, 2013).

O ácido clorogênico é um éster de ácido hidroxicinâmico com ácido quínico e pertence ao grupo dos compostos fenólicos, possui diversos isômeros, tais como o ácido monocatefolquínico, ácido dicafeiolquínico, ácido feruloilquínico e *p*-cumaroilquínico

(SANTOS; WEBER, 2018). Este composto promove descolorações indesejadas nos frutos, interferindo na estabilidade da cor que pode ser afetada por reações não enzimáticas como oxidações e interações com íons metálicos (SANTOS; WEBER, 2018). A respeito da sua atividade biológica, foi comprovada a ação anti-helmíntica na inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* (DÍAZ, et al., 2017).

2.3.2. *Persea americana* MILL.

Uma das plantas estudadas neste trabalho é a *Persea americana* Mill., pertencente a família Lauraceae. Trata-se de uma planta frutífera, no Brasil é conhecida como abacateiro. Esta planta é caracterizada por suas árvores grandes que podem atingir de 9 a 20 metros de altura. Suas folhas chegam a medir 41 cm de comprimento e possui formas variadas (elípticas, ovais e lanceoladas). Quando jovens, podem ser pubescentes e avermelhadas e conforme amadurecem, tornam-se suaves, coriáceas e verde escuras. As flores são amarelas e os frutos são do tipo baga constituídas de apenas uma semente grande que ocupa até 16% do peso total do fruto (YASIR; DAS; KHARYA, 2010; DABAS, et al., 2013).

A semente do abacate possui um perfil fitoquímico rico (proteínas, açúcares, ácidos graxos fitoesteróis, triterpenos, ácido furanóico, ácido abscísico, proantocianidinas e outros polifenóis) e um longo histórico no seu uso etnobotânico (PAHUA-RAMOS, et al., 2012). Segundo Pahua-Ramos, as sementes possuem 64 % de compostos fenólicos em sua composição, entre eles foram identificados os ácidos procatequínico, clorogênico, siringico, vanílico, além de rutina, kaempferol e kaempferideo. Estudos etnofarmacológicos sobre os Astecas e Maias mostraram que o decocto da semente de abacate vinha sendo utilizado no tratamento de micoses e infecções parasitárias. Além disso, o uso desta semente mostrou resultado significativo contra o diabetes e irregularidades intestinais. Já foram identificados efeitos: anticancerígeno, anti-inflamatório antidiabético, anti-hipertensivo, hipocolesterolêmico, dermatológico (crescimento de queratinócitos), antimicrobiano, inseticida, antiparasitário, antifúngico, antiviral e antioxidante (PAHUA-RAMOS, et al., 2012; YASIR; DAS; KHARYA, 2010; DABAS, et al., 2013; MELGAR, et al., 2018; FLORES-ALVAREZ et al., 2018).

Apesar de estudos etnobotânicos, a atividade antiparasitária em parasitas intestinais de extratos das sementes de abacate vem sendo escassamente explorada na atualidade. Alguns trabalhos investigam esta atividade biológica das sementes, um deles feito por Jiménez-Arellanes e colaboradores (2013) que investigaram a ação de extratos clorofórmico e

etanólico sobre os protozoários *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* e *Giardia lamblia*, verificando que ambos os extratos foram capazes de diminuir a viabilidade de dois, dos três parasitas testados. Outro trabalho mais antigo verificou que a atividade do extrato metanólico teve ação moderada na forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* (ABE, et al., 2005). Em relação a outros parasitas, o extrato etanólico das sementes de *P. americana* apresentou toxicidade em larvas de *Aedes aegypti* com um EC_{50} de 16,48 mg/L (TORRES, et al., 2014).

Outras partes da planta *P. americana* como as folhas também mostram atividades biológicas como atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* (GRANADOS-ECHEGOYEN, et al., 2015), atividade hipotensiva (ADEBOYE, et al., 1999), atividade antiespástica (ODO, 2013), atividade antidiabética (LIMA, et al., 2012) e atividade antitúberculose (WIENTARSIH, et al., 2012). O extrato etanólico da polpa do fruto demonstrou atividade protetora do sistema cardiovascular por reduzir as taxas de colesterol, triglicerídeos, VLDL e LDL, assim como aumentou as taxas de HDL (GOUEGNI & ABUBAKA, 2013).

2.3.3. *Cucurbita maxima* DUCHESNE

A segunda planta estudada nesta tese é a *Cucurbita maxima* Duchesne e pertence à família Cucurbitaceae. É conhecida popularmente como abóbora moranga e é amplamente cultivada em diferentes partes do mundo. De uma maneira geral, a polpa da abóbora é consumida amplamente tanto em doces como em salgados, enquanto que as sementes, apesar de poder ser consumida como aperitivo, ainda são descartadas em abundância (PATEL, 2013). Os frutos possuem boa qualidade pós-colheita, permitindo o armazenamento em condições ambiente durante vários meses (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2007). Esta planta tem como característica seu hábito rasteiro com longos caules. As partes verdes da planta são pilosas, porém não apresentam espinhos, o caule é rígido e angular. Suas folhas são grandes medindo de 28 a 40 cm de comprimento. As flores são pequenas medindo de 5 a 8 cm de comprimento (ROCHELLE, 1974). Os frutos são grandes, globosos e achatados, apresentam lóbulos arredondados e coloração alaranjada. Seu peso é bastante variável de acordo com as condições de cultivo, em média pesam 3 a 5 kg podendo atingir 10 kg. As sementes são abundantes e sempre cobertas de uma película pouco aderente. Elas são marginais, ovais e inchadas e de coloração que varia do branco puro ao marrom acizentado escuro. Seu peso representa cerca de 5% do peso total do fruto e suas medidas são

em média de 1,5 cm de comprimento por 0,9 cm de largura (ROCHELLE, 1976; DUBEY, 2012; PATEL, 2013).

A composição das sementes justifica seu potencial nutracêutico, uma vez que são ricas em proteínas, ferro, zinco, manganês, magnésio, fósforo, cobre, potássio, ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides e tocoferol (PATEL, 2013; ROY; DATTA, 2015). O teor de umidade das sementes é de aproximadamente 56 g / 100 g (56%), as quantidades de proteínas, fibras e cinzas são de 29, 22 e 3 g, respectivamente (NAVES, et al., 2010). Metabólitos secundários como terpenoides foram detectados nas sementes de abóbora (MARIE-MAGDELEINE, et al., 2009). Um terpeno encontrado comumente na família Cucurbitaceae são as cucurbitacinas (ROY; DATTA, 2015). Sua estrutura é formada por um esqueleto em comum (FIGURA 4) que podem ser encontrados livres ou glicosilados e são reconhecidas como os princípios tóxicos das plantas da família Cucurbitaceae. No entanto, também podem ser encontradas em outras famílias como Begoniaceae, Chrysobalanaceae, Cruciferae, Datisceae, Desfontaniaceae, Elaeocarpaceae, Flacourtiaceae, Lauraceae, Liliaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rosaceae¹, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Sterculiaceae e Thymelaeaceae além do fungo venenoso *Hebeloma vinosoplyllum* (VALENTE, 2004).

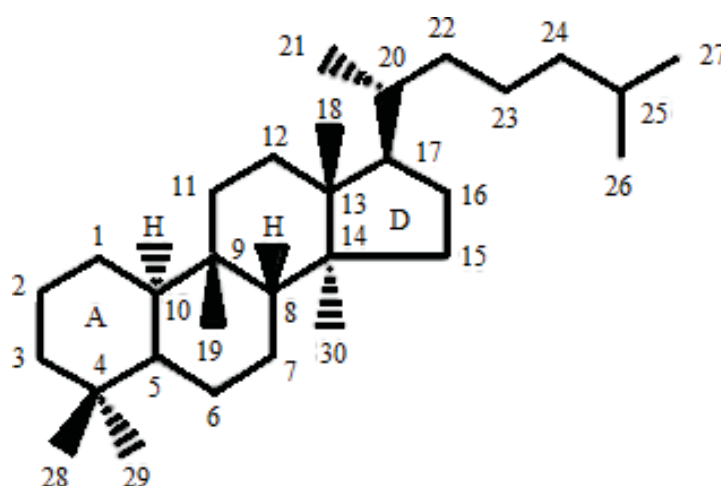


FIGURA 4. ESTRUTURA DO ESQUELETO DAS CUCURBITACINAS.
FONTE: VALENTE, 2004.

Outro composto encontrado em sementes de abóbora são os cucurbitosídeos, um composto fenólico glicosídico e acilado (KOIKE, et al., 2005). Foram identificados pela

primeira vez em *C. moschata* em 2005 por Koike e colaboradores. Sua estrutura é formada por β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosose como uma cadeia de açúcar, e uma ligação éster da porção benzoíla ou 4-hidroxibenzoíla em C-5 da apiofuranose, como mostra a FIGURA 5 (KOIKE, et al., 2005). Seus efeitos biológicos terapêuticos ainda não foram determinados, no entanto moléculas com estruturas semelhantes, glicosídeos contendo apiofuranoses como as saponinas, flavonoides e glicosídeos fenólicos apresentam importantes atividades biológicas nas plantas (KOJIMA, et al., 2009).

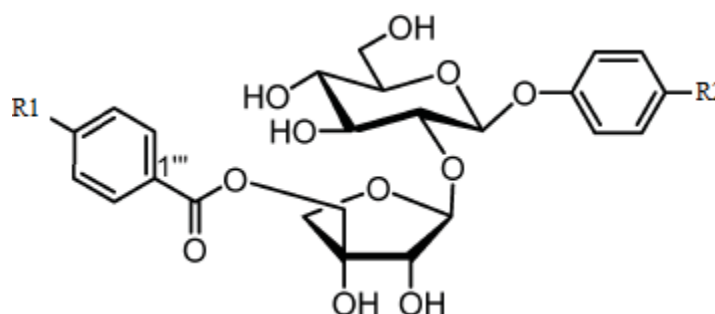


FIGURA 5. FÓRMULA GERAL DO CUCURBITOSÍDEO

FONTE: KOIKE, et al., 2005

Sobre a atividade antiparasitária das sementes de abóbora, foi detectada, como por exemplo efeitos anti-helmínticos comprovados em humanos (PATEL, 2013). Estudos mostraram o efeito curativo de extratos de sementes de abóbora no combate a teníases em humanos, nos quais os vermes foram eliminados após 2 h da ingestão (LI, et al., 2012). Além disso, extratos de sementes de *Cucurbita moscata* (abóbora cheirosa) também demonstraram eficácia no tratamento da esquistossomose aguda em humanos (PATEL, 2013). Atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *C. maxima* contra o parasita de aves *Ascaridia galli* foi detectada por Aziz e colaboradores (2018). O extrato foi capaz de provocar a morte de 66 % das larvas após 36 h de incubação. Devido a estas atividades marcantes, a semente de abóbora foi adicionada na farmacopéia americana como um medicamento oficial para o tratamento de parasitoses. Tal atividade pode ser devida à presença de compostos biológicos, tais como as cucurbitacinas, e taninos, uma vez que uma cucurbitacina E extraída de sementes de abóbora exibiu atividades anticancerígenas e anti-inflamatórias (ROY & DATTA, 2015). Além destas atividades das cucurbitacinas foram reportadas outras atividades como, anti-reprodução, fago-repelente, hepato protetora e antimicrobiana (VALENTE, 2004)

As sementes possuem atividade antioxidante devido à presença de metabólitos secundários como os terpenos em sua composição (DUBEY, 2012). Entre as suas ações medicinais estão o seu efeito hipolipidêmico, anti-hipertensivo, cardioprotetor, hipoglicêmico, diurético, antiprostático e anti-inflamatório na artrite. Além disso, foram comprovados efeitos benéficos contra o câncer de próstata trazendo melhorias nos sintomas dos pacientes e aumento na qualidade de vida. Outro efeito benéfico encontrado é a melhora nos sintomas dos efeitos colaterais de mulheres em menopausa (PATEL, 2013; ROY & DATTA, 2015).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando a importância econômica da criação de ovelhas, bem como as dificuldades de se manter um rebanho livre de parasitoses e tendo em vista que o uso de plantas medicinais para o tratamento destes parasitas é um ponto a ser explorado, torna-se relevante a pesquisa de componentes naturais para o combate dessas doenças.

Assim, a presente tese teve como objetivo central, a obtenção e caracterização fitoquímica de metabólitos secundários de sementes de *C. maxima* e *P. americana* e as respectivas atividades antiparasitárias *in vitro* sobre o parasita *H. contortus*, contribuindo com o conhecimento científico sobre as propriedades biológicas de espécies medicinais e de seus componentes.

Os objetivos específicos foram:

- Obter extrato de metabólitos secundários através de extrações em diferentes condições de processamento das sementes de *C. maxima* e *P. americana*;
- Investigar a atividade antiparasitária *in vitro* dos extratos obtidos de ambas as espécies vegetais, pelos testes de eclodibilidade de ovos e de migração de larvas;
- Utilizar a estratégia do estudo bioguiado através de testes antiparasitários específicos (teste de migração de larvas) *in vitro* para seleção dos extratos para caracterização química;
- Identificar os metabólitos secundários por testes fitoquímicos qualitativos;
- Caracterizar extratos selecionados pelo estudo bioguiado em relação à composição dos metabólitos secundários através de análises cromatográficas e espectrofotométricas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Frutos maduros de *C. maxima* Mill. (n = 4) e *P. americana* Dusch. (n = 12) foram adquiridos comercialmente no Mercado Municipal de Curitiba em março de 2015. As sementes das plantas foram separadas manualmente, cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm x 2 cm e destinadas aos diferentes tipos de processamento: ausência de secagem (semente fresca) e secagem a 40 °C em estufa com termostato controlável. As sementes foram pesadas diariamente até se obter peso constante.

Após os processamentos descritos, os materiais frescos e secos passaram por três extrações isoladas: extração aquosa a 70 °C por 1 h, extração etanólica a 4 °C (etanol 70 %, v/v, 10 dias, com agitação diária) e extração metanólica a 4 °C (metanol 70 %, v/v, 10 dias, com agitação diária), sendo que a última sofreu fracionamento com solventes de polaridades crescentes (*n* – hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n* – butanol) todos na proporção de 1:1, v/v (BOVO, 2013). Depois de extraídas, os extratos e frações foram rotaevaporados (40 °C), liofilizados e armazenados em tubos Falcon embrulhados com papel alumínio para evitar a degradação pela luz e mantidos em freezer a -20 °C. A FIGURA 6 demonstra a sequência e a maneira como os extratos foram adquiridos (A) e o esquema de nomeação das frações (B).

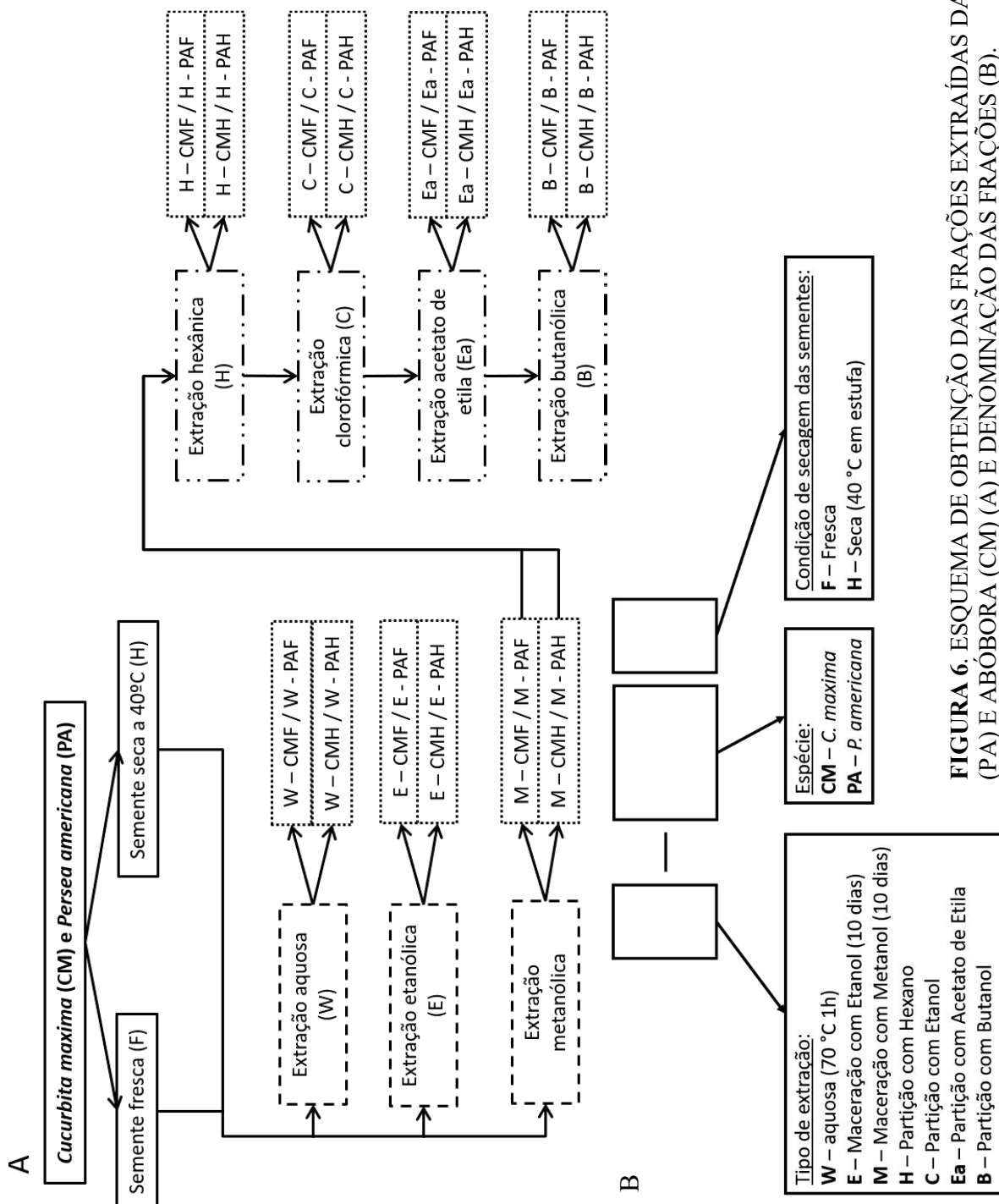


FIGURA 6. ESQUEMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DAS SEMENTES DE ABACATE (PA) E ABÓBORA (CM) (A) E DENOMINAÇÃO DAS FRAÇÕES (B).

4.2. ENSAIO BIOGUIADO

Os extratos obtidos com água, etanol e metanol, assim como as frações obtidas pelas partições com clorofórmio, *n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol passaram por seleções sucessivas em um ensaio bioguiado, visando a seleção de um extrato ou fração com o melhor potencial anti-helmíntico. Os critérios de seleção foram: rendimento acima de 0,14% para amostras de abacate e 0,1% para abóbora, solubilidade em água e teste preliminar de migração de larvas. Extratos ou frações que apresentaram as características adequadas foram selecionados para a obtenção das concentrações de extrato que inibiram 50% (EC₅₀) da migração larval. Em seguida, os extratos que apresentaram menores valores de EC₅₀ foram selecionados para a caracterização química. Este tipo de ensaio possibilita a obtenção de extratos e frações com atividades biológicas notáveis quando comparadas com o material de origem (RUFFATO, et al., 2018).

4.3. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E QUÍMICA

As metodologias para a caracterização fitoquímica das amostras da abóbora selecionadas foram realizadas de acordo com MATOS (2009). Foram realizadas análises para averiguar a presença dos seguintes metabólitos secundários: heterosídeos antociânicos ou flavonoides (modificação do pH com mudança de cor), saponinas (formação de espuma permanente com mudança de pH), heterosídeos cianogênicos (com papel picro-sódico), aminogrupos (com ninhidrina), taninos (reação com gelatina, sais de chumbo, vanilina sulfúrica, cloreto férrico e reativo de Staniasny), ácidos fixos (com reativo de Nessler), triterpenos e esteroides (reação de Lieberman-Burchard), alcaloides (reações com reativos gerais de alcaloides), cumarinas (com hidróxido de sódio e UV) e quinonas (reação de Bornträger).

4.3.1. ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Para a quantificação, foram utilizadas dosagens colorimétricas. O ensaio para determinação dos carboidratos totais foi realizado de acordo com o descrito por Pettolino et al. (2012). A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) e a dosagem de fenóis totais de acordo com Singleton & Rossi (1965). A dosagem de TC foi realizada de acordo com Queiroz, Morais e Nascimento (2002). A dosagem de flavonoides foi realizada como descrito por Vennat, et al. (1992).

4.3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os compostos fenólicos presentes na fração E-PAH foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Agilent 1200 (Santa Clara, CA, EUA), equipado com Degasser (G1322A), bomba quaternária (G1311A), compartimento de coluna termostaticado (G1316A) e detector de comprimento de onda variável UV-VIS (G1365D) operando nos comprimentos de onda de 235, 280, 320, 365, 375 e 525 nm. A separação cromatográfica foi feita com o uso da coluna Agilent Eclipse XDB-C-18 (150mm x 4.6mm, partículas com tamanho de 5µm) com injeção única de 20µL. A metodologia utilizada foi adaptada de Jiménez e colaboradores (2017), onde a fase móvel utilizada foi ácido fórmico (1%, v/v) (A) e acetonitrila (B) e o gradiente foi: 0-5 min, 5% de B, 5-10 min, 10 % de B; 10-20 min, 30 % de B, 20-30 min, 50 % de B e 30-35 min, 5% de B com fluxo de 1mL/min a 25 °C. O extrato foi diluído em metanol:água (1:4 v/v) na concentração de 5 mg/mL e filtrado em membrana de 0,22 µm (JetBiofil, Guangzhou, China) antes da injeção. Os padrões utilizados (ácido transcinâmico, ácido clorogênico, epicatequina, quercetina e rutina) foram preparados individualmente em metanol e armazenados como soluções estoque na concentração de 1 mg/mL. No momento do uso foram diluídos em metanol padrão CLAE 10% (água v/v, 100 mg/mL). Os fenólicos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com os padrões. O programa utilizado foi EZChrom Elite para controle do equipamento e análise dos dados.

4.3.3. TESTE DE ESTABILIDADE A LUZ DA FRAÇÃO E-PAH

Este teste foi feito para avaliar a estabilidade da fração E-PAH perante a luminosidade, uma vez que no teste antiparasitário a exposição intensa a luz é de grande importância. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 200 µL da fração em triplicata. A placa foi exposta a luz (150 Watts) e após os tempos de 2, 4,5 e 6 h de incubação, alíquotas do extrato foram analisados em CLAE nas mesmas condições descritas anteriormente. O conteúdo dos compostos fenólicos foi comparado com os obtidos em análise previa da fração E-PAH.

4.4. TESTES ANTIPARASITÁRIOS

4.4.1. COLETA DE FEZES E COPROCULTURA

As fezes foram colhidas diretamente da ampola retal de ovelhas infectadas naturalmente pelo parasita *Haemonchus contortus*. Em seguida, as fezes foram misturadas com vermiculita, umedecidas e incubadas em estufa B.O.D a 27 °C por 10 dias para a eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas até o estágio L3. As larvas foram recuperadas com o auxílio de funil de decantação e posteriormente foram armazenadas em frascos com tampa e mantidas a 4 °C até o momento do uso. Larvas que permaneceram armazenadas por mais de um mês foram descartadas.

4.4.2. TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS – TML

Para verificar o efeito dos extratos em lavas no estágio L3 foi realizado o teste TML de acordo com o descrito por D'Assonville et al (1996) com modificações. Para este ensaio, foram utilizadas larvas L3 frescas e desembainhadas com hipoclorito de sódio 0,3 % (v/v) por 10 min. Após lavagem, as larvas foram quantificadas e adicionadas a placas de 24 poços, cada poço contendo 200 larvas. Em seguida, foram adicionados os extratos em diferentes concentrações (totalizando um volume de 1,0 mL por poço) e as placas foram incubadas durante 6h a 27 °C. Após a primeira incubação, o material foi transferido para um aparato (FIGURA 7) contendo uma malha de nylon de 22 µm de abertura que permaneceu novamente sob incubação a 27 °C e com uma fonte de luz amarela (150 Watts) para estimular a migração larval. Após 18 h, o aparato foi removido e as larvas que migraram para o poço e que não migraram (retidas na malha) foram contadas em microscópio óptico, no aumento de 10 x. A média da quantidade de larvas que migraram, em cada concentração testada, foi transformada em porcentagem de migração de acordo com a fórmula: % Eficiência = $(B - A/B) \times 100$, onde B corresponde ao número de larvas em água destilada e A corresponde a média do número de larvas que migraram após incubação. O controle positivo foi feito com solução de levamisol (40 µg/mL) e ivermectina (100 µg/mL) e para o controle negativo foi utilizado água destilada.



FIGURA 7. APARATO UTILIZADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL

Fonte: a autora

4.4.3. TESTE DE ECLODIBILIDADE DE OVOS – TEO

Este teste tem o objetivo de testar o efeito dos extratos na eclodibilidade de ovos de helmintos. Neste teste foram utilizadas as fezes de animais doadores que apresentaram número de ovos por grama de fezes acima de dois mil. Os ovos obtidos foram quantificados em alíquotas de 20µl de forma que cada poço continha 100 ovos. Após adição dos extratos em diferentes concentrações (1,0 mL) em cada poço, as placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D a 27 °C durante 24h. Após este tempo de incubação, foi adicionada uma gota de lugol para paralisar o processo e facilitar a leitura em microscópio invertido, na própria placa (DEMELER, *et al.*, 2010). A eficácia dos compostos resultou da razão entre ovos intactos e larvas L1 livres. Para cada concentração foram realizadas três repetições. O padrão utilizado como controle positivo foi o levamisol (40 µg/mL por poço) e o controle negativo utilizado foi água destilada. A eclosão foi calculada de acordo com a fórmula *Eclodibilidade (%) = L × 100 / L + O*, onde L e O são o número de larvas e ovos contados após o tempo de incubação respectivamente.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA, ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Os dados obtidos foram analisados por meio de teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$ como nível de significância. As atividades referentes ao bioensaio utilizando animais foram realizadas de acordo com as normas do Comitê de Experimentação e Ética Animal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com aprovação de número 065/2015. As concentrações de extrato que inibiram 50% da migração larval foram expressas como EC_{50} e calculadas usando as equações lineares ($R^2 \geq 0.95$) obtidas pela linearização das curvas de atividade usando programa Microsoft Excel 2016.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS REFERENTES A SEMENTES DE *Persea americana*

Os dados descritos a seguir, com excessão dos resultados referentes ao teste de eclodibilidade de ovos foram publicados na revista *Veterinary Parasitology* em fevereiro de 2018 sob a forma de artigo de pesquisa cujo título é “*Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of Persea americana seed extracts*” (doi .org/10.1016/j.vetpar.2017.12.019).

5.1.1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SELECIONADOS POR ENSAIO BIOGUIADO.

Após os procedimentos de extração, foram obtidos 6 extratos: 2 aquosos, 2 etanólicos e 2 metanólicos, todos obtidos a partir das sementes frescas e secas. O extrato metanólico foi particionado com solventes de diferentes polaridades e obteve-se 8 frações (FIGURA 8). As frações C-PAF e C-PAH foram excluídas, devido ao seu baixo rendimento em relação ao material utilizado na extração (menos de 0,14%). As frações B-PAF, B-PAH, Ea-PAF e Ea-PAH também foram excluídas por não serem solúveis em água (a 25 °C) (FIGURA 9).

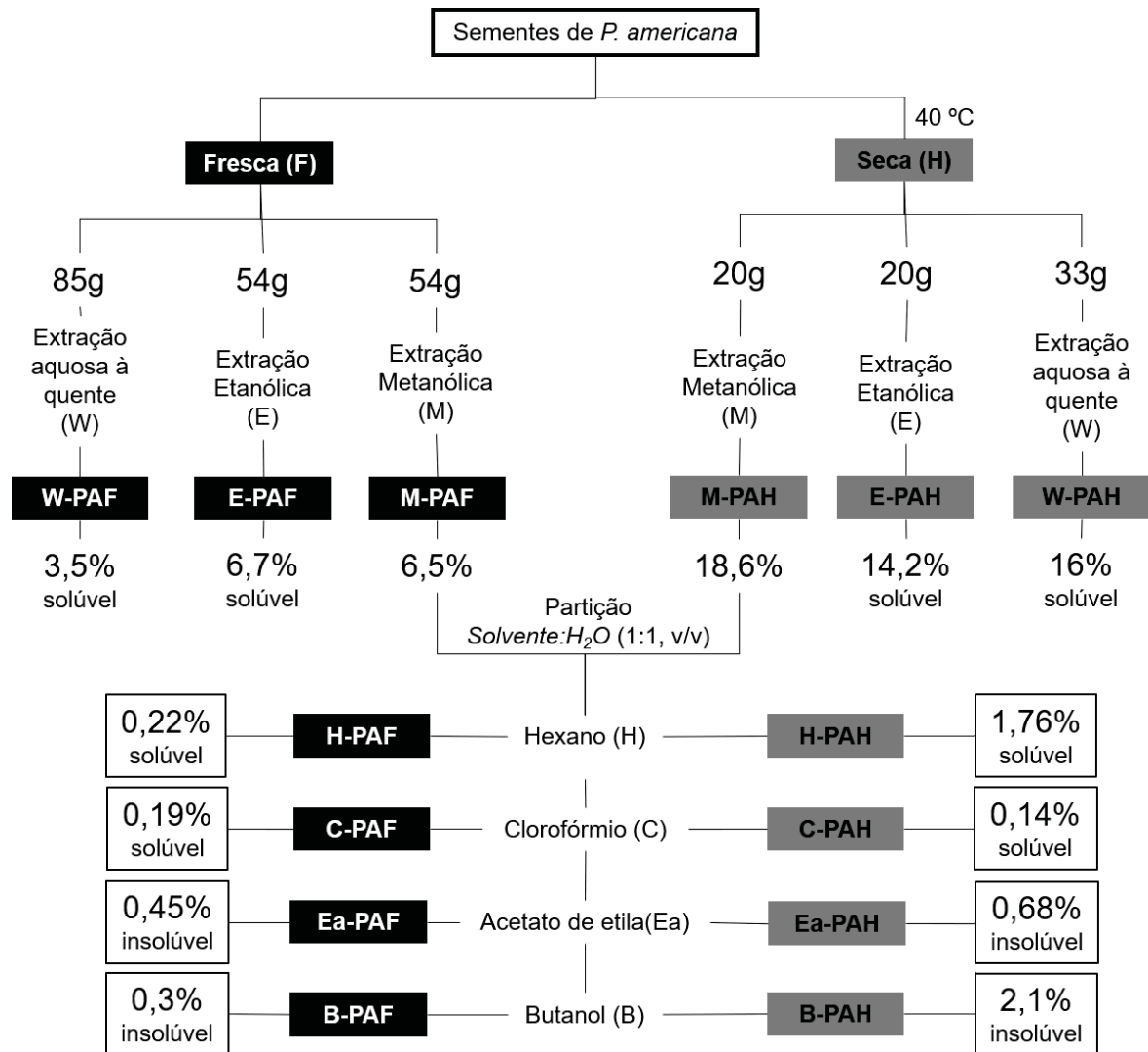


FIGURA 8. FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABACATE (*Persea americana*) E INFORMAÇÕES SOBRE RENDIMENTOS E SOLUBILIDADE.

FONTE: Adaptado de SOLDERA-SILVA, et al., 2018.

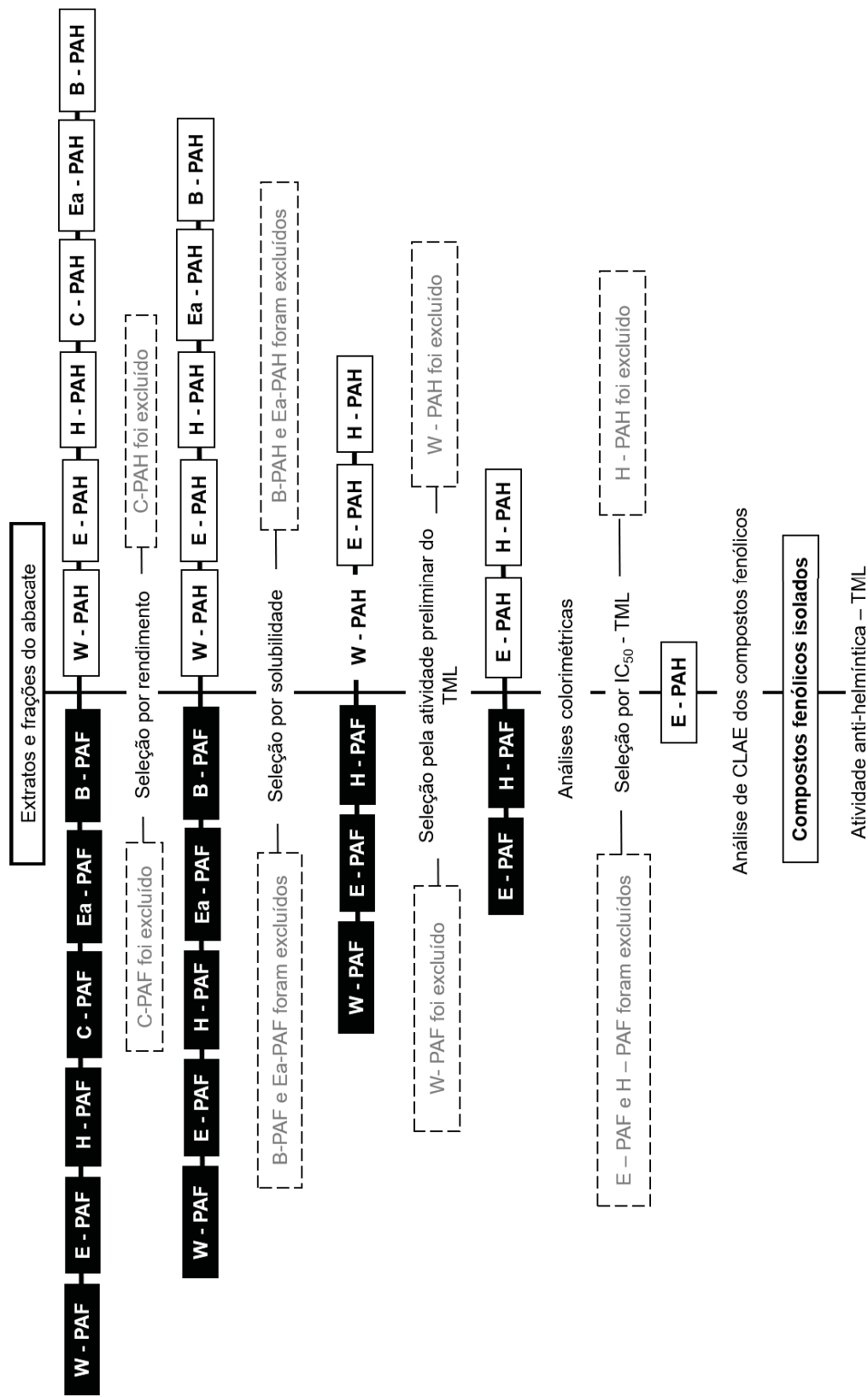


FIGURA 9. PLANO DE SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABACATE (*Persea americana*) UTILIZANDO O ENSAIO BIOGUIADO.
FONTE: Adaptado de SOLDERA-SILVA, et al., 2018.

Os extratos e frações remanescentes (E-PAF, E-PAH, H-PAF e H-PAH) foram submetidos ao TML preliminar nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, a fim de selecionar as frações com melhor atividade larvicida (FIGURA 10). As frações W-PAF e W-PAH apresentaram atividades estatisticamente não diferente do controle negativo (água destilada) e esses extratos foram excluídos. Os extratos/frações E-PAH, E-PAF, H-PAH e H-PAF apresentaram, na concentração de 500 µg/mL, uma % de eficiência estatisticamente diferente ($p = 0,05$) do controle negativo, e foram submetidos à caracterização química preliminar por dosagem colorimétrica de carboidrato e conteúdo de taninos condensados (TC), cujos resultados estão apresentados na TABELA 4. Com exceção do H-PAH, o conteúdo de carboidratos variou de 57 a 30%. O conteúdo de TC foi de 23, 38 e 27 mg EPI/g, respectivamente para E-PAF, E-PAH, H-PAF. TC não foram detectados na fração H-PAH. O maior teor de carboidratos (75,6%), bem como de TC (47,7 mg/g) de sementes frescas de abacate foi descrito por DABAS, et al. (2013). No entanto, os níveis de compostos nas sementes podem variar de acordo com a variedade, condições de crescimento e estágio de maturação (DABAS, et al., 2013). Além disso, os compostos dosados também são influenciados pelo tipo de amostra, pelo método de extração ou pelas técnicas empregadas nos experimentos (DABAS, et al., 2013).

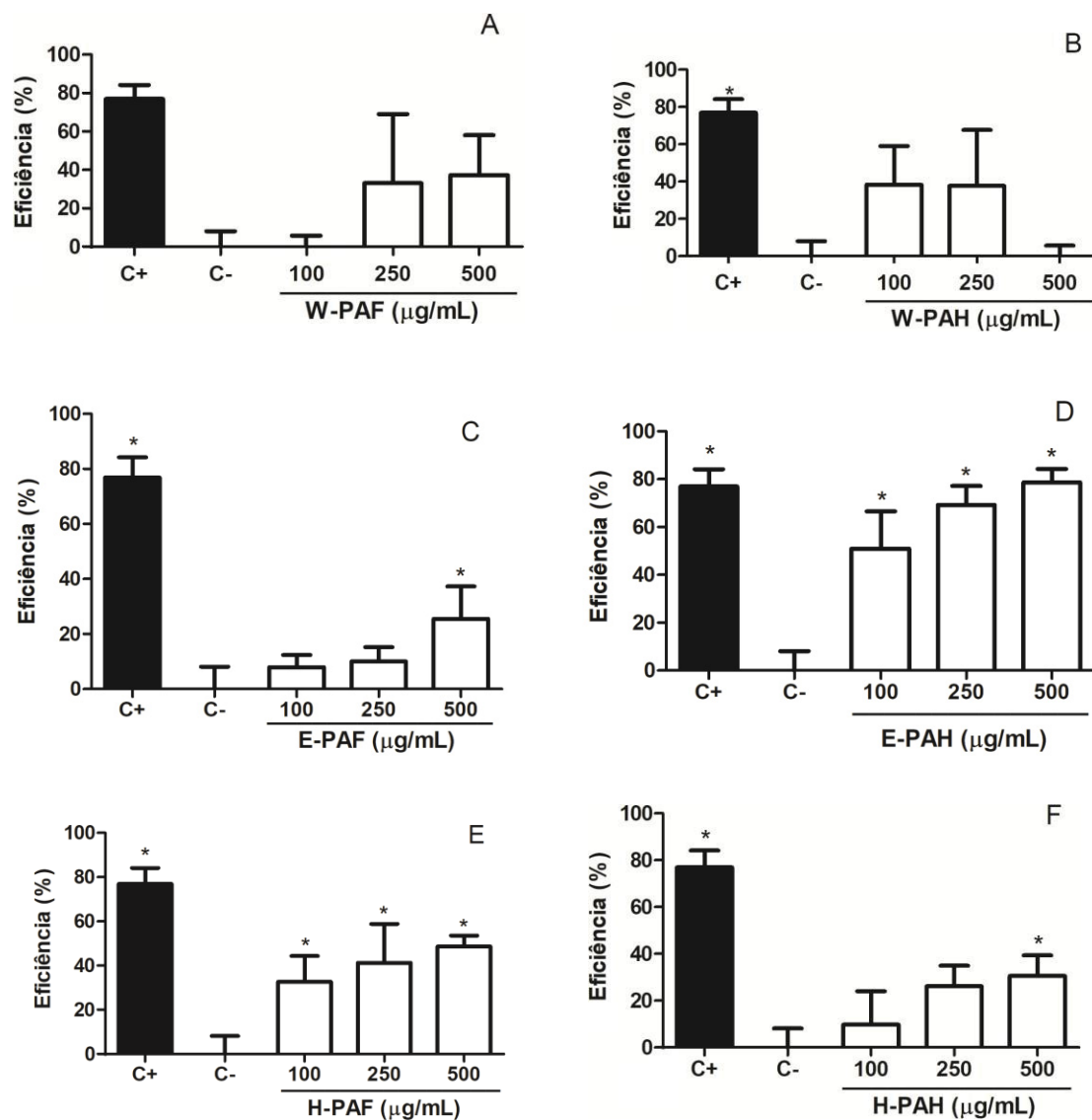


FIGURA 10. EFICIÊNCIA (%) PRELIMINAR DAS FRAÇÕES (A)W-PAF, (B) W-PAH, (C) E-PAF, (D) E-PAH, (E) H-PAF E (F) H-PAH SELECIONADAS PELO ENSAIO BIOGUIADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE *Haemonchus contortus*.

C- (negativo): referente ao grupo larval incubado na presença de água destilada;

C+ (positivo): referente ao grupo larval incubado com 40 µg/mL de levamisol.

* Diferença significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$)

FONTE: Adaptado de SOLDERA-SILVA, et al., 2018.

TABELA 4. DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DOS EXTRATOS (E-PAF, E-PAH) E FRAÇÕES (H-PAF, H-PAH) OBTIDOS DAS SEMENTES DE ABACATE.

	Carboidratos (mg Glc/g) ¹	Taninos condensados (mg EPI/g) ²	Fenólicos (mg GAE/g) ³	Flavonoides (mg RUT/g) ⁴	Proteínas (mg ALB/g) ⁵
E-PAF	57	23	81	ND	30
E-PAH	49	38	48	24	27
H-PAF	30	27	54	ND	31
H-PAH	0	0	30	ND	30

¹ Determinado de acordo com o método fenol sulfúrico (Pettolino, et al., 2012); expresso como equivalentes de Glucose (Glc)

² Determinado de acordo com Queiroz, Morais e Nascimento, 2002; expresso como equivalentes de epicatequina (EPI).

³ Determinado de acordo com Singleton e Rossi, (1965); expresso como equivalentes de ácido gálico (GAE)

⁴ Determinado de acordo com Vennat, et al. (1992); expresso como equivalentes de rutina (RUT)
ND: não dosado

⁵ Determinado de acordo com Bradfrod, et al. (1976); expresso como equivalentes de albumina (ALB)
FONTE: Adaptado de SOLDERA-SILVA, et al., 2018.

5.1.2. TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL E DETERMINAÇÃO DO EC₅₀ DOS EXTRATOS/FRAÇÕES SELECIONADOS

A FIGURA 11 mostra os resultados do TML das extratos/frações E-PAH, E-PAF, H-PAH e H-PAF. Como esperado, a água destilada (controle negativo) não apresentou efeito na migração larval, como observado no controle negativo. Para o controle positivo, a ivermectina apresentou uma eficiência de 50% (desvio padrao ± 2.5).

O extrato E-PAH, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, apresentou eficiência de 76%, atingindo uma eficiência de 86% na maior concentração testada. Para quantificação da atividade larvicida, os valores de EC₅₀ foram calculados e também estão descritos na FIGURA 11. E-PAH apresentou um EC₅₀ de 36 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,001$), como melhor eficiência em comparação com as outras frações testadas (E-PAF = 147 $\mu\text{g/mL}$ $p = 0,001$; H-PAF = 801 $\mu\text{g/mL}$ $p = 0,001$; H-PAH = 77 $\mu\text{g/mL}$ $p = 0,001$). E-PAH, E-PAF, H-PAH e H-PAF apresentaram boa eficiência, quando comparados aos descritos para outros extratos de plantas de outras espécies testadas com TML (HOUNZANGBE-ADOTE, et al., 2005; ALONSO-

DÍAZ, et al., 2011; FERNEX, et al., 2012; ACHARYA; HILDRETH; REESE, 2014; FÉBOLI, et al., 2016). Hounzangbe-Adote, et al. (2005) verificaram que o extrato etanólico das sementes de *Carica papaya* apresentou uma eficiência de 70%, na concentração 600 mg/mL. Informações sobre a composição fitoquímica desta fração foram mencionadas, mas os autores não responsabilizam a atividade apresentada a qualquer um deles.

A atividade anti-helmíntica dos extratos vegetais tem sido geralmente relacionada ao conteúdo de taninos (ALONSO-DÍAZ, et al., 2011; FERNEX, et al., 2012), além disso, a presença de outros compostos nesses extratos, como os ácidos fenólicos, ou flavonóides, também foi demonstrado como agente antiparasitário (BARRAU, et al., 2005; HERNÁNDEZ-VILLEGAS, et al., 2011; KLONGSIRIWET, et al., 2015, FÉBOLI, et al., 2016; DÍAZ, et al., 2017).

No presente estudo, os extratos/frações E-PAF, E-PAH e H-PAF apresentaram TC, com exceção da fração H-PAH, o que pode estar relacionado com a sua atividade larvicida. O teor de TC foi determinado por análise colorimétrica, mas esta técnica não permitiu verificar a natureza bioquímica do perfil polifenólico desses extratos/frações. A análise cromatográfica é uma técnica que permite conhecer esse perfil polifenólico e agregar mais informações sobre qual tipo de compostos fenólicos estão presentes, para especular ainda mais sobre sua relação com a atividade anti-helmíntica.

O extrato E-PAH apresentou a melhor atividade larvicida quando comparado com os demais extratos/frações testado. Por este motivo foi selecionado para caracterização química, considerando seu conteúdo quantitativo fenólico e flavonoide, por técnicas colorimétricas e cromatográficas, com a finalidade de correlacionar à natureza bioquímica dos compostos fenólicos com a atividade verificada para este extrato.

5.1.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE E-PAH

O teor de fenólicos e flavonoides do extrato E-PAH foi de 50 mg GAE/g e 24 mg RUT/g, respectivamente. Os teores fenólicos dos extratos de sementes de abacate descritos na literatura (WANG; BOSTIC; GU, 2010; PAHUA-RAMOS, et al., 2012; RODRIGUES-CARPENA, et al., 2011) foram semelhantes (51 mg GAE/g) ou superiores (292 mg GAE/g, 351 mg GAE/g) ao observado para o E-PAH. A influência do solvente parece ser um fator importante que influencia no conteúdo de fenólicos. Extratos de acetona podem apresentar

maior conteúdo fenólico, do que o descrito para extratos metanólicos ou etanólicos (DABAS, et al., 2013).

A FIGURA 12 mostra o perfil de CLAE dos fenólicos presentes na fração E-PAH. A comparação entre os tempos de retenção dos picos padrão com os tempos de retenção dos picos de E-PAH levou à identificação de ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmico (ácido clorogênico), tipo flavanol (epicatequina) e aglicona (quercetina) e tipos flavonol glicosilados (rutina). A identificação de outros picos não nomeados não foi possível porque seus tempos de retenção não correspondiam a nenhum dos padrões utilizados. A concentração dos compostos fenólicos e flavonoides no E-PAH foi calculada usando a equação obtida a partir das curvas padrão de ácido clorogênico, epicatequina e rutina. Como resultado, o E-PAH apresentou como constituintes fenólicos: epicatequina (4,7 $\mu\text{g/mL}$), rutina (2,8 $\mu\text{g/mL}$) e ácido clorogênico (1,4 $\mu\text{g/mL}$). A quercetina não foi quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, uma vez que o tamanho do pico não permite a dosagem.

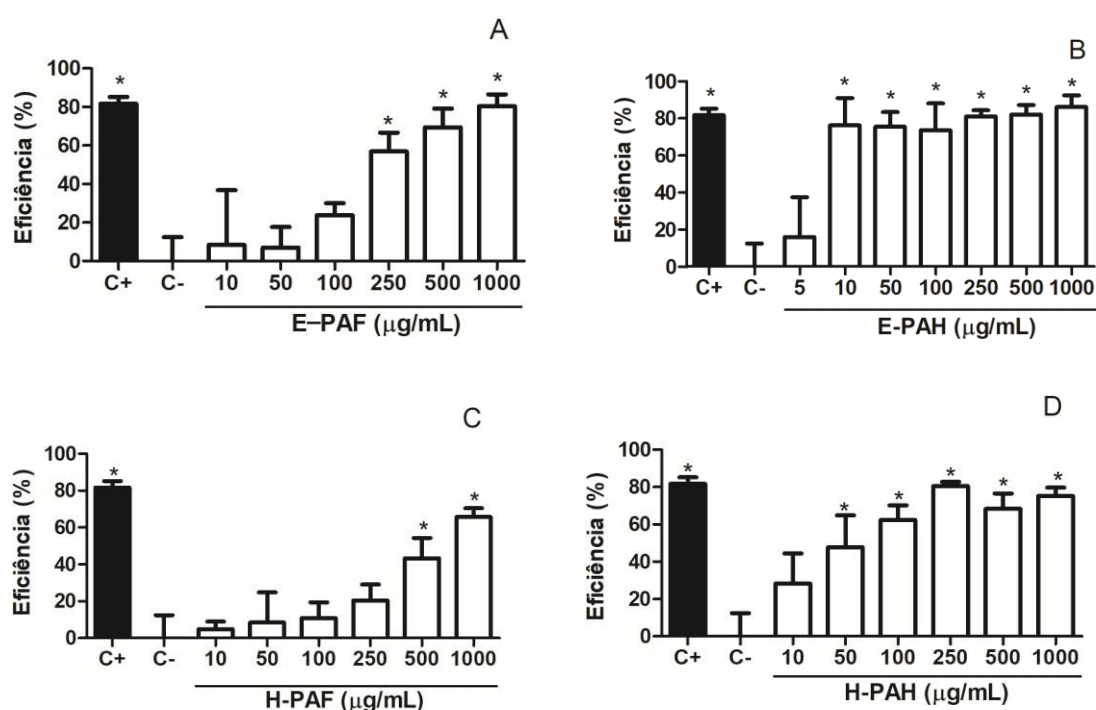


FIGURA 11. EFICIÊNCIA (%) DE E-PAF (A; $EC_{50} = 147 \mu\text{g/mL}$), E-PAH (B; $EC_{50} = 36 \mu\text{g/mL}$), H-PAF (C; $EC_{50} = 801 \mu\text{g/mL}$) E H-PAH (D; $EC_{50} = 77 \mu\text{g/mL}$) DE SEMENTES DE *Persea americana* NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE *Haemochus contortus*.

C- (negativo): se refere ao grupo de larvas incubadas na presença de água destilada

C+ (positivo): se refere ao grupo de larvas incubadas na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ivermectina

* Diferença significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$).

FONTE: Adaptado de SOLDERA-SILVA, et al., 2018.

Alguns estudos descreveram as análises por CLAE da composição fenólica de extratos de sementes de abacate e mostraram que essas sementes eram ricas em catequinas, procianidinas e ácidos fenólicos (WANG; BOSTIC; GU, 2010; RODRIGUES-CARPENA, et al., 2011; PAHUA-RAMOS, et al., 2012; KOSINKA, et al., 2012). A presença de catequina e epicatequina (taninos condensados) como constituintes principais das sementes de abacate foi descrita por Rodrigues-Carpena, et al. (2011). Diferentemente, outro estudo mostrou que o ácido protocatecuico (ácido fenólico do tipo ácido hidroxibenzoico) foi o principal composto fenólico encontrado em sementes de abacate, seguido de kaempferol (flavonoide), ácido vanílico (ácido fenólico simples) e rutina (flavonoide) (PAHUA-RAMOS, et al., 2012). Kosinka, et al. (2012) descreveram ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmico (ácidos clorogênico e cumárico) e procianidina, como constituintes principais de sementes de abacate. Como mencionado anteriormente, os níveis de compostos nas sementes podem ser influenciados pela variedade e o método usado para extração ou técnicas empregadas na análise (DABAS, et al., 2013).

O TML é realizado na presença de luz, porque a luz é um estímulo para a migração larval no ambiente, buscando maior chance de contato com o hospedeiro. Assim, considerando que os compostos fenólicos possam ser sensíveis à luz (CAMPOS, et al., 2008), E-PAH foi analisada por HPLC em diferentes momentos (0, 2, 4,5 e 6h) de exposição luminosa. O conteúdo de ácido clorogênico, epicatequina e rutina foram monitorados. Os cromatogramas de CLAE são mostrados na FIGURA 12. Para todos os compostos fenólicos mencionados, o conteúdo não apresentou diferença estatística entre os diferentes tempos de exposição à luz, como mostra a FIGURA 12c.

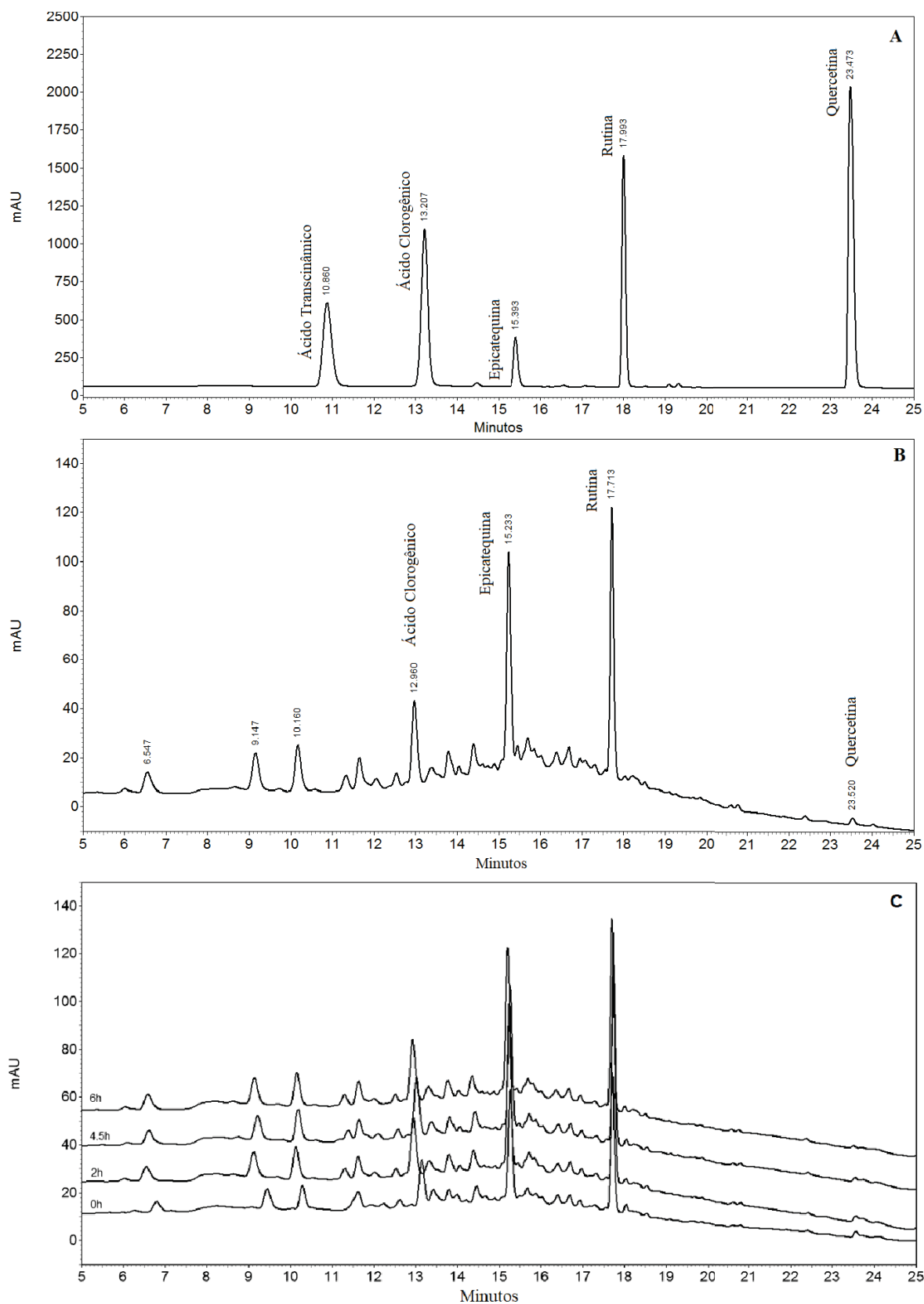


FIGURA 12. PERFIL DE CLAE A 280 nm DOS PADRÕES FENÓLICOS (A), E-PAH (B) E E-PAH SUBMETIDOS ÀS 0, 2h, 4,5h E 6h DE EXPOSIÇÃO À LUZ (C)

NOTA: Os tempos de retenção estão expressos como a média aritmética de três análises (min). Picos sem nome são desconhecidos.

FONTE: Adaptado de SOLDERA-SILVA, et al., 2018.

5.1.5. TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL E DETERMINAÇÃO EC₅₀ DOS PADRÕES

A FIGURA 13 apresenta os resultados obtidos no TML dos compostos fenólicos comerciais (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, EUA), que também foram identificados no E-PAH. Ao comparar a atividade larvicida entre os compostos testados, com exceção do ácido clorogênico, os demais apresentam até 90% de eficiência na concentração de 100 µg/mL. Os valores de EC₅₀ para quercetina, rutina e epicatequina também são apresentados na FIGURA 13. Quercetina (EC₅₀ = 7,8 µg/mL; p = 0,007) e epicatequina (EC₅₀ = 10 µg/mL; p = 0,012) apresentaram atividade e maior eficiência que a rutina (EC₅₀ = 30 µg/mL; p = 0,0079). O ácido clorogênico também foi testado, mas não apresentou eficiência significativa para o TML, nas condições testadas.

Em relação aos dados da literatura sobre extratos vegetais com atividade anti-helmíntica, é observado que os taninos, principalmente os TCs, estão envolvidos direta ou indiretamente na atividade antiparasitária. Os efeitos larvicidas de flavan-3-ols, como a epicatequina, foram descritos em larvas L3 de *Trichostrongylus colubriformis* (MOLAN, et al., 2003). Assim como a inibição da migração de larvas L3 do mesmo parasita incubadas com TC foi mensurada por Molan e colaboradores (2000). Taninos de *Dorycnium pentaphyllum* foram os que apresentaram melhor atividade (63 %). Outras atividades foram testadas como a eclodibilidade de ovos sob a ação de extratos de *Dorycnium rectum* (EC₅₀ = 39 µg/mL) e o desenvolvimento larval (L1) com taninos de *Rumex obtusifolius* (EC₅₀ = 53 µg/mL) (MOLAN, et al., 2002). Além disso, dados da literatura também sugerem que os flavonóis (glicosilados ou aglicona) também podem participar da modulação da bioatividade. A fração acetona de sanfena (*Onobrychis viicifolia*) composta por rutina (quercetina-3-rutinosídeo), nicotiflorina (kaempferol-3-rutinosídeo) e narcissina (isorhametol-3-rutinosídeo) foi capaz de reduzir em 30% a migração de larvas L3 de *H. contortus* (BARRAU, et al., 2005). Taninos extraídos de *Salix caprea*, *Ribes nigrum* e *Ribes rubrum* apresentaram capacidade de inibir o desembainhamento das larvas L3 de *H. contortus* em 90 % (*S. caprea* e *R. nigrum*) e 55 % (*R. rubrum*) após 60 min de incubação (KLONGSIRIWET, et al., 2015). DÍAZ e colaboradores (2017) investigaram a atividade anti-helmíntica através da inibição da eclodibilidade de ovos e mortalidade de larvas L3 de *H. contortus* após incubação com os extratos metanólicos das partes aéreas de *Tagetes filifolia*. Este extrato apresentou para a inibição da eclodibilidade, 27 % na maior concentração testada (20 mg/mL). Sua composição

possui quercetagitrina, ácido meticlorogenato e ácido clorogênico, sendo este último o sugerido pelos autores pela atividade de inibição da eclodibilidade.

Os mecanismos envolvendo compostos polifenólicos na migração larval não são conhecidos (MOLAN, et al., 2000). Sugeriu-se para este modelo TC, por apresentar menor efeito em comparação com os efeitos do teste de eclosão de ovos (MOLAN, et al., 2000). Como o princípio do TML depende de um processo de migração ativa através de malhas, a redução na taxa de migração pode ser devido à mortalidade larval ou a paralisia das larvas.

Resultados descritos por Molan, et al. (2003) sugeriram que os polifenóis (TC e flavan-3-ols) têm efeitos inibitórios na motilidade das larvas, como evidenciada pela sua capacidade de imobilizar as larvas e impedir a sua passagem através da membrana da peneira. Além disso, 90% das larvas aprisionadas, expostas a TC, apesar da baixa mobilidade, apresentaram-se vivas (MOLAN, et al., 2003).

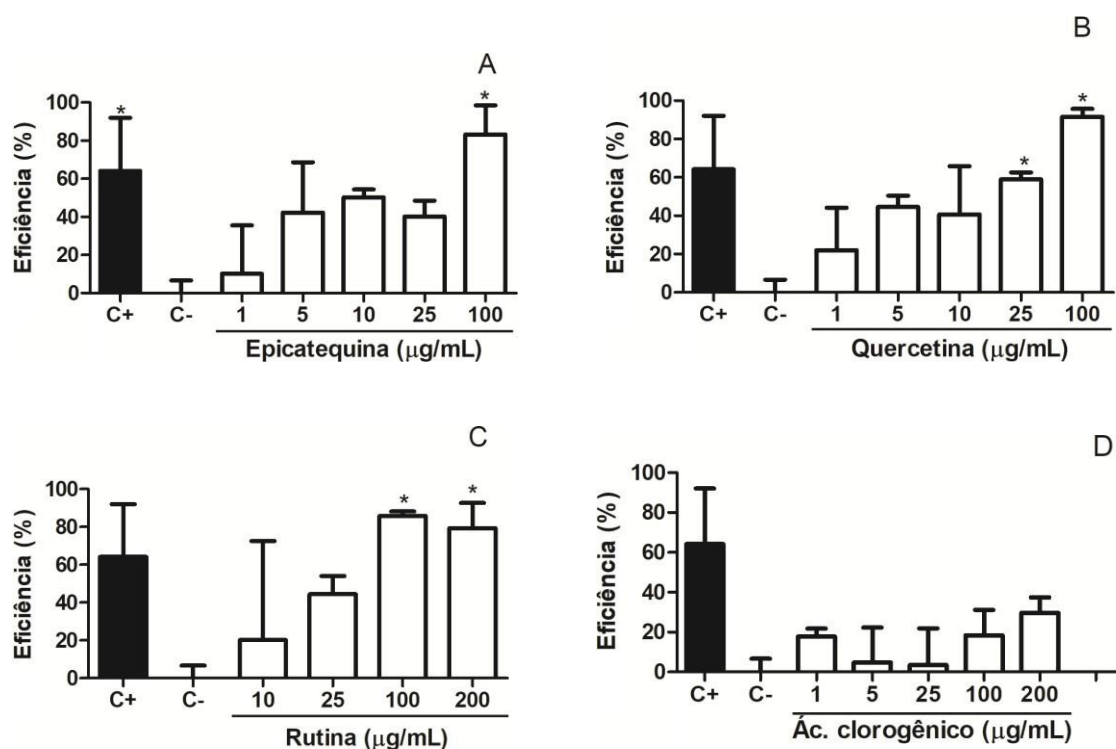


FIGURA 13. EFICIÊNCIA DOS PADRÕES COMERCIAIS (%) DE EPICATEQUINA (A; $EC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$), QUERCETINA (B; $EC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$), RUTINA (C; $EC_{50} = 30 \mu\text{g/mL}$) E ÁCIDO CLOROGÊNICO (D; EC_{50} NÃO CALCULADO) USANDO O TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE *Haemonchus contortus*.

C- (negativo): referente ao grupo larval incubado na presença de água destilada;

C+ (positivo): referente ao grupo larval incubado com $100 \mu\text{g/mL}$ de ivermectina.

* diferença significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$)

FONTE: Adaptado de SOLDERA-SILVA, et al., 2018.

De acordo com os resultados observados em relação à composição fenólica da E-PAH e os valores de EC_{50} obtidos para fenólicos isolados, pode-se sugerir, além do teor de TC, que a presença de epicatequina e rutina contribuiu para a atividade anti-helmíntica encontrada para o E-PAH usando o TML. O efeito anti-helmíntico de extratos com uma mistura de compostos polifenólicos pode ser uma ação global de uma soma das atividades de seus constituintes que podem apresentar ações sinérgicas (KLONGSIRIWET, et al., 2015).

5.1.6. INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) DAS FRAÇÕES ETANÓLICAS DE *Persea americana*

Para investigar se o extrato E-PAH possui também ação sobre os ovos de *H. contortus*, foi realizado o ensaio de eclodibilidade de ovos (TEO) (FIGURA 14). O extrato E-PAF também foi testado para comparação e investigação de possível ação biológica.

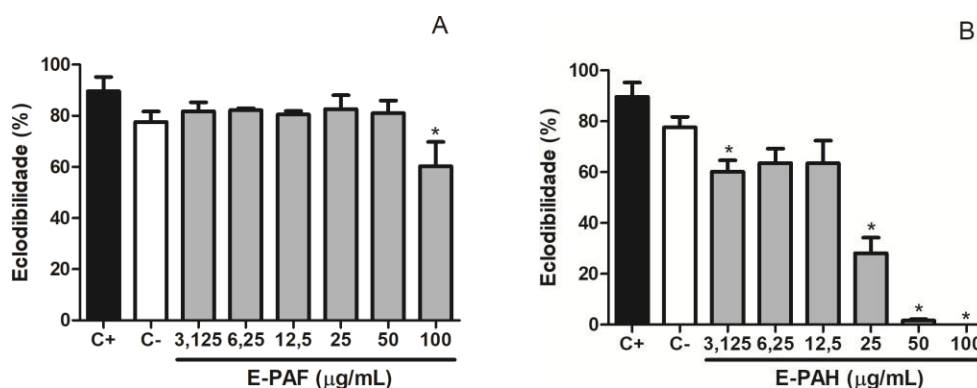


FIGURA 14. ECLODIBILIDADE DE OVOS (%) DOS EXTRATOS E-PAF (A) E E-PAH (B)
 C- (negativo): se refere ao grupo de ovos incubados na presença de água destilada
 C+ (positivo): se refere ao grupo de ovos incubados na presença de 40 µg/mL de levamisol
 * Diferença significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$).

Ao comparar as atividades de ambos os extratos testados, é possível observar que o extrato E-PAF apresenta, em sua maior concentração testada (100 µg/mL), atividade significativamente menor (60 % $p = 0,0002$) do que o controle negativo (água destilada). Enquanto que o extrato E-PAH na concentração mais baixa (3,125 µg/mL) demonstrou atividade significativamente menor (61 % $p = 0,0001$) que o controle negativo atingindo uma atividade de 100 % na maior concentração (100 µg/mL). O controle positivo utilizado nestes

ensaios (levamisol - 40 µg/mL) não foi eficaz na inibição da eclodibilidade, demonstrando que os ovos testados apresentam resistência a ele.

Nenhum trabalho com o objetivo de analisar extratos das sementes de *P. americana* contra ovos de *H. contortus* foi encontrado. No entanto o extrato etanólico das partes aéreas de *Tagetes filifolia* no qual um dos compostos fenólicos encontrados no extrato é o ácido clorogênico, apresentou uma inibição de eclosão de 100% (0% eclosão) na concentração de 2 mg/mL contra ovos de *H. contortus* após 48h de incubação. A atividade do extrato etanólico foi atribuída à presença deste composto no extrato (DÍAZ, et al, 2017), assim, é possível sugerir que a atividade de E-PAH contra ovos é devido a presença de ácido clorogênico em sua constituição.

5.2. RESULTADOS REFERENTES AS SEMENTES DE *Cucurbita maxima*

5.2.1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SELECIONADOS POR ENSAIO BIOGUIADO.

Após os procedimentos de extração, foram obtidos 6 extratos: 2 aquosos, 2 etanólicos e 2 metanólicos, todos obtidos a partir das sementes frescas e secas. O extrato metanólico foi particionado com solventes de diferentes polaridades e obteve-se 8 frações (FIGURA 15). As frações C-CMF e C-CMH foram excluídas devido ao seu baixo rendimento em relação ao material utilizado na extração (menos de 0,1 %) (FIGURA 16). As frações B-CMF, Ea-CMF, B-CMH e Ea-CMH também foram excluídas por não apresentarem solubilidade em água a 25 °C (Fig 17).

Os extratos e frações restantes (W- CMF, W-CMH, E-CMF, E-CMH, H-CMF e H-CH) foram submetidos a um TML preliminar nas concentrações 100, 250 e 500 µg/mL, com o intuito de selecionar as frações com melhor atividade larvicida (FIGURA 17). Os extratos W-CMF, W-CMH, E-CMF e E-CMH apresentaram atividades semelhantes ao controle negativo (água destilada) e por isto foram excluídos. As frações H-CMF ($p = 0,0009$) e H-CMH ($p = 0,0001$) apresentaram, na concentração de 500 µg/mL, uma eficiência estatisticamente diferente do controle negativo, e foram submetidas à caracterização química preliminar por dosagem colorimétrica de carboidrato e conteúdo de TC, cujos resultados estão representados na TABELA 5. O conteúdo de carboidratos variou de 16% entre as duas amostras, o que demonstra que a forma de processamento influencia na extração destes compostos, da mesma

maneira que influenciou nas extrações com sementes de abacate. O conteúdo da TC foi de 2 e 5 mg EPI/g, respectivamente para E-CMF, E-CMH.

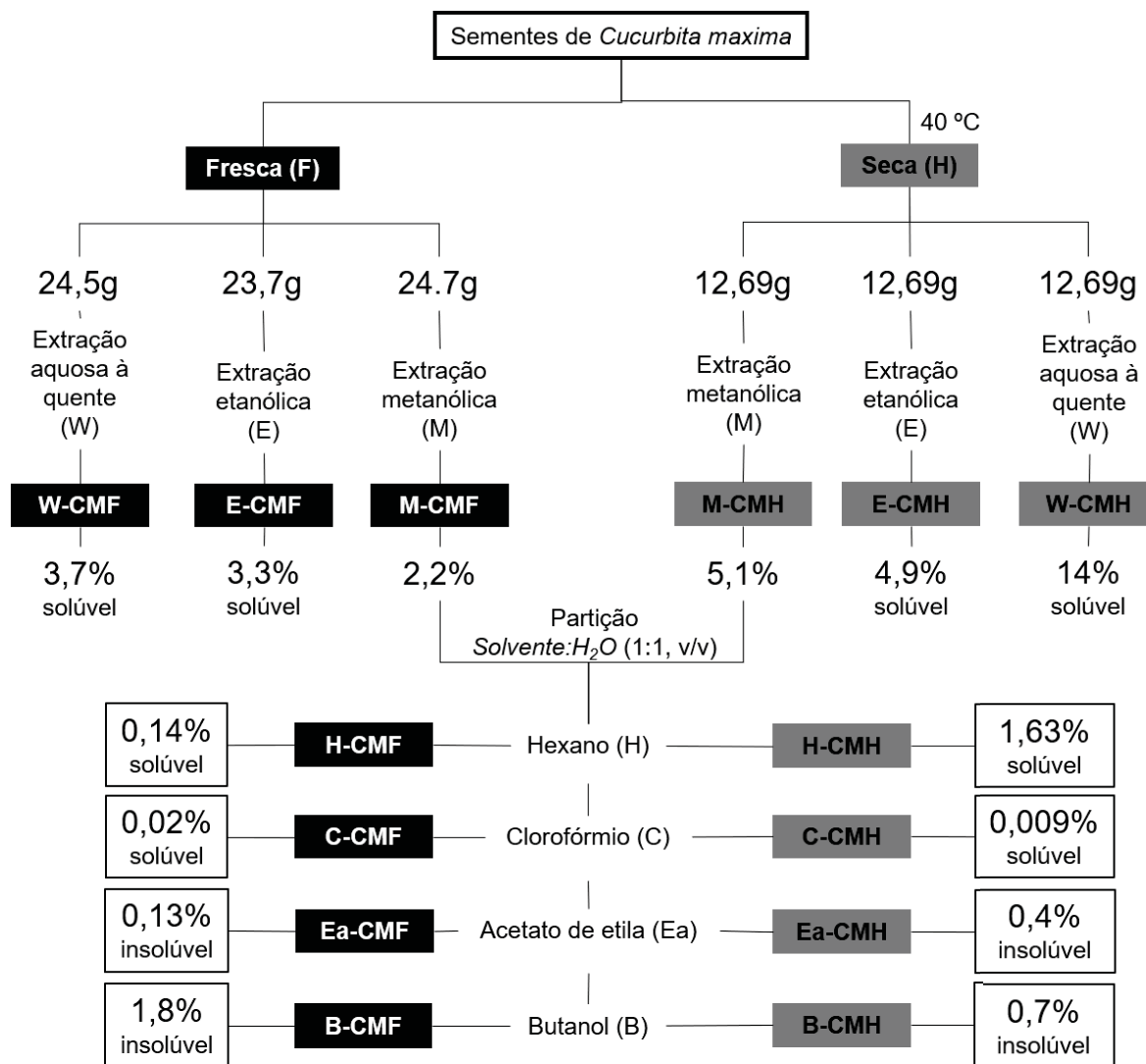


FIGURA 15. ESQUEMA DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima*) E INFORMAÇÕES SOBRE RENDIMENTOS E SOLUBILIDADE.

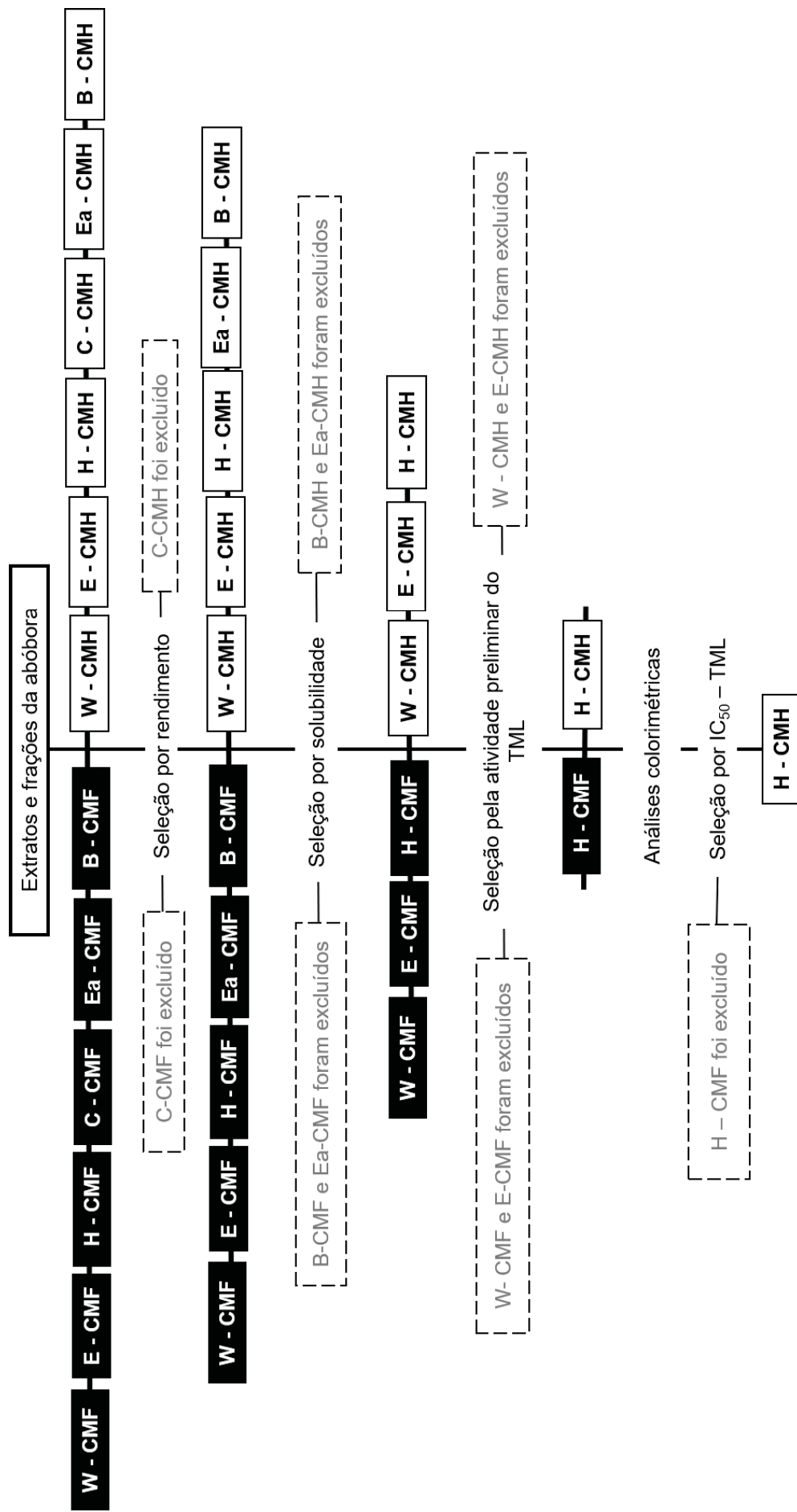


FIGURA 16. PLANO DE SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS SEMENTES DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima*) UTILIZANDO O ENSAIO BIOGUIADO.

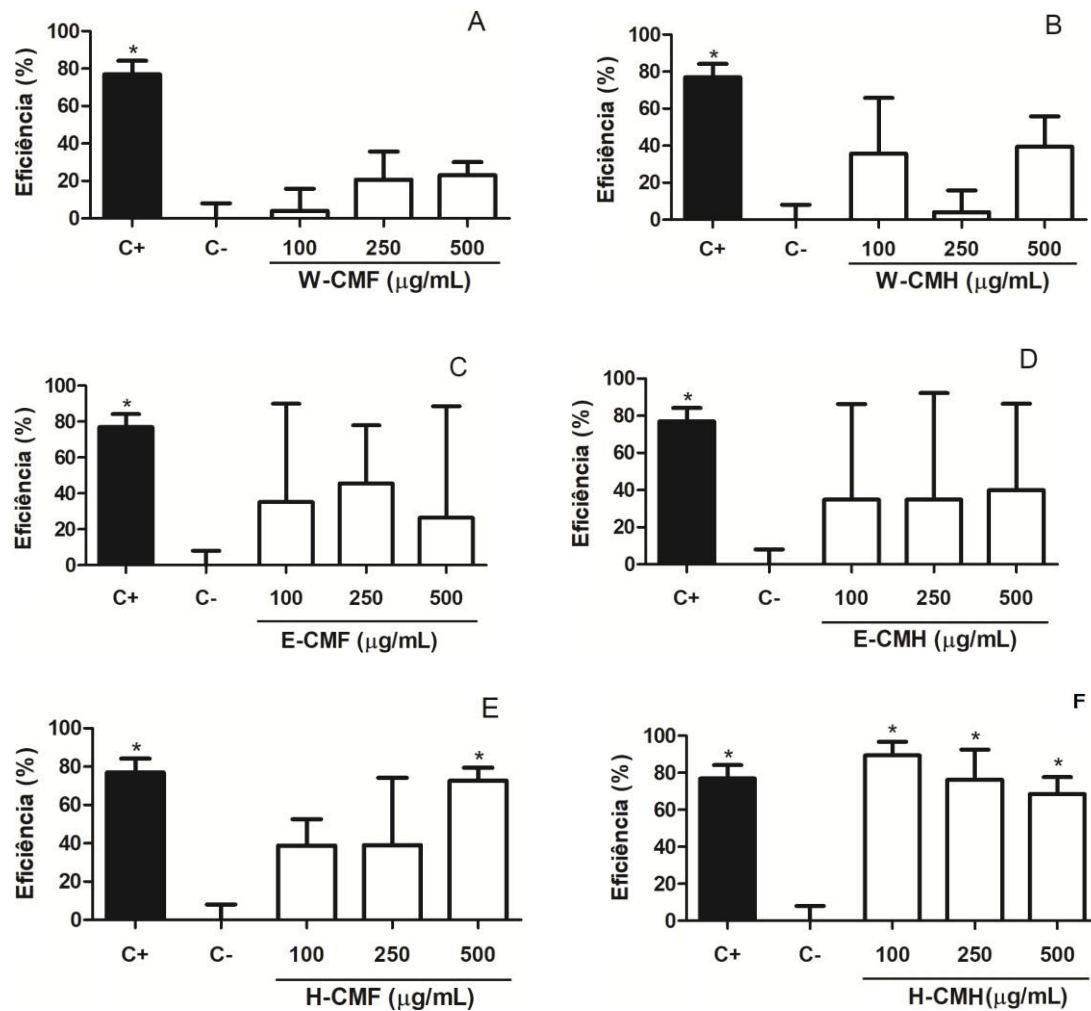


FIGURA 17. EFICIÊNCIA (%) PRELIMINAR DAS FRAÇÕES (A)W-CMF, (B) W-CMH. (C) E-CMF, (D) E-CMH, (E) H-CMF E (F) H-CMH SELECIONADAS PELO ENSAIO BIOGUIADO NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE *Haemonchus contortus*.

C- (negativo): referente ao grupo larval incubado na presença de água destilada;

C + (positivo): referente ao grupo larval incubado com 40 µg/mL de levamisol.

* Diferença significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$)

TABELA 5. DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DAS FRAÇÕES H-CMF E H-CMH OBTIDAS DAS SEMENTES DE ABÓBORA.

	Carboidratos (mg Glc/g) ¹	Taninos condensados (mg EPI/g) ²	Fenólicos (mg GAE/g) ³	Flavonoides (mg RUT/g) ⁴	Proteínas (mg ALB/g) ⁵
H-CMF	16	2	10	ND	26
H-CMH	64	5	17	4	20

¹ Determinado de acordo com o método fenol sulfúrico (Pettolino *et al.*, 2012); expresso como equivalentes de glicose (Glc).

² Determinado de acordo com Queiroz, Morais e Nascimento (2002); expresso como equivalentes de epicatequina (EPI).

³ Determinado de acordo com Singleton e Rossi, (1965); expresso como equivalentes de ácido gálico (GAE)

⁴ Determinado de acordo com Vennat, *et al.* (1992); expresso como equivalentes de rutina (RUT)

⁵ Determinado de acordo com Bradford, *et al.* (1976); expresso como equivalentes de albumina (ALB)
ND: não dosado

5.2.2. TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL E DETERMINAÇÃO DO EC₅₀ DAS FRAÇÕES SELECIONADAS

A FIGURA 18 mostra os resultados do TML e cálculos de EC₅₀ das frações H-CMH e H-CMF. A fração H-CMH, na concentração de 100 µg/mL, apresentou eficiência de 56%, atingindo uma eficiência de 71% na maior concentração testada. Para os valores de EC₅₀ obtidos, H-CMH apresentou melhor resultado (63 µg/mL; p = 0,0018) que H-CMF sendo aproximadamente onze vezes maior (700 µg/mL; p < 0,0001). O mesmo teste foi realizado para outra espécie da mesma família da abóbora testada, extratos etanólicos, aquosos e diclorometanos de sementes de *Cucurbita pepo* obtiveram eficiência de 45, 34 e 18% respectivamente (MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2009). Outros helmintos foram testados contra o extrato etanólico de sementes de *C. pepo*, como o *Ascaridia galli* parasita intestinal de aves. Neste trabalho investigou-se a mortalidade das larvas após incubação com diferentes concentrações do extrato, onde 85% das larvas morreram após incubação de 36 h com a maior concentração testada (75 mg/mL) (AZIZ *et al.*, 2018).

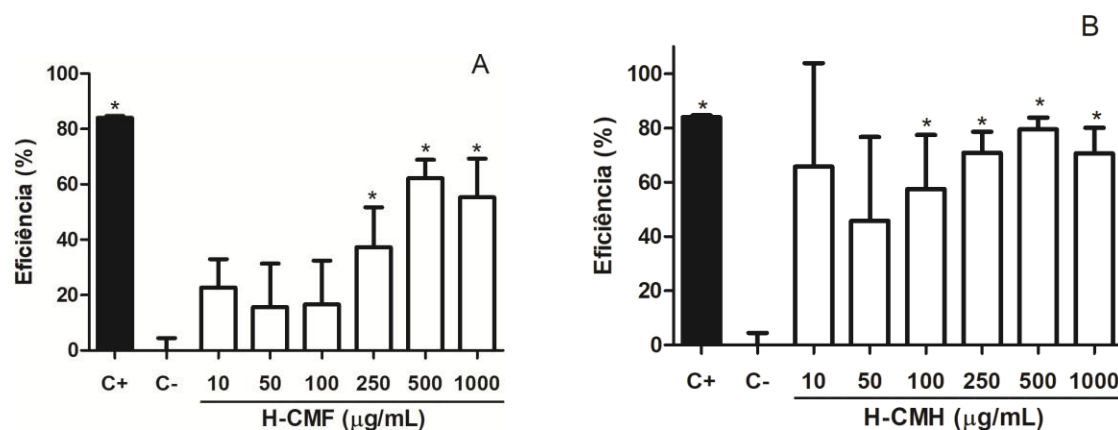


FIGURA 18. EFICIÊNCIA (%) DE H-CMF (A; $EC_{50} = 700 \mu\text{g/mL}$) E H-CMH (B; $EC_{50} = 63 \mu\text{g/mL}$) DE SEMENTES DE *Cucurbita maxima* NO TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAL (TML) CONTRA LARVAS L3 DE *Haemochus contortus*.

C- (negativo): se refere ao grupo de larvas incubadas na presença de água destilada

C+ (positivo): se refere ao grupo de larvas incubadas na presença de $100 \mu\text{g/mL}$ de ivermectina

* Diferença significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$)

5.2.3. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA FRAÇÃO H-CMH

A TABELA 6 mostra os compostos identificados na fração H-CMH por testes fitoquímicos. Foram identificados os seguintes compostos: antocianinas (do tipo flavona, xantona ou flavonóis), esteroides (do tipo terpenoide) e aminogrupos. Esteroides e aminogrupos já foram identificados em outros estudos, com extratos da mesma espécie (KIRANMAYI; RAVISHANKAR; PRIYABANDHAVI, 2012). Esteroides e amino grupos também foram identificados nas sementes de *C. maxima* e demonstraram letalidade em camarões de salmoura (*Artemia franciscana*) crustáceo utilizado como bioindicador de qualidade de água (BISWAS, et al., 2014). Nas sementes de *Cucurbita moschata* também foram identificados terpenoides e taninos (polifenóis) (KADAM; PATIL, 2014).

Um composto presente nestas espécies, as cucurbitacinas, vem sendo apontado com atividade anti-helmíntica, apesar de estar presente em baixas concentrações em sementes. A cucurbitacina, é um triterpeno, altamente insaturado que contém grupamentos acetil, hidroxil e cetona em sua estrutura (STRICKLAND; KREBS; POTTS, 2009; KAUSHIK; AERI; MIR, 2015). Outro composto importante presente nas espécies da família cucurbita é o cucurbitosídeo, uma família de fenil glicosídeos isolados de *C. pepo* (LI, et al., 2005).

TABELA 6. COMPOSTOS FITOQUÍMICOS IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO H-CMH.

Composto*	H-CMH
Flavona, xantonas e flavonóis (antocianinas)	++
Terpenoide (esteroides)	+++
Polifenois	++
Alcaloides	-
Saponinas	-
Quinonas	-
Cumarinas	-
Aminogrupos	+++
Flavonoides	-
Compostos cianogênicos	-

NOTA: * compostos identificados de acordo com metodologia descrita por MATOS, 2009.

De acordo com os dados obtidos pela caracterização fitoquímica, em conjunto com o observado na literatura, pode-se inferir que a atividade biológica apresentada pela fração H-CMH é devida à presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos glicosídicos (cucurbitosídeo). No entanto, para determinar se a atividade anti-helmíntica apresentada pela fração H-CMH da semente de abóbora é proveniente deste composto, são necessários mais estudos utilizando técnicas espectrofotométricas, espectroscópicas e cromatográficas para a determinação da composição química e identificação de compostos isolados. Assim será possível realizar a atividade antiparasitária com estes compostos isolados e será possível comparar o resultado com o da fração H-CMH.

5.2.4. INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) DAS FRAÇÕES ETANÓLICAS DE *Cucurbita maxima*.

Para investigar se as sementes de *C. maxima* possuem ação sobre ovos de *H. contortus*, os extratos etanólicos E-CMH e E-CMF foram testados no ensaio de eclodibilidade de ovos (TEO) (FIGURA 19). Entre os dois extratos testados, E-CMF foi o que demonstrou melhor atividade, pois a partir da concentração de 250 µg/mL houve diferença significativa em relação ao controle negativo (água destilada). A concentração de 1000 µg/mL apresentou melhor atividade, com a eclosão de somente 8% dos ovos. Nenhuma concentração do extrato

E-CMH apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo. Assim como o observado no ensaio realizado com as sementes do abacate, o controle positivo não foi eficaz.

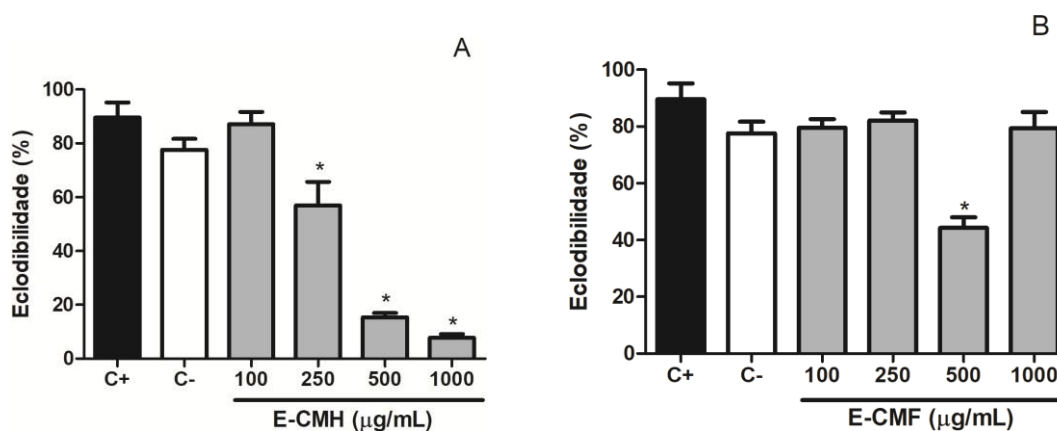


FIGURA 19. ECLODIBILIDADE DE OVOS (%) DOS EXTRATOS E-CMH (A) E E-CMF (B)
 C- (negativo): se refere ao grupo de ovos incubados na presença de água destilada
 C+ (positivo): se refere ao grupo de ovos incubados na presença de 40 µg/mL de levamisol
 * Diferença significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$).

A atividade sobre ovos do extrato E-CMF pode ser comparada à atividade do extrato metanólico de sementes de *C. moschata* que demonstrou inibição da eclodibilidade de maneira dose dependente (MARIE-MAGDELEINE, et al., 2009), atingindo aproximadamente 77 % de eclosão dos ovos na maior concentração testada (1,2 mg/mL), resultado inferior ao encontrado neste trabalho. Foi identificado no extrato de *C. moschata* saponinas e cucurbitacina B, as quais foram indicadas pelos autores como possíveis metabólitos responsáveis pela atividade apresentada. Sementes de outras espécies foram testadas pelo mesmo método contra o mesmo parasita (DELFIN; JUNIOR; PORTUGALIZA, 2017; MONTEIRO, et al., 2011; HOUNZANGBE-ADOTE, et al., 2005). Os extratos etanólico e aquoso de *Moringa oleifera* nas maiores concentrações testadas (15,6 mg/mL) obtiveram uma redução de 96 e 82% de eclosão, respectivamente (DELFIN; JUNIOR; PORTUGALIZA, 2017). Extratos hexânico, etanólico e acetato de etila das sementes de *Jatropha curcas* apresentaram 15,3, 99,8 e 32,2 % de eficácia na inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* na maior concentração testada (50 mg/mL). No extrato etanólico desta espécie foi detectada a presença de catequinas e triterpenoides, os quais os autores indicam como os compostos responsáveis pela atividade apresentada (MONTEIRO, et al., 2011). As sementes de *Carica papaya* também foram testadas em ovos de nematódeos. Hounzangbe-Adote, et al. (2005) verificaram que o extrato alcoólico destas sementes apresentou 60 % de redução da eclosão de larvas de *H. contortus*. Embora sejam plantas diferentes, os resultados aqui corroboram a literatura, no entanto com menor atividade.

6. CONCLUSÕES

O aumento na demanda de produtos de origem ovina, como carne, leite e lã, requer que os produtores mantenham seus rebanhos saudáveis para que sua criação seja melhor aproveitada. Um dos maiores desafios encontrados por esses criadores são as parasitoses que acometem seus animais.

Diante dessa problemática, neste trabalho foram testados extratos e frações obtidos das sementes de abacate e abóbora, os quais apresentaram ação anti-helmíntica promissora.

O extrato etanólico das sementes secas de abacate apresentou atividade larvicida melhor que o padrão utilizado em alguns experimentos, demonstrando sua alta capacidade antiparasitária. A fração hexânica das sementes secas de abóbora, apesar de ter apresentado uma atividade menor, quando comparada com o extrato de abacate, também apresentou boa atividade anti-helmíntica, mostrando a necessidade de elucidar sua composição. Através do ensaio bioguiado, foi possível chegar a um extrato e uma fração com bons rendimentos, solubilidade em água e atividade anti-helmíntica, evitando assim desperdício de recursos e tempo.

Nos ensaios de eclosão de ovos foi possível verificar que E-PAH também apresenta atividade ovicida próspera devido a presença de ácido clorogênico em sua composição. O extrato E-CMF também demonstrou atividade ovicida satisfatória uma vez que sua atividade foi melhor do que a apresentada pelo extrato metanólico de *Cucurbita moschata*, uma abóbora do mesmo gênero.

Levando em consideração esses resultados, as sementes, muitas vezes consideradas como subprodutos e descartadas, pode apresentar uma estratégia sustentável e economicamente viável no combate aos parasitas.

7. REFERÊNCIAS

- ABE, F., NAGAFUJI, S., OKAWA, M., KINJO, J., AKAHANE, H., OGURA, T., MARTINEZ-ALFARO, M. A., REYES-CHILPA, R. Trypanocidal Constituents in Plants. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in the Seeds of *Persea americana*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. Vol. 28, p. 1314 – 1317, 2005.
- ACHARYA, J., HILDRETH, M.B., REESE, R.N. *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. Vol. 201(1), p. 75-81, 2014
- ADEBOYE, J.O.; FAJONYOMI, M.O.; MAKINDE, J.M. TAIWO O.B. A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats. **Fitoterapia**, Vol. 70 (1), p. 15-20, 1999.
- ALBERTS, G. A. A., GRAY, G. D., PIPER, L. R., BARKER, J. S. F., LE JAMBRE, L. F., BARGER, I. A. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. **International Journal for Parasitology**. Vol. 17, No. 7, p. 1355-1363, 1987.
- ALBUQUERQUE, A. C.A., BASSETTO, C. C., ALMEIDA, F. A., AMARANTE, A F. T., Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology**. Vol. 246, p. 112-117, 2017.
- ALONSO-DÍAZ, M. A., TORRES-ACOSTA, J. F. J., SANDOVAL-CASTRO, C. A., HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. Vol. 181(2), p. 360-364, 2011.
- AMARANTE, A. F. T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**. Vol.118, p. 56-62, 2014
- D'ASSONVILLE J. A., JANOVSKY E. & VERSLEY A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Vet. Parasitol.** Vol. 61, p. 73-80, 1996.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Vol. 55, p. 4027-4033, 2018.
- AZIZ, A. R. A., ABOULAILA, M. R., AZIZ, M., OMAR, M. A., SULTAN, K. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of pumpkin seeds and pomegranate. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, 2018, article in press.
- BARRAU, E., FABRE, N., FOURASTE, I., HOSTE, H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, Vol. 131, p. 531–538, 2005.

BISWAS, S., HABIB, A., MANIRUJJAMAN, M., UDDIN, B., KHAN, M. M. H., HASAN, S., UDDIN, M., ISLAM, M., KHATUN, M., ISLAM, M. A., RAHMAN, M. Cytotoxicity and phytochemical studies of pumpkin seed (*Cucurbita maxima* Linn.) extract. **Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research**, Vol. 3 (2), p. 29-36, 2014.

BOVO, F. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e antiasmática de inflorescências de *Musa paradisiaca* L. *in vitro* e *in vivo***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.

BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. Vol. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, M. G. L.; PAUSA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas gerais. In: Seminário sobre a Economia Mineira, XIV., 2010, Minas Gerais. **Anais**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

CALVETE, C., FERRER, L., LACASTA, D., CALAVIA, R., RAMOS, J., RUIZ-DE-ARCAUTE, M., URIARTE, J. Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. **Veterinary Parasitology**. Vol. 203, p. 102–113, 2014.

CAMPOS, S. M., MARTINO, H. S. D., SABARENSE, C. M., PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição**. Vol. 19(4), p. 481-490, 2008.

CAMPOS, K. F. D., MONTEIRO, A. L. G., MOLENTO, M. B., BATISTA, R., NEVES, A. C. C., DEBORTOLI, E. C., TWARDOWSKI, T. S., KORMANN, R. R. Efficacy of different anthelmintics on the control of gastrointestinal parasites of sheep. **Proc. 54th Ann. Meet. Braz. Soc. Animal Sci.**, Vol. 1034, 2017.

CAVALCANTE, A. C. R., VIEIRA, L. S., CHAGAS, A. C. S., MOLENTO, M. B. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos epidemiologia e controle**. Embrapa Informações Tecnológicas: Brasília, 2009.

CHANDY, M. L., SOMAN, C., KUMAR, S. P., KURUP, S., JOSE, R. Understanding molecular mechanisms in multivariant actions of levamisole as an anti-helminthic, anti-inflammatory, antioxidant, anti-neoplastic and immunomodulatory drug. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**. Vol. 28 (4) p. 354-357, 2016.

CRUZ, F. P. **Sistema de produção de ovinos**. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) – UNESP, Botucatu, São Paulo, 2002.

DABAS D; SHEGOG R. M.; ZIEGLER G. R.; LAMBERT J. D. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. **Current Pharmaceutical Design**. Vol. 19, p. 6133-6140, 2013.

DELFIN E. C. JR., H. P. PORTUGALIZA. Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, Vol. 5, p. 30-34, 2017.

DEMELER J.; KÜTTLER U.; EL-ABDELLATI A.; STAFFORD K.; RYDZIK A.; VARADY M.; KENYON F.; COLES G.; HÖGLUND J.; JACKSON F.; VERCRUYSSSE J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, Vol. 174, p. 58-64, 2010.

DÍAZ, G.J., HERNANDEZ, G.T., ZAMILPA, A., PEREZ, C.M.B., BRIBIESCA, E.R., MENDO, O.H., ARROYO, H.S., CORTAZAR, M.G., GIVES, P.M. *In vitro* assessment of *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* and *Tagetes filifolia* against *Haemonchus contortus* nematode eggs and infective (L3) larvae. **Microbial Pathogenesis**, Vol. 109, p. 162-168, 2017.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Vol. 28, n. 3, p. 241- 249, 2007.

DUBEY, S. D. Overview on *Cucurbita maxima*. **International Journal of Phytopharmacy**, Vol. 2, p. 68-71, 2012.

EMBRAPA, Publicação analisa tendência de crescimento dos rebanhos de caprinos e ovinos no país, 2017. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/29364402/publicacao-analisa-tendencia-de-crescimento-dos-rebanhos-de-caprinos-e-ovinos-no-pais>. Acesso em 03/03/2018.

EMERY, D. L., HUNT, P. W., LE JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**, Vol. 46, p. 755-769, 2016.

FÉBOLI, A., LAURENTIZ, A.C., SOARES, S.C., AUGUSTO, J.G., ANJOS, L.A., MAGALHÃES, L.G. Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Vol. 226, p. 65-68, 2016.

FERNEX, E., ALONSO-DÍAZ, M.A., VALLES-DE LA MORA, B., CAPETILLO-LEAL, C.M. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Experimental Parasitology**. Vol. 131(4), p. 413-418, 2012.

FLORES-ALVAREZ, L. J., GUZMÁN-RODRÍGUEZ, J. J., LÓPEZ-GÓMEZ, R., SALGADO-GARCIGLIA, R., OCHOA-ZARZOSAJOEL A., LÓPEZ-MEZA, E. PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. Vol 99, p. 10-18, 2018.

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I. M. O., RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**, Vol. 7, 2006

FURTADO, L. F. V., BELLO, A. C. P. P., RABELO, E. M. L. Benzimidazole resistance in helminths: from problem to diagnosis. **Acta Tropica**. Vol. 162, p. 95-102, 2016.

GAUDIN, E., SIMON, M., QUIJADA, J., SHCELCHER, F., SUTRA, J., LESPINE, A., HOSTE, H. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. **Veterinary Parasitology**. Vol. 227, p. 122-129, 2016.

GERLACH, K., PRIES, M., SÜDEKUM, K-H. Effect of condensed tannin supplementation on in vivo nutrient digestibilities and energy values of concentrates in sheep. **Small Ruminant Research**. Vol. 161, p. 57-62, 2018.

GIRARDI, J. L.; BRAGA, R. M. **Principais doenças e parasitas que ocorrem no rebanho ovino de Roraima**. Embrapa, Roraima, 1997.

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**, Vol. 139, p. 308 – 320, 2006.

GODOY, P., CHE, H., BEECH, R.N., PRICHARD, R.K. Characterization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic lactone anthelmintics. **Molecular & Biochemical Parasitology**. Vol. 204, p. 11-15, 2015.

GOUEGNI, E.F., ABUBAKAR, H. Phytochemical, toxicological, biochemical and haematological studies on avocado (*Persea americana*) in experimental animals. **Nigerian Food Journal**, Vol. 31 (1), p. 64-69, 2013.

GRANADOS-ECHEGOYEN, C., PÉREZ-PACHECO, R., ALONSO-HERNÁNDEZ, N., VÁSQUEZ-LÓPEZ, A., LAGUNEZ-RIVERA, L., ROJAS-OLIVOS, A. Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. Vol.5 (6), P. 463-467, 2015.

HERNÁNDEZ-VILLEGAS, M.M., BORGES-ARGÁEZ, R., RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., TORRES-ACOSTA, J.F.J., MÉNDEZ-GONZÁLEZ, M., CACERES-FARFAN, M. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. Vol. 179(1), p. 100-106, 2011.

HORVAT, A. J. M., PETROVIC', M., BABIC', S., PAVLOVIC', D. M., AS'PERGER, D., PELKO, S., MANCE, A. D., KAS'TELAN-MACAN, M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 31, p. 61-84, 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**, Vol. 180, p. 144 – 154, 2011.

HOUNZANGBE-ADOTE, M.S., PAOLINI, V., FOURASTE, I., MOUTAIROU, K., HOSTE, H. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic

nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**. Vol. 78, p. 155-160, 2005.

JAMWAL, K., BHATTACHARYA, S., PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Vol. 9, p. 26-38, 2017.

JIMÉNEZ-ARELLANES, A., LUNA-HERRERA, J., RUIZ-NICOLÁS, R., CORNEJO-GARRIDO, J., TAPIA, A., YÉPEZ-MULIA, L. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 13, p. 1-5, 2013.

JIMÉNEZ, P., GARCÍA, P., BUSTAMANTE, A., BARRIGA, A., ROBERT, P. Thermal stability of oils added with avocado (*Persea americana* cv. Hass) or olive (*Olea europaea* cv. Arbequina) leaf extracts during the French potatoes frying. **Food Chemistry**. Vol. 221, p. 123–129, 2017.

JUNIOR, V. F. V., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, Vol. 28 (3), p. 519-528, 2005.

KHANBABAEE, K., REE, T. V. Tannins: Classification and Definition. **Natural Products Reports**. Vol. 18, p. 641-649, 2001.

KADAM, P. V., PATIL, M. J. Pharmacognostic study of *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). **Pharmacognosy Journal**. Vol. 5, p. 4-6, 2014.

KAUSHIK, U., AERI, V., MIR, S. R. Cucurbitacins – An insight into medicinal leads from nature. **Pharmacognosy Reviews**. Vol. 9, p. 13-18, 2015.

KEARNEY, P.E., MURRAY, P.J., HOY, J.M., HOHENHAUS, M., KOTZE, A. The ‘Toolbox’ of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What’s in and what’s out. **Veterinary Parasitology**, Vol. 220, p. 93-107, 2016.

KHAN, F.A., SAHOO, A., KARIM, S.A. Moderate and high levels of dietary protein on clinico-biochemical and production responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Small Ruminant Research**. Vol. 150. p. 52-59, 2017.

KIRANMAYI, G. V. N., RAVISHANKAR, K., PRIYABANDHAVI, P. Phytochemical screening and *in vitro* comparative study of anthelmintic activity of *Asparagus racemosus* and *Cucurbita maxima*. **Journal of Pharmacy Research**. Vol. 5 (3), p. 1545-1547, 2012.

KOIKE, K., LI, W., LIU, L., HATA, E., NIKAIDO, T. New Phenolic Glycosides from the Seeds of *Cucurbita moschata*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. Vol. 53 (2) p. 225—228, 2005.

KOJIMA, M., NAKAMURA, Y., NAKAMURA, A., TAKEUCHI, S. Total synthesis of cucurbitoside A using a novel fluororous protecting group, **Tetrahedron Letters**, Vol. 50, p. 939–942, 2009.

KOSIŃSKA, A., KARAMAĆ, M., ESTRELLA, I., HERNÁNDEZ, T., BARTOLOMÉ, B., DYKES, G.A. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Vol. 60, p. 4613-4619, 2012.

KLONGSIRIWET, C., QUIJADA, J., WILLIAMS, A.R., MUELLER-HARVEY, I., WILLIAMSON, E.M., HOSTE, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. Vol. 5, p. 127–134, 2015.

KUMARASINGHA, R., PRESTON, S., YEO, T.-C., LIM, D.S.L., TU, C.-L., PALOMBO, E.A., SHAW, J.M., GASSER, R.B., BOAG, P.R. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. **Parasites Vectors**, Vol. 9, p. 187, 2016.

LAING, R., GILLAN, V., DEVANEY, E. Ivermectin - Old drug, New Tricks? **Trends Parasitol**. Vol. 33(6), p. 463-472, 2017.

LI T, ITO A, CHEN X, LONG C, OKAMOTO M, RAOUL F, GIRAUDOUX P, YANAGIDA T, NAKAO M, SAKO Y, XIAO N, CRAIG PS. Usefulness of pumpkin seeds combined with areca nut extract in community-based treatment of human taeniasis in northwest Sichuan Province, China. **Acta Tropica**. Vol. 124, p. 152–157, 2012.

LI, W., KOIKE, K., TATSUZAKI, M., KOIDE, A., NIKAIDO, T. Cucurbitosides F-M, acylated phenolic glycosides from the Seeds of *Cucurbita pepo*. **Journal of Natural Products**. Vol 68, p. 1754-1757, 2005.

LIMA, C.R., VASCONCELOS, C.F.B., COSTA-SILVA, J.H., MARANHÃO, C.A., COSTA, J., BATISTA, T.M., CARNEIRO, E.M., SOARES, L.A.L., FERREIRA, F., WANDERLEY, A.G. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 141 (1), p. 517-525, 2012.

LIN, M., ZHANG, J., CHEN, X. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. **Journal of Functional Foods**, Vol. 47, p. 469–479, 2018.

MACÁKOVÁ, K., KOLECKÁR, V., CAHLIKOVÁ, L., CHLEBEK, J., HOSTÁLKOVÁ, A., KUČA, K., JUN, D., OPLETAL, L. Tannins and their influence on health, in: RAHMAN, A., CHOUDHARY, M. I., PERRY, G. **Recent Advances in Medicinal Chemistry**. Elsevier, Vol. 1, 486p., 2015.

MARIE-MAGDELEINE, C., HOSTE, H., MAHIEU, M. VARO, H., ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. Vol. 161, p. 99-105, 2009.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**, 3ª ed. Editora UFC: Fortaleza, 2009.

MELGAR, B., DIAS, M. I., CIRIC, A., SOKOVIC, M., GARCIA-CASTELLO, E. M., RODRIGUEZ-LOPEZ, A. D., BARROS, L., FERREIRA, I.C.R.F. Bioactive characterization

of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. **Industrial Crops & Products**, Vol. 111, p. 212-218, 2018.

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

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 Parasitology**. Vol. 47, p. 39–44, 2000.

MOLAN, A.L., WAGHORN, G.C., MCNABB, W.C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. **Veterinary Record** Vol. 150, p. 65-69, 2002.

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

MONTEIRO, M.V.B., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Machado, L.K.A., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Campello, C. C., Ribeiro, W.L.C., Mesquita, M.A. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. Vol. 182, p. 259-263, 2011.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na medicina veterinária**. Editora Roca: São Paulo, 2011.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. L., AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, Vol. 28 (5), p. 892-896, 2005.

MORRIS, S.T., Overview of sheep production systems. **Advances in Sheep Welfare**, 2017.

MORRIS, S.T. Economics of sheep production. **Small Ruminant Research**, Vol. 86 p. 59–62, 2009.

MUCHIUT, S. M., FERNANDEZ, A. S., STEFFAN, P. E., RIVA, E., FIEL, C. A. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations, **Veterinary Parasitology**, Vol. 254, p. 43-48, 2010.

MULCAHY, G.; O'NEILL, S.; DONNELLY, S.; DALTON, J. P.; Helminths at mucosal barriers—interaction with the immune system. **Advanced drug delivery reviews**, Vol. 56, p. 853 – 868, 2004.

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUVADI, M. R.; KRISHNA, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, Vol. 33, p. 2-16, 2001.

NAVES, L. P., CORRÊA, A. D., ABREU, C. M. P., SANTOS, C. D. Nutrientes e propriedades funcionais em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Vol. 30, p. 185-190, 2010.

NETO, M.; L. Ecto e endoparasitas, 2011. Disponível em <http://ovinoscaprinos.iepec.com/noticia/imprimirNoticiaPopUp&idNoticia=3559>. Acesso em: 06/01/2015.

ODO, C.E. Anti-motility and reductions in the concentrations of gut electrolytes: Bases for the anti-spastic use of the leaves of *Persea americana* in folk medicine. **Journal of Pharmacy Research**, Vol. 6 (3), p. 336-341, 2013.

ORLANDI, T., KOZLOSKI, G.V., ALVES, T.P., MESQUITA, F.R., ÁVILA, S.C. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 210, p. 37-45, 2015.

PAHUA-RAMOS, M. E., ORTIZ-MORENO, A., CHAMORRO-CEVALLOS, G., HERNÁNDEZ-NAVARRO, M.D., GARDUÑO-SICILIANO, L., NECOECHEA-MONDRAGÓN, H., HERNÁNDEZ-ORTEGA, M. Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. **Plant Foods Human Nutrition**. Vol. 67, p. 10-16, 2012.

PATEL, S. Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seeds as nutraceutical: a review on status quo and scopes. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, Vol, 6, p. 183 – 189, 2013.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, Vol, 6, p. 1-5, 2012.

PETTOLINO, F.A.; WALSH, C.; FINCHER, G.B.; BACIC, A. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. **Nat. Am.** Vol. 7(9), p. 1590-1607, 2012.

PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BERTOLINI, A.; PATUI, S.; VIANELLO, A. Plant flavonoids - Biosynthesis, transport and involvement in stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 14, p.14950-14973, 2013

PILUZZA, G., SULAS, L. BULLITTA, S. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. **Grass and Forage Science**. P. 1-17, 2013.

QUEIROZ, C. R. A. A., MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Sociedade de Investigações Florestais**. Vol. 26 (4), p. 485-492, 2002.

ROCHELLE, L. A. Descrição taxonômica de cultivares de *Cucurbita maxima* Duchesne e *Cucurbita pepo* Linneu. **Anais da E.S.A. - ESALQ Piracicaba**. Vol 31, p. 667-700, 1974.

ROCHELLE, L. A. Estudo pomológico comparativo das cultivares de cucurbita. **Anais da E.S.A. - ESALQ Piracicaba**. Vol 33, p. 157-165, 1976.

RODRÍGUEZ-CARPENA, J.G., MORCUENDE, D., ANDRADE, M.J., KYLLI, P., ESTEVEZ, M. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. **J. Agric. Food Chemistry**. Vol. 59, p. 5625-5635, 2011.

ROY, S., DATTA, S. A comprehensive review of the versatile pumpkim seeds (*Cucurbita maxima*) as a valuable natural medicine. **International Journal of Current Research**. Vol. 7 (8), p. 19355-19361, 2015.

RUFATTO, L. C., LUCHTENBERG, P., GARCIA, C., THOMASSIGNY, C., BOUTTIER, S., HENRIQUES, J. A. P., ROESCH-ELY, M., DUMAS, F., MOURA, S. Brazilian red propolis: chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, Vol. 214, p. 74-82, 2018.

SANTOS, M. C., SILVA, B. F., AMARANTE, A. F. T. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Vol. 188, p. 277-284, 2012.

SANTOS, M. H. **Agrobiodiversidade de *Cucurbita* spp. Na região norte do estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Departamento de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

SANTOS, E. A. A., WEBER, A. S. S. F. Site-specific hydrolysis of chlorogenic acids by selected *Lactobacillus* species. **Food Research International**, Vol. 109, p. 426-432, 2018.

SCHMIDT, B. M., CHENG, D. M. K. **Ethnobotany: A Phytochemical Perspective**. Editora John Wiley & Sons, 2017.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D.M., PEEL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal feed science and technology**. Vol 91, p. 21-40, 2001.

SINGLETON V.L; ROSSI, A.J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. Vol. 16, p. 144-58, 1965.

SOLDERA-SILVA, A., SEYFRIED, M., CAMPESTRINI, L. H., ZAWADZKI-BAGGIO, S. F., MINHO, A. P., MOLENTO, M. B., MAURER, J. B. B. Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of *Persea americana* seed extracts. **Veterinary Parasitology**, Vol 251, p. 34-43, 2018.

STRICKLAND, V. J., KREBS, G. L., POTTS, W. Pumpkin kernel and garlic as alternative treatments for the control of *Haemonchus contortus* in sheep. **Animal Production Science**. Vol. 49, p. 139-144, 2009.

TIWARI, R., RANA, C.S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**. Vol. 3, p. 661-670, 2015.

TORRES, R. C., GARBO, A. G., ZINCA, R., WALDE, M. L. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. Vol. 7, p. S167-S170, 2014.

UDOBI, M. I., NZEAKOR, T. A., EKE, I. G., EZEH, I. O., ONYEABOR, A., IDIKA, I. K., NWOSU, C. O. Evaluation of the anthelmintic potential of *Duranta erecta* L. (Verbenaceae) fruits used in Nigerian ethnomedicine as a vermifuge. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol 216, p. 57-62, 2018.

VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. **Química Nova**, Vol. 27 p.944-948, 2004.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, A.; POURRAT, H. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. Vol. 67 (1), p. 11-14, 1992.

WANG, W., BOSTIC, T.R., GU, L., Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**. Vol. 122, p. 1193–1198, 2010.

WIENARSIH, I., MADYASTUTI, R., PRASETYO, B. F., ALDOBRATA, A. Anti lithiasis activity of avocado (*Persea americana* mill) leaves extract in white male rats. **Hayati Journal of Biosciences**. Vol.19 (1) p. 49-52, 2012.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, Vol. 64, p. 3-19, 2003 (SALVO)

YASIR, M., DAS, S., KHARYA, M. D. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. **Pharmacognosy Reviews**. Vol 4, p. 77-84, 2010.

ANEXOS