

MARIANA COSTA FAUSTO

***Ascaris suum*: DIAGNÓSTICO, CONTROLE ALTERNATIVO E
LEVANTAMENTO NA MICRORREGIÃO DE PONTE NOVA – MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Fausto, Mariana Costa, 1982-
F268a *Ascaris suum* : diagnóstico, controle alternativo e
2015 levantamento na microrregião de Ponte Nova - Minas Gerais /
Mariana Costa Fausto. – Viçosa, MG, 2015.
 xii, 93f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Parasitologia veterinária. 2. Suínos - Doenças - Controle biológico. 3. *Piptadenia gonoacantha*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

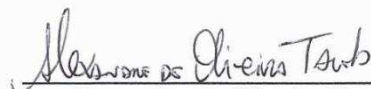
CDD 22. ed. 636.089696


MARIANA COSTA FAUSTO

***Ascaris suum*: DIAGNÓSTICO, CONTROLE ALTERNATIVO E
LEVANTAMENTO NA MICRORREGIÃO DE PONTE NOVA – MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

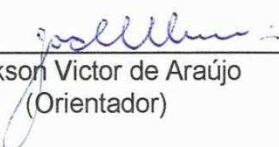
APROVADA: 05 de março de 2015.


Alexandre de Oliveira Tavela


Camilo Amaro de Carvalho


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira


Artur Kanadani Campos
(Coorientador)


Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus pai e ao filho, Jesus Cristo, pela força e orientação na batalha diária, me auxiliando a seguir em frente, mesmo quando tudo parecia estar perdido.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de Graduação, de Mestrado e de Doutorado em Medicina Veterinária.

Ao professor Jackson Victor de Araújo, pela oportunidade, pela orientação e confiança durante o doutorado.

Ao professor Artur Kanadani, que se revelou mais do que um Co-orientador, mas também um amigo para todas as horas.

Aos professores Camilo Amaro, Waleska Dantas, Rogério Pinto e João Paulo Machado, pelo carinho e palavras de incentivo.

Ao meu amigo irmão Fabrício Valente, pela paciência incalculável e pelo auxílio no trabalho.

Aos funcionários do DVT/UFV, sobretudo a Rose, Samuel, Tuim e Ademir, pelo convívio e amizade.

Aos funcionários da Univiçosa Vinícius, Reginaldo, Vitor e Alexandre, por todo auxílio nos dias mais corridos e tumultuados.

À amiga Lorendane pela parceria, amizade, dedicação e pelo incentivo nas horas difíceis. Minha eterna gratidão.

Às estagiárias queridas Thais, Marisa e Jan, e às “chuchuzinhas” Francieli e Nathalia, pela ajuda impar. Aos demais companheiros e amigos do Laboratório de Parasitologia e DVT/UFV, Juliana, João Victor, Isabela, Idelvânia entre outros, pelo auxílio e pela gratificante convivência.

A minha família, sobretudo a minha mãe Valéria, meu pai Rubinho, meus avós Manoel e Maria Alice, e meus queridos irmãos Guilherme e Cecília. A Tia Calú pela alegria contagiante. E principalmente à minha filha Emanuele, meu raio de sol, meu norte, minha vida!

Aos amigos, “Santa Maria”, Adriana, Ethel e muitos outros, pela valiosa amizade, que certamente contribuiu direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Mariana Costa Fausto, filha de Valéria Teixeira da Costa e Rubens Fausto da Silva, nasceu em Viçosa, MG, no ano de 1982.

Em março de 2003, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, onde, em janeiro de 2008, obteve o título de Médico Veterinário.

Em março de 2008, iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo o Mestrado em março de 2010.

Em julho de 2009 iniciou como professora de nível superior, ministrando aulas de Parasitologia Veterinária, Microbiologia Veterinária e Doença e Produção de Suínos na Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – Facisa/Univiçosa.

Em março de 2011, iniciou o Doutorado em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1. Suinocultura	3
2.2. Sistemas de produção.....	3
2.2.1. O sistema de produção em cama-sobreposta ou deep bedding.....	4
2.3. Helminhos parasitas de suínos.....	5
2.3.1. <i>Ascaris suum</i>	5
2.4. Manejo sanitário e controle parasitário.....	7
2.5. Métodos alternativos para controle de parasitos.....	8
2.6. Controle biológico por nematófago.....	9
2.6.1. <i>Pochonia clamydosporea</i>	11
2.7. Controle fitoquímico.....	11
2.7.1. <i>Piptadenia gonoacantha</i>	13
REFERÊNCIAS.....	15
3. OBJETIVOS.....	27
CAPÍTULO 1 - <i>Ascaris suum</i> in the micro-region of Ponte Nova in the Zona da Mata - Minas Gerais, Brazil.....	28
Abstract.....	29
Resumo.....	29
1. Introduction.....	30
2. Material and methods.....	31
3. Results and discussion.....	32
References.....	36

CAPÍTULO 2 - Atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i> e efeitos do extrato aquoso da folha de <i>Piptadenia gonoachanta in vivo</i> sobre parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos de camundongos Balb/C.....	39
Resumo.....	40
Abstract.....	41
1. Introdução.....	41
2. Material e métodos.....	43
3. Resultados e discussão.....	47
4. Conclusão.....	59
Referências.....	60
CAPÍTULO 3- Influência da solução de flutuação na realização do método de McMaster para a quantificação de ovos de <i>Ascaris suum</i> em fezes de suínos.....	68
Resumo.....	69
Abstract.....	69
1. Introdução.....	70
2. Material e métodos.....	71
3. Resultados e discussão.....	72
Referências.....	75
CAPÍTULO 4- Atividade predatória de <i>Pochonia chlamydosporia</i> sobre ovos de <i>Ascaris suum</i> em condições laboratoriais.....	78
Resumo.....	79
Abstract.....	80
1. Introdução.....	81
2. Material e métodos.....	82
3. Resultados e discussão.....	85
Referências.....	87
CONCLUSÕES GERAIS.....	92
ANEXO I.....	93

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1:

Tabela 1: Percentage of liver lesions (milk spots) caused by *Ascaris suum*, according to farm size, in the micro-region of Ponte Nova, Minas Gerais, Brazil, from January 2011 to June 2013.....33

Table 2: Number of animals evaluated per municipality and percentage of animals positive for “milk spots” caused by migrating larvae of *Ascaris suum* in the micro-region of Ponte Nova, Minas Gerais, Brazil from January 2011 to June 2013.....35

Capítulo 2

Tabela 1: Resultados da prospecção fitoquímica dos Extratos Aquosos produzidos a partir das folhas de *Piptadenia gonoacantha*.....48

Tabela 2: Valores bioquímicos médios de camundongos BALB/C, tratados com diferentes doses extrato aquoso obtido das folhas *Piptadenia gonoacantha*, administrado via oral durante 10 dias consecutivos.....54

Tabela 3: Valores hematológicos médios de camundongos BALB/C, tratados com diferentes doses extrato aquoso obtido das folhas *Piptadenia gonoacantha*, administrado via oral durante 10 dias consecutivos.....56

Tabela 4: Avaliação histológica de camundongos BALB/C, tratados com extrato aquoso obtido das folhas de *Piptadenia gonoacantha*, administrado por via oral durante 10 dias consecutivos. Valores referentes à média dos escores encontrados.....58

Capítulo 3

Tabela 1: Composição, gravidade específica e viscosidade de soluções utilizadas para de flutuação de ovos de *Ascaris suum* a partir de fezes suínas, pela técnica de McMaster.....73

Tabela 2: Valores médios de OPG (contagem de ovos por grama de fezes) obtidas em câmara de McMaster em função da GE (gravidade específica).....74

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1: Ensaio de mobilidade: ação do extrato aquoso produzido a partir de folhas de *Piptadenea gonoacantha* sobre *Panagrellus* sp., após 24 horas de incubação. **EAM:** pó de *P. gonoacantha* macerado em água; **EAU:** extrato aquoso ultrassonicado de *P. gonoacantha*; **EAL:** extrato aquoso de *P. gonoacantha*, liofilizado e ressuscitado em água destilada. Colunas representam os valores médios e desvio padrão (n=6). *p<0,05: diferença significativa quando comparada com os grupos controle. Teste Kruskal-Wallis e como teste *post hoc* Student-Newman-Keuls.....50

Figura 2: Ação do extrato aquoso ultrassonicado (EAU - 50 mg/mL) sobre *Panagrellus* sp.. (a) *Panagrellus* sp. após 48 horas de incubação (controle negativo – água destilada). (b) *Panagrellus* sp. após incubação por 24 horas. (c) *Panagrellus* sp., após incubação por 48 horas. (d) Ação do fenbendazol 2%, sobre *Panagrellus* sp., após incubação por 48 horas. (a,c e d: lentes objetivas de 40x ; b: objetiva de 10x).....52

Figura 3: Fotomicrografias de órgãos de camundongos tratados com ivermectina 1%. **a)** Fígado com áreas de necrose evidenciada pela presença de feixes de hepatócitos com núcleos ausentes (seta preta), circundada por infiltrado inflamatório (seta branca) (x40). **b)** Região medular do rim com leitos capilares dilatados e repletos de hemácias indicando hiperemia (setas) (x200). **c)** Segmento intestinal com vilosidades dilatadas pelo infiltrado inflamatório (seta preta) e com o epitélio descontínuo (seta branca).....59

Capítulo 4

Figura 1: Efeito ovicida causado por diferentes concentrações de clamidósporos (1.000, 10.000 e 100.000) de *P. chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) em ensaio *in vitro*, após 21 dias de interação com ovos de *Ascaris suum*. SE: sem efeito; T1: tipo 1; T2: tipo 2; T3: tipo 3.....88

LISTA DE ABREVIATURAS

- Anova: Análise de Variância
- AST: Aspartato aminotransferase
- ALT: Alanina aminotransferase
- BEA: Ciência do Bem-Estar Animal
- CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média
- COX-2: Ciclo-oxigenase-2
- C₁₂H₂₂O₁₁: soluções de açúcar
- EALPG: extrato aquoso de *P. gonoacanthali*ofilizado
- EAPG: extrato aquoso de *P. gonoacantha*
- FA: Fosfatase alcalina
- HCM: Hemoglobina corpuscular média
- HE: Hematoxilina-Eosina
- MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- MHz: mega-hertz
- mPas: Milipascal
- MgSO₄: sulfato de magnésio
- NaCl: cloreto de sódio
- NaNO₃: nitrato de sódio
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- OPG: Contagem de ovos por grama de fezes
- PGD: pó de *P. gonoacantha* diluído em água
- PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
- SE: sem efeito
- SISCAL: Sistema Intensivo de Suínos Criados ao Ar Livre
- VCM: Volume corpuscular médio
- WA: ágar-água
- ZnSO₄: sulfato de zinco

RESUMO

FAUSTO, Mariana Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. ***Ascaris suum*: diagnóstico, controle alternativo e levantamento na microrregião de Ponte Nova – Minas Gerais.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Coorientadores: Fábio Ribeiro Braga e Artur Kanadani Campos.

O setor suinícola brasileiro tem enfrentado nos últimos anos, barreiras para exportação da carne, principalmente relacionadas a questões sanitárias e ao bem-estar animal. Em relação às questões sanitárias, grande destaque tem sido dado às parasitoses intestinais causadas por helmintos e às falhas no processo de vermifugação decorrentes da resistência a antiparasitários. Portanto, é crescente a necessidade de se estudar o perfil epidemiológico dos parasitas que acometem os animais e a partir daí avaliar estratégias de controle alternativos e sustentáveis. O objetivo desse trabalho foi avaliar métodos alternativos de controle para *Ascaris suum* na produção de suínos. O trabalho foi dividido em quatro estudos, realizados em etapas distintas. No primeiro objetivou-se avaliar a epidemiologia do *A. suum* em rebanhos suinícolas localizado na micro-região de Ponte Nova, na Zona da Mata de Minas Gerais - Brasil. No segundo ensaio, foi avaliada a constituição fitoquímica do extrato aquoso produzido a partir das folhas da planta *Piptadenia gonoacantha*, sua ação sobre helmintos *Panagrellus* sp. e sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos de camundongos tratados por 10 dias consecutivos com diferentes doses do extrato. No terceiro, foram avaliadas soluções saturadas preparadas com quatro sais diferentes (NaCl, MgSO₄, NaNO₃, ZnSO₄) e uma solução de açúcar, na realização da técnica de OPG (técnica de McMaster) em fezes de suínos, contaminadas com ovos de *A. suum*. E por último avaliou-se a atividade ovicida *in vitro* de diferentes concentrações de clamidósporos e de diferentes isolados fúngicos de *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *A. suum*. Para o estudo epidemiológico, foram avaliados 108.073 fígados de suínos, abatidos durante o período de janeiro de 2011 a junho de 2013, quanto à presença de lesões hepáticas decorrentes da migração larval de *A. suum*, sendo 9,75% (10.535

animais) positivos. O levantamento epidemiológico demonstrou ineficiência dos protocolos de vermifugação utilizados e necessidade do desenvolvimento de

estratégias alternativas de controle para este parasita na produção. No estudo com a planta, a análise fitoquímica revelou a presença de flavonóides, compostos fenólicos, taninos, antraquinona, saponinas, cumarinas, heterosídeos e cardiotônicos. A atividade anti-helmíntica *in vitro* de diferentes preparações do extrato aquoso foi demonstrada e sua alta eficácia justifica a sua utilização no controle de helmintos gastrointestinais de animais. De acordo com os parâmetros avaliados, a mesma se mostrou segura e com baixa toxicidade, possibilitando o avanço para a realização de estudos clínicos, a fim de comprovar possíveis benefícios em um programa de controle alternativo e sustentável para as parasitoses que acometem os suínos. No terceiro trabalho, as cinco soluções estudadas foram capazes de flutuar ovos, sendo que a solução de nitrato de sódio (densidade 1.20) foi mais eficiente do que as demais (1533,33), e as soluções de açúcar e sulfato de zinco foram as que recuperaram menor quantidade de ovos. Na utilização de clamidósporos do *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) para a destruição de ovos de *A. suum*, *in vitro*, o maior efeito sobre os ovos, ou seja, efeito tipo 2, ocorreu na concentração de 1.000 clamidósporos por placa, apresentando 20.0% (VC4) e 7,33% (VC1) de ovos danificados. Estratégias alternativas e promissoras existem para detecção e controle de *A. suum* na produção de suínos. Contudo, mais testes devem ser realizados com a finalidade de aprimorar tais alternativas para que as mesmas possam ser utilizadas a campo, de maneira segura, dentro de um sistema intensivo de produção de suínos.

ABSTRACT

FAUSTO, Mariana Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2015. ***Ascaris suum*: diagnosis, alternative control and survey in the micro-region of Ponte Nova – Minas Gerais.** Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-advisers: Fábio Ribeiro Braga and Artur Kanadani Campos.

The Brazilian pig industry has faced in recent years, barriers to export of meat, mainly related to health issues and animal welfare. With regard to health issues, great emphasis is being given to intestinal helminth parasites and failures deworming process arising from resistance to these antiparasitic drugs. Therefore, there is a growing need to study the epidemiology of parasites that affect animals and from there to evaluate alternative and sustainable control strategies. The aim of this study was to evaluate alternative control methods to *Ascaris suum* in swine production. The work was divided into four studies carried out in different stages. The first objective was to evaluate the epidemiology of *A. suum* in pig herds located in Ponte Nova micro-region, the Zona da Mata of Minas Gerais - Brazil. In the second assay, was evaluated the phytochemistry constitution of the aqueous extract made from the leaves of the plant *Piptadenia gonoacantha*, its action on helminthes *Panagrellus* sp. and on biochemical, hematological and histological parameters of mice treated for 10 consecutive days with different dosages of extract. In the third, saturated solutions prepared with four different salts were evaluated (NaCl, MgSO₄, NaNO₃, ZnSO₄) and a sugar solution, in performing the FEC technique (McMaster technique) in pig faeces, infected with *Ascaris suum* eggs. Finally, was evaluated the *in vitro* ovicidal activity of different concentrations of chlamydo spores and different fungal isolates of *P. chlamydo sporia* (VC1 and VC4) on *A. suum* eggs. For epidemiological evaluation, were evaluated 108 073 pigs slaughtered during the period January 2011 to June 2013, when possible liver damage due to the presence of *A. suum* and 9.75% (10,535 animals) were positive for the injury. The epidemiological survey showed inefficiency of used worming protocols and the need to develop and / or review of control strategies for this parasite in production. In the study with the plant, phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, phenolics, tannins, anthraquinone, saponins, coumarins, and cardiotonic glycosides. According to

these parameters the same proved to be safe and low toxicity, enabling breakthrough for conducting clinical studies in order to demonstrate possible benefits and hence its use as a tool within an alternative control program and sustainable control for parasites that acomentem pigs. The anthelmintic activity in vitro of the aqueous extract was demonstrated its high efficacy and justifies its use in the control of gastrointestinal helminths of animals. In third study all five solutions were capable of floating eggs, and sodium nitrate solution (density 1.20) was more effective than the others (1533.33), and sugar and zinc sulfate solutions were to recover the smaller amount of eggs. When using chlamydospores of the fungus *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) for the destruction of *Ascaris suum* eggs in vitro the greatest effect on the eggs, or type 2 effect occurred at a concentration of 1.000 chlamydospores per plate, with 20.0% (VC4) and 7.33% (VC1) of damaged eggs. Alternative and promising strategies exist for detection and control of *Ascaris suum* in swine production. However further tests should be performed, in order to enhance such alternatives so that they can be used in the field safely within an intensive system of pig production.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O setor suinícola apresenta grande relevância no desenvolvimento econômico nacional, uma vez que o país se destaca como o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo (ABIPECS, 2013). Por outro lado, o Brasil tem enfrentado nos últimos anos barreiras para exportação da carne, principalmente relacionadas a questões sanitárias e ao bem-estar animal (Silva et al., 2010).

Visando atender e alcançar essa parcela do mercado, preocupada com o bem estar do animal e do ambiente, a criação de suínos ao ar livre (SISCAL) e a utilização de camas sobrepostas em baias coletivas de animais submetidos ao sistema de confinamento, tem se tornado mais frequente nos últimos 20 anos (Salajpal et al., 2013; Silva et al., 2010).

Em relação às questões sanitárias, a atenção tem sido voltada para o controle da utilização de medicamentos antimicrobianos e antiparasitários, uma vez que o uso indiscriminado de tais drogas tem favorecido a seleção de microrganismos e parasitos resistentes, além do alto custo e da toxicidade das mesmas para o animal e o homem (Gerwert et al., 2002).

Dentre as doenças que acometem os suínos, maior importância vem sendo dada às parasitoses intestinais por helmintos, em especial a espécie *Ascaris suum*, devido à alta frequência registrada e à perdas econômicas diretas e indiretas relacionadas à sua infecção (Alencar et al., 2011). Assim, é crescente a necessidade de serem implantados, juntamente com o controle químico, programas estratégicos alternativos e sustentáveis, como a utilização de fungos nematófagos, capazes de inativar ovos de parasitas no ambiente e de plantas contendo compostos bioativos para o controle de helmintos no trato gastrointestinal dos animais (Salajpal et al., 2013; Roepstorff et al., 2011; Araújo et al., 2008).

Estudos realizados em laboratório e a campo vêm demonstrando a habilidade do fungo *Pochonia clamydosporia* em destruir ovos de *A. suum*. Entretanto, para que o fungo seja utilizado como um eficiente controlador biológico é necessário maior conhecimento sobre a epidemiologia da

ascaridíase, em um determinado ambiente e/ou sistema produtivo (Araújo et al., 2004; Mota et al., 2003).

Também a utilização de plantas com compostos bioativos tem apresentado resultados promissores para o controle de helmintos, parasitas do trato gastrointestinal de animais, inclusive em suínos infectados pelo *A.suum* (Sandoval-Castro et al., 2012; Van Krimpen et al., 2010). Dentre as plantas que vêm sendo pesquisadas, destaca-se a espécie *Piptadenia gonoacantha*, endêmica na região sul e sudeste do país. Apesar de não ter sido estudada em suínos, mesma mostrou-se capaz de controlar a infecção parasitária em bovinos após administração do extrato aquoso produzido a partir de suas folhas (Bastos et al., 2014). Contudo, apesar do comprovado efeito antiparasitário não existe trabalhos que demonstrem sua ação e garantam sua utilização de forma segura em organismos vivos.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência do *A. suum* em rebanhos suínos localizados na micro-região de Ponte Nova, na Zona da Mata de Minas Gerais – Brasil e o desempenho de métodos alternativos de controle e técnicas eficazes para o diagnóstico do parasito na produção de suínos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Suinocultura

O setor suinícola vem contribuindo fortemente para o desenvolvimento econômico nacional, uma vez que o país se destaca como o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo (ABIPECS, 2013).

Visando atender as exigências dos países consumidores, programas federais de inspeção e fiscalização de alimentos vêm sendo implantados pelo governo brasileiro, representado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), como o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC, instituído pela Instrução Normativa n.º 42, de 20 de dezembro de 1999, cujo objetivo é verificar a presença de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários. Questões relacionadas à biossegurança dentro das granjas suinícolas também vêm sendo avaliadas, pelo mesmo órgão, conforme designação da Instrução Normativa n.º 19, de 15 de fevereiro de 2002, cujo objetivo é classificá-las quanto ao grau de vulnerabilidade à entrada de patógenos externos, visando prevenir a instalação de doenças que possam comprometer a produção (Aguiar et al., 2012).

De maneira geral, a suinocultura vem passando, no Brasil e no mundo, por grandes mudanças e tem sido alvo de preocupação, principalmente no que se refere às questões ambientais, devido à geração de grandes quantidades de resíduos que são, muitas vezes, lançados em corpos hídricos, poluindo águas superficiais e subterrâneas, e também relacionadas ao bem-estar dos animais (Oliveira, 2008). Assim, o desafio consiste na adoção de técnicas alternativas que viabilizem a sustentabilidade da produção (Silva et al., 2012).

2.2. Sistemas de produção

No Brasil, a produção de suínos ocorre de forma intensiva e extensiva. A primeira visa à maximização da produtividade e dos lucros, podendo ser do tipo: confinado; semiconfinado, confinado sobre cama (*deep bedding*) e intensivo ao ar livre (SISCAL). O sistema extensivo é encontrado na forma de subsistência e/ou extrativismo (Carvalho et al., 2012).

Emcontramãoo futuro promissor da suinocultura brasileira, o país tem enfrentado, nos últimos anos, barreiras para exportação da carne. As principais exigências provêm da União Europeia e correspondem às questões sanitárias e ao bem-estar animal (Silva et al., 2010). A legislação animal vigente na Europa exige que as condições de criação estejam associadas às cinco liberdades fundamentais para o animal, estabelecidas pela ciência do Bem-Estar Animal (BEA) que são: animais livres de medo e estresse, fome e sede, desconforto, dor e doenças e garantia de liberdade de expressão de seu comportamento natural (Roepstorff et al., 2011).

Visando atender e alcançar essa parcela do mercado, recentes mudanças nos sistemas de produção vêm sendo gradativamente adotadas no país e no mundo (Silva et al., 2012; Roepstorff et al., 2011). Dessa forma, a criação de suínos SISCAL, tem se tornado mais frequente nos últimos 20 anos, devido a crescente preocupação do consumidor com o bem estar do animal e do ambiente(Salajpal et al., 2013; Miao et al., 2004; Honeyman et al., 2001). A utilização de camas sobrepostas em baias coletivas, também tem sido uma estratégia de custo relativamente inferior a outras medidas que auxiliam no bem-estar animal (Silva et al.,2010).

2.2.1.Sistema de produção em cama-sobreposta ou deep bedding

O sistema de produção em cama-sobreposta ou *deep bedding*, caracteriza-se por;apresentar um menor custo de implantação; proporcionar conforto e bem-estar ao animal por ser capaz de aumentar a socialização do grupoe minimizar o estresse individual e coletivo dos suínos; agregar valor à produção devido a sua posterior utilização como fertilizante agrícola e facilitar o tratamento dos dejetos diminuindo os níveis de poluição (Silva et al.,2010; Callegari et al., 2009). Pesquisas têm demonstrado que a criação de suínos em diferentes tipos de camas como maravalha, casca de arroz ou café, palha entre outros materiais disponíveis, é capaz de manter o desempenho zootécnico dos animais, em todas as fases de produção, assim como o desempenho obtido nos sistemas tradicionais de confinamento(Tinoco et al.,2007). Além disso, suínos produzidos em cama defecam e urinam continuamente sobre a matéria orgânica, e dependendo da disponibilidade de oxigênio, esta é biodegradada

por meio da compostagem, produzindo calor, amônia e ácidos graxos voláteis, que são por sua vez tóxicos para a maioria dos patógenos que acometem os animais (Nordin et al., 2009; Kunte et al., 2004).

2.3. Helmintos parasitos de suínos

Dentre as doenças que comumente acometem os suínos, as parasitoses intestinais por helmintos receberam por muito tempo, poucodestaque, pois raramente causam doença clínica dentro do rebanho (Roepstorff et al., 2011). Contudo, apesar desse caráter subclínico, ocorrem perdas econômicas na produção devido à redução na conversão alimentar, queda no ganho de peso dos animais contaminados e condenação de órgãos afetados (Weng et al., 2005). Além das perdas relacionadas à produção animal, alguns desses parasitas são considerados zoonose por acometer também o homem, devendo assim, ser monitorados e controlados (Silva et al., 2003).

Entre os helmintos gastrointestinais mais prevalentes em suínos, destacam-se os gêneros *Ascaris*, *Oesophagostomum*, *Strongyloides*, *Trichuris* e *Metastrongylus* (Lai et al., 2011; Roepstorff et al., 2011; Haugegaard, 2010).

2.3.1. *Ascaris suum*

Dos helmintos que acometem os suínos, a espécie *Ascaris suum* apresenta uma posição de destaque, tanto pela frequência registrada quanto pelas perdas econômicas que acarreta (Alencar et al., 2011). Altas temperaturas e umidade, bem como alta densidade populacional e ineficácia das práticas de limpeza das instalações, favorecem a sobrevivência do ovo desse parasita nas instalações, em microambientes conhecidos como *hot spots* (Gupta et al., 2009; Roepstorff., 2003).

A. suum possui o ciclo de vida direto e os suínos se infectam via fecal-oral. Os vermes adultos vivem no interior do intestino delgado, onde cada fêmea é capaz de produzir dois milhões de ovos por dia, que são liberados no ambiente, juntamente com as fezes. Em condições adequadas de temperatura e umidade, os ovos liberados se desenvolvem até o terceiro estágio larval (L₃), tornando-os infectantes. Ao serem ingeridos, eclodem no intestino delgado dos animais, liberando L₃, que penetra na mucosa do ceco e cólon e migra em

4 dias para o fígado, causando lesões no parênquima do órgão, comumente conhecidas como manchas brancas, manchas de leite ou *milk spots*. Entre o 6º e 8º dia pós-infecção, as L₃ migram para os pulmões, via corrente sanguínea, penetram nos capilares e alvéolos, atingindo o trato respiratório, chegando à faringe e são então deglutidas, alcançando o intestino delgado. Nesse órgão, a maioria das larvas podem ser expulsas e as remanescentes mudam duas vezes a L₄ (17-19 mm) e L₅ (22-36 mm), por volta do 10º e 24º dia pós-infecção, respectivamente. Os adultos surgem por volta do 42º dia pós-infecção, podendo os machos alcançar até 25 cm de comprimento, enquanto que as fêmeas atingem até 35 cm e começam a produzir ovos. Dessa maneira, o período pré-patente decorrente desde a ingestão de ovos infectantes pelos suínos até a produção de ovos pelas fêmeas, é de 6 a 8 semanas (Barcelos et al., 2012; Dias et al., 2011; Nejsun et al., 2009a; Roepstorff et al., 1997).

A detecção da presença de helmintos através do monitoramento ao abate dos animais apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, permitindo uma avaliação precisa do grau de contaminação. Contudo, o exame coproparasitológico permite identificar os helmintos nos animais em períodos anteriores à idade de abate, contribuindo o tratamento curativo (Dias et al., 2011).

Os prejuízos à produção ocorrem devido à diminuição no ganho de peso dos animais parasitados, aumento na taxa de conversão alimentar, condenação hepática e diminuição da rentabilidade da carcaça ao abate (Knecht et al., 2011). Além disso, o parasita pode causar quadros de pneumonias verminóticas, decorrentes da migração larval para o pulmão, que se complicam quando associadas a agentes bacterianos oportunistas encontrados atualmente na produção intensiva de suínos (Vazquez et al., 2010).

Por ser bastante imunogênico, o parasita também é capaz de interferir na modulação do sistema imune do animal (Steenhard et al., 2009). Sua infecção reduz a eficácia da vacinação contra patógenos que acometem suínos, como o *Mycoplasma hyopneumoniae*, prejudicando a imunidade pós-vacinal e aumentando o grau de lesões nos pulmões (Thamsborg et al., 2013; Vazquez et al., 2010; Steenhard et al., 2009). De acordo com o paradigma da resposta

imunológica, helmintos em geral estimulam Th2 e inibem Th1. Como consequência, as infecções helmínticas podem regular negativamente as respostas Th1 contra bactérias e vírus reduzindo, desse modo, à eficácia de vacinas, o que justificam as falhas que ocorrem na vacinação para *Mycoplasma hyopneumoniae* de suínos infectados com *A. suum* (Vazquez et al., 2012; Steenhard et al., 2009; Urban et al., 2007).

A situação de estresse imunológico também diminui a taxa de crescimento dos suínos, devido ao fato da infecção induzir uma série de respostas imunológicas, como a liberação de citocinas inflamatórias, que alteram o sistema neuroendócrino e reduzem a secreção do hormônio do crescimento. Assim, animais imunologicamente desafiados pelo parasita, apresentam uma menor taxa de crescimento, mesmo não manifestando qualquer indicação clínica (Johnson, 1997; Spurlock, 1997).

A resistência físico-química e a longevidade de ovos de *A. suum*, favorecem sua persistência no ambiente e criam desafios para o seu controle (Roepstorff et al., 2011; Thamsborg et al., 2010). Em um estudo realizado por Katakam et al. (2014) na Dinamarca, avaliou-se o desenvolvimento e a viabilidade desses ovos, de acordo com as condições físico-químicas da cama utilizada na produção de suínos. Segundo os autores, ovos recuperados de áreas profundas da cama e com excesso de contaminação fecal não foram capazes de completar o embrionamento, sendo considerados, inviáveis. Contudo, uma quantidade considerável dos ovos, principalmente os que foram extraídos de áreas limpas e superficiais, manteve sua viabilidade, sendo, portanto responsáveis pela contaminação dos animais e do ambiente (Ilić et al., 2013).

2.4. Manejo sanitário e controle parasitário

A grande maioria dos sistemas intensivos de criação de suínos utiliza o confinamento dos animais para o controle da produção, o que contribui para o aumento na diversidade e disseminação de doenças dentro do rebanho (Sobestiansky et al., 2007). Dentre tais doenças, as infecções por helmintos são diretamente relacionadas com a higiene e o tipo de manejo sanitário adotado, uma vez que o mesmo influencia diretamente nos estágios de vida livre dos

parasitos, nos mecanismos de transmissão e na imunologia dos hospedeiros (Lai et al., 201; Kagira et al., 2008).

O processo de intensificação da suinocultura moderna, baseado no avanço de recursos tecnológicos, promoveram melhores condições sanitárias dentro das instalações e foram responsáveis pela redução na diversidade de parasitas encontrados nos animais (Alencar et al., 2011; Roppa, 1998). Apesar disso, estudos demonstram que, mesmo em granjas altamente tecnificadas, a infecção parasitária se faz presente, ainda que em baixos níveis ao longo do ano (Alencar et al., 2011, Kipper et al., 201; Kagira et al., 2008).

Até o momento, estratégias de controle de parasitos, dentro da produção de suínos, têm sido baseadas unicamente na utilização rotineira de drogas anti-helmínticas, principalmente à base de fenbendazole, ivermectina e abamectina via oral (Dias et al., 2011). Dessa maneira, a persistência destes helmintos nos rebanhos pode ser atribuída à contaminação e à resistência dos ovos ao meio ambiente (Roepstorff et al., 2011).

2.5. Métodos alternativos para controle de parasitos

A utilização de drogas anti-helmínticas na produção vem deixando a desejar, devido a problemas relacionados à resistência dos parasitos, ao alto custo e à toxicidade dessas drogas para o animal e o homem (Gerwert et al., 2002). Diante disso, existe a necessidade de serem implantados, juntamente com o controle químico, programas estratégicos alternativos e sustentáveis, visando assegurar a saúde dos organismos vivos e do ambiente (Barcelos et al., 2012; Roepstorff et al., 2011; Mota et al., 2003; Gerwert et al., 2002; Graminha et al., 2001).

A implantação de programas de monitoramento durante o abate dos animais, com objetivo de avaliar a prevalência de parasitos nos rebanhos para traçar medidas de combate à verminose, vem sendo utilizada com sucesso em alguns países (Vazquez et al., 2012). Outras estratégias incluem a utilização de vacinas que possam contribuir para o aumento da imunidade dos animais, a utilização de cruzamentos de raças comerciais geneticamente resistentes à infecção parasitária, a utilização de dietas com efeitos antagônicos a determinados parasitas, a utilização de plantas contendo compostos bioativos

para o controle de helmintos no trato gastrointestinal e a utilização de fungos nematófagos, capazes de inativar ovos de parasitas no ambiente (Salajpal et al., 2013; Sandoval-Castro et al., 2012; Carvalho et al., 2010; Krimpen et al., 2010; Araujo et al., 2008; Gortari and Hours, 2008; Mota et al., 2003; Thamsborg et al., 1999). Contudo, segundo Roepstorff et al. (2011), apesar de tais medidas serem promissoras, as mesmas devem ser combinadas com a utilização de drogas anti-helmínticas convencionais, dentro de um rebanho.

2.6. Controle biológico por fungos nematófagos

O termo controle biológico se aplica à utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, que buscam diminuir, a um limiar economicamente aceitável, a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola (Grønvold et al., 1989). Diferente do controle químico que visa a eliminação total do parasita dentro do hospedeiro, o controle biológico é direcionado para a redução dos estágios de vida livre no meio ambiente. Entretanto, para que ele seja utilizado de forma eficiente, torna-se necessário o conhecimento sobre a epidemiologia dos parasitos e suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente e/ou sistema produtivo (Araújo et al., 2004; Mota et al., 2003).

Fungos nematófagos são microfungos que capturam, matam e digerem diferentes estágios de desenvolvimento de helmintos parasitos e que são comumente encontrados em solos naturais, agrícolas e em matéria orgânica em decomposição (Nordbring-Hertz et al., 2006). Estes são classificados como predadores, endoparasitas e oportunistas que são parasitas de ovos, cistos e fêmeas (Araújo et al., 2004).

Os fungos predadores têm sido bastante estudados, pois têm demonstrado a capacidade de reduzir efetivamente populações de nematoides, tanto em condições laboratoriais como a campo (Larsen, 1999). Entre os fungos predadores, os gêneros *Duddingtonia* e *Monacrosporium* se destacam por serem produtores de hifas que formam redes tridimensionais efetivas, controladoras de nematoides no ambiente (Dimander et al., 2003; Araújo et al., 1999). Tais estruturas de capturas são produzidas pelos fungos devido a diferentes estímulos como presença dos nematoides, motilidade, produção de

substâncias deles derivadas, luminosidade, presença de água, estado nutricional do isolado entre outras (Araújo et al., 2004).

Condições de estresse extremo induzem a formação de estruturas denominadas clamidósporos, que são esporos de parede espessa que podem dar origem a hifas, conidióforos e conídios (Barron, 1977). Fungos classificados como endoparasitas são capazes de infectar o parasita através de esporos, que uma vez ingeridos desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno dos mesmos. Já os fungos conhecidos como oportunistas parasitas de ovos (ovicidas), penetram suas hifas através de pequenos poros existentes na camada vitelínica, aumentando a permeabilidade da casca e expandindo seu volume. Tais fungos colonizam o conteúdo do ovo e/ou a larva do nematóide, em desenvolvimento no seu interior (Mota et al., 2003; Morgan-Jones & Rodríguez-Kábana 1988).

Segundo Larsen (1999), fungos utilizados para o controle biológico devem ser capazes de atravessar o trato gastrointestinal dos animais, crescer em fezes e realizar subsequente predação. A produção de clamidósporos por tais fungos pode favorecer essa passagem e contribuir para o controle do parasito no ambiente, uma vez que se trata de estruturas de resistências (Ferreira et al., 2011a; Terrill et al., 2004; Larsen, 1999). Segundo Braga et al. (2010) para que o fungo seja um importante controlador, é necessário que o mesmo tenha uma rápida ação ovicida e seja capaz de permanecer durante muito tempo no ambiente, podendo dessa forma eliminar ovos de helmintos que possuem variados períodos de incubação.

Apesar de promissor, a finalidade do controle biológico não é o de ser um substituto para o uso de medicamentos convencionais, pois não eliminam os parasitos, apenas reduzem o número destes organismos a níveis aceitáveis e mantêm um balanço entre o patógeno e o antagonista. Além disso, em contraste ao controle químico dos nematoides parasitos de animais, que é direcionado para a eliminação dentro do hospedeiro, o controle biológico é direcionado apenas para os estágios de vida livre presentes no meio ambiente (Araújo et al., 2004).

2.6.1. *Pochonia clamydosporia*

Trabalhos realizados em laboratório e a campo vêm demonstrando a habilidade de alguns fungos helmintófagos em controlar parasitos que acometem suínos. Entre eles destaca-se, o fungo *Pochonia clamydosporia*, onde a ação ovicida dos isolados VC4 e VC1, crescido em meio AA2%, foi demonstrada após 21 dias de interação *in vitro* com ovos de *A. suum* (Ferreira et al., 2011a; Araújo et al., 2008). Este é classificado como um fungo parasita, capaz de colonizar e destruir ovos de helmintos, por meio de hifas apresórias indiferenciadas, que penetram a parede desses ovos (Nordbring-Hertz et al., 2006).

Em outro trabalho, também realizado por Ferreira et al. (2011b), o mesmo fungo foi oferecido a suínos por via oral e, mesmo após passagem pelo trato gastrointestinal desses animais, germinaram em amostras fecais e foram capazes de destruir ovos do parasita, após 30 dias de interação. Diante disso, a utilização de clamidósporos apresenta-se com alternativa promissora para o controle biológico de nematóides, pois como essa estrutura é responsável pela sobrevivência do fungo no ambiente, estas podem aumentar a viabilidade dos mesmos nos testes de passagem pelo trato gastrointestinal dos animais (Blazkowska et al., 2014; Dias et al., 2012).

Recentemente, ovos de *Toxocara canis* foram eficientemente destruídos, em condições laboratoriais, quando cultivados com diferentes concentrações de clamidósporos, isolados de *P. chlamydosporia*, isolados (VC1 e VC4) (Araujo et al., 2013).

Assim, trabalhos avaliando a ação dessas estruturas, derivadas de *P. chlamydosporia*, sobre ovos de *A. suum*, tornam-se necessários.

2.7. Controle fitoquímico

A utilização de compostos bioativos de plantas para o controle de helmintos parasitas do trato gastrointestinal tem sido uma área de pesquisa crescente (Sandoval-Castro et al., 2012; Viegas et al., 2006). Para que uma espécie vegetal seja utilizada como um fitoterápico é importante se conhecer quais princípios farmacológicos está ativo e se não existem componentes tóxicos que tragam riscos para a saúde humana e animal (Carvalho et al.,

2014a; Simões et al., 2004). Assim, a seleção correta de testes biológicos específicos permitirá uma avaliação do uso terapêutico da espécie vegetal, fornecendo também, informações sobre a toxicidade da planta (Maciel et al., 2002).

A atividade anti-helmíntica de um determinado material vegetal tem sido confirmada *in vitro* por ensaios de: eclosão dos ovos, inibição do desenvolvimento, alimentação e migração larval e inibição da motilidade de parasitos adultos (Jackson & Hoste, 2010; Hoste et al., 2008). Entretanto, resultados *in vitro*, podem demonstrar efeitos anti-helmínticos diferentes, quando avaliados por técnicas diferentes (Alonso-Diaz et al., 2011).

Nos testes *in vivo* é importante considerar aspectos como: resultados *in vitro*, dose necessária a ser utilizada e variações de compostos bioativos uma vez que a atividade biológica do material vegetal pode variar segundo localizações geográficas, tempo de coleta, modos de preservação e preparo (Manolaraki, 2011). Dificuldades na realização dos testes *in vivo*, estão relacionadas à: características individuais dos animais, como animais prematuros, diferenças na imunidade inata e resistência; fenômenos da auto-cura; quantidade e qualidade do material ingerido e efeitos de toxicidade (Sandoval-Castro et al., 2012).

Em suínos, o efeito anti-helmíntico de alguns fitoterápicos vem sendo avaliada na infecção pelo *A. suum*. Trabalhos demonstraram que o tratamento com latex de mamão papaia (*Carica papaya*) em níveis de 2, 4 ou 8 g/kg de peso vivo, reduziu 40, 80 e 100%, respectivamente, a carga parasitária de suínos naturalmente infectados pelo parasita (Satrija et al., 1994). Em outro trabalho, dietas suplementadas com 1% e 5% de uma mistura de plantas (*Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis* e *Echinacea purpurea*) reduziram não apenas o número de animais positivos para o parasita, mas também a quantidade de vermes adultos presentes no intestino delgado desses animais (Van Krimpen et al., 2010; Gaasenbeek et al., 2004). Segundo os autores, as plantas prejudicaram o desenvolvimento e crescimento das larvas liberadas de ovos embrionados e também das larvas que retornam ao intestino após a migração pelos pulmões. Além disso, a duração do tratamento com a planta pode interferir tanto na eficácia do processo de vermifugação como também na

intensidade de estimulação do sistema imune do animal para a eliminação do parasita (Van Krimpen et al., 2010).

2.7.1. *Piptadenia gonoacantha*

O gênero *Piptadenia* (Fabaceae) contém cerca de 80 espécies tropicais frequentes no território brasileiro e na América do Sul (Carvalho, 2010). A espécie *Piptadenia gonoacantha*, constitui-se em uma árvore semicaducifolia que pode atingir até 30 metros de altura. Possui o tronco reto, normalmente tortuoso, com cristas aculeadas longitudinais por toda sua extensão, integradas por outras menores, transversais, lembrando às vezes o couro do jacaré, motivo pelo qual leva o nome popular, pau jacaré (Carvalho et al., 2004). Suas folhas são recompostas, paripinadas, de 5 a 9 pares de pinas, com 26 a 46 pares de folíolos por pina. Possui o pecíolo canaliculado com glândula verruciforme e deprimida no centro (Klein, 1982);

No Brasil, *P. gonoacantha*, ocorre predominantemente nos estados da região sul e sudeste. Contudo, essa planta também tem sido descrita em alguns estados do norte e nordeste (Carvalho et al., 2004). *P. gonocantha* tem sido usada em reflorestamentos destinados à recuperação de áreas degradadas e recomposição de áreas de preservação. Atualmente, vem sendo empregada em acabamentos internos, armação de móveis, produção de carvão vegetal, de papel e celulose, curtumes, alimentação animal na forma de forragem, etc. (Carvalho et al., 2004). Além disso, pode ser utilizada na medicina popular devido a suas propriedades hemostáticas, antidisentéricas, antipiréticas e antioxidantes (Lorenzi, 1992).

Vários estudos foram realizados na tentativa de identificar os constituintes dessa espécie. Carvalho et al. (2010), identificaram os seguintes compostos, em galhos da planta: sitosterol, estigmasterol, o éster N-benzoilfenilalaninato de 2-N-benzoil-3-fenilpropila, conhecido como asperfenamato, 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol, além de três flavonóides, apigenina (5,7,40-triidroxiflavona), apigenina-5-O-metil éter e 7,40-dihidroxi-30, 5-dimetoxiflavona. Os mesmos autores isolaram das folhas: galato de metila e dois flavonóides, conhecidos como vitexina e isovitexina. Das cascas, isolaram uma mistura de sitosterol, campesterol e estigmasterol; mistura de cicloartenona, cicloartan-

25,26-en-3-ona e 24-metileno-cicloartanona, além dos triterpenos, 24-metilenocicloartenol, fridelina, lupeol e lupenona.

Procedimentos capazes de identificar as moléculas constituintes de determinada espécie vegetal, e também o estudo de tais princípios ativos, são extremamente necessários (Carvalho et al., 2008). Contudo, a escolha da técnica e dos solventes utilizados pode influenciar diretamente na qualidade da extração das amostras, pois quanto maior for a solubilidade do soluto, maior será a quantidade de compostos extraídos (Simões et al., 2004).

Entre os métodos de extração, pode ser citada a técnica por ultrassonicação, onde extratos hidroalcoólicos, produzidos a partir da folha de *P. gonoacantha* revelaram a presença de antraquinonas, compostos fenólicos, taninos, saponinas, cumarinas e flavonóides (Carvalho et al., 2014a). Esta técnica é baseada na nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultrassônicas de baixa frequência (<1MHz) (Francony et al., 1996).

Dentre os metabólitos secundários extraídos, os compostos polifenólicos caracterizam-se por apresentar atividade antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana (Hoste et al., 2006; Singh et al., 2003). Carvalho et al. (2014b), demonstraram que extratos hidroalcoólicos da folha de *P. gonoacantha*, apresentaram atividade inibitória frente à *Staphylococcus aureus*. Tal atividade pode estar relacionada com a capacidade dos flavonóides em complexar proteínas extracelulares e solúveis, além de estruturas da parede celular da bactéria (Cowan, 1999). No mesmo estudo a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória também foram confirmadas em ratos tratados com o mesmo extrato. Isso se deve à inibição da expressão da COX-2 e liberação de prostaglandinas, pelos flavonóides presentes na planta (Carvalho et al., 2014b; Havsteen et al., 2002).

Efeito antiparasitário também foi apresentado em bovinos, após administração do extrato aquoso 10%, produzido a partir das folhas da planta (Bastos et al., 2014). Nesse estudo, o extrato mostrou ser eficiente na diminuição da contagem de ovos por grama de fezes dos animais (OPG), igualando à ação da ivermectina 1%, utilizada como controle positivo. Segundo Hoste et al. (2006), a ação antiparasitária pode estar relacionada à atividade

dos taninos existentes em sua composição. Estes podem atuar diretamente, aderindo às cutículas dos nematóides, alterando processos biológicos fundamentais, ou indiretamente melhorando a resposta imunológica do hospedeiro ao parasita (Athanasiadou et al.,2007).No entanto, a atividade exata ainda permanece obscura e parece variar de acordo com o parasita envolvido, sua fase de desenvolvimento, bem como a espécie vegetal utilizada(Hoste et al.,2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS, 2013.**Relatório Abipecs 2012-2013**. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatoriosassociados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf. Acessado em 08 de janeiro de 2014.

AGUIAR, M.R.; GARCIA, S.K.; GONÇALVES, J.P.M. Sistemas de produção de suínos em Minas Gerais: situação e biosseguridade das granjas em 2010. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49. Brasília, 2012. **Anais**. Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012. p.3.

ALENCAR, S.; FARIAS, M.P.O.; ROSAS, E.O.; LIMA, M.M.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Influência do manejo higiênico-sanitário na infecção por helmintos gastrintestinais em suínos de granjas tecnificadas e de subsistência abatidos na região metropolitana de Recife e Zona da Mata do estado de Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.78, n.2, p.207-215, 2011.

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**,n.181, p.360–364, 2011.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ,S.; MAIA, A.S.Antagonistic effect of predacious Arthrobotrys fungi on infective *Haemonchus placei* larvae.**Journal of Helminthology**, v.67, p.136–138, 1993.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.165–170, 2004.

ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitology Research**, v.102, p.787–790, 2008.

ARAÚJO, J.V.; ARAÚJO, J.M.; BRAGA, F.R.; FERREIRA, S.F.; TAVELA, A.O. Predatory activity of chlamydo-spores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, p.171–174, 2013.

ATHANASIADOU, S. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, v.1, n.9, p.1392- 1400, 2007.

BARCELOS, D.; SOBESTIANSKY, J. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone Editorial, 2012. 960p.

BARRON, G.L. The Nematode-destroying Fungi. Topics in Mycobiology, nº 1. **Canadian Biological Publications**, Guelph, Canada, v.140, p.1977, 1977.

BASTOS, J.A.R.; PINTO, R.; PONTES, K.C.S.; FAUSTO, G.C.; CARVALHO, C.A.; SARAIVA, L.H.G. Tratamento Antiparasitário em Bovinos com Erva de Macaé (*Leonurus Sibiricus*) e Pau Jacaré (*Piptadenia Gonoacantha*) – Uma alternativa terapêutica. In: VI SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE, 6, 2014, Viçosa. **Anais...** Viçosa: FACISA, Outubro, 2014.

BLASZKOWSKAA, J.; KURNATOWSKIB, P.; WOJCIKB, A.; GORALSKAB, K.; SZWABEBA, K. *In vitro* evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.199, p.165– 171, 2014.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; ARAUJO, J.M.; FREITAS, F.E.S.; GENIÊR, H.L.A.; FERREIRA, S.R.; QUEIROZ, J.H. Ovicidal

Action of a Crude Enzymatic Extract of the Fungus *Pochonia chlamydosporia* against Cyathostomin Eggs. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.264-268, 2010.

CALLEGARI, V.F.; RODRIGUES, E.A. Resposta da criação de suínos em cama sobreposta: fase de crescimento e terminação. In: II SEMINÁRIO INICIAÇÃO CIENTÍFICA – IFTM, Campus Uberaba, MG, 2009.

CARVALHO, P.E.R. Pau-Jacaré - *Piptadenia gonoacantha*. **Circular Técnica 91**. Colombo, PR. Dezembro, 2004.

CARVALHO, C.A.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, T.G; LIMA, J.M.; ROSA, M.B. Ometric study at different phenologic stages of the cabbage (*Brassicaoleraceae var. capitata*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.249–257, 2008.

CARVALHO, M.G.; CARDOZO, M.A.; CATUNDA, JUNIOR, F.E.; CATUNDA, JUNIOR, FEA.; CARVALHO AG. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha*J.F. Macbr. **Anais**.Academia Brasileira de Ciências, v.82, p. 561-567, 2010.

CARVALHO, P.L.C.; VIANA, E. F.Suinocultura SISCAL e SISCON: análise e comparação dos custos de produção. **Custos e @gronegócio online**, v.7, n.3, 2011.

CARVALHO, C.A.; SANTANA, G.S.; AMARO, M.O.F.; LIMA, L.M.; PIRES, F. B.; PRÁ, V.D.; CARDOSO, S.A.; ROSA, M.B.; Oliveira, L.L. Aspectos químicos e atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha* (FABACEAE). **Ciência e Natura**, v.36 Ed. Especial II, p.732-744, 2014a.

CARVALHO et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr.in Experimental Animal Models. **Ciência e Natura**, v.36 Ed. Especial II, p.775–781, 2014b.

DIAS, A.S.; TANURE, A.M.; MANHÃES, H.G.V.C. Ocorrência de *Ascaris suum* em suínos abatidos na Zona da Mata, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, n.2, p.101-106, 2011.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.564-82, 1999.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; PUPPIN, A.C.; FERNANDES, F.M.; RAMOS, R.F.; BERTONCELI, R.M.; DA SILVA, R.G.; PERBONI, W.R. Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. **Parasitology Research**, v.110, p.663–667, 2012.

DIMANDER, S.O; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.192–209, 2003.

FERREIRA, S.R.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; FRASSY, L.N.; FREITAS, L.G. Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.639–642, 2011a.

FERREIRA, S.R.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.B.; ARAUJO, J.M.; FRASSY, L.N.; FERREIRA, A.S. Biological control of *Ascaris suum* eggs by *Pochonia chlamydosporia* fungus. **Veterinary Research Communications**, v.35, p.553–558, 2011b.

FRANCONY, A.; PÉTRIER, C. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.3, p.77–82, 1996.

GAASENBEEK, C.P.H.; BORGSTEEDE, F.H.M.; EIJCK, I.A.J.M.; SCHUURMAN, T.; VAN DER GAAG, M.A. The effect of phytotherapy on experimental *Ascaris suum* infections in pigs. In: Proceedings of the European Multicolloquium of Parasitology, 2004. Valencia, Spain.

GERWERT, S.; FAILING, K.; BAUER, C. Prevalence of levamisole and benzimidazole resistance in *Oesophagostomum* populations of pig breeding farms in North Rhine-Westphalia, Germany. **Parasitology Research**, v.88, p.63–68, 2002.

GORTARI, M.C.; HOURS, R.A. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs: a review. **Mycological Progress**, v.7, p.221–238, 2008.

GRØNVOLD, J. Induction of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* (*Hyphomycetales*), by infective larvae of *Ostertagia ostertagi* (*Trichostrongilidae*). **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.30, p.77-87, 1989.

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CÂNDIDO, R. C.; SILVA, G. F.; COSTA, A. J. Avaliação in vitro da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. **Semana: Ciências Agrárias**. Londrina, v.22, n.1, p.11-16, 2001.

GUPTA, N.; KHAN, D.K.; SANTRA, S.C. Prevalence of helminth eggs in vegetables grown in waste water-irrigated areas of Titagarh, West Bengal, India. **Food Control**, v.20, p.942–945, 2009.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p.67-202, 2002.

HAUGEGAARD, J. Prevalence of nematodes in Danish industrialized sow farms with loose housed sows in dynamic groups. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.156–159, 2010.

HOSTE, H. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v.22, p.253-261, 2006.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.; ALONSO-DÍAZ, M.A.; BRUNET, S.; SANDOVAL-CASTRO, C.; ADOTE, S.H. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. **Tropical Biomedicine**, v.25, p.56–71, 2008.

HONEYMAN M.S.; MCGLONE J.J.; KLIEBENSTEIN J.B.; LARSON B.E. Outdoor Pig Production. PIH-145. **Pork Industry Handbook**. Purdue University, W. Lafayette, IN: p.9. 2001.

ILIĆ, T.; BECSKEI, Z.; TASIĆ, A.; DIMITRIJEVIĆ, S. Follow-up study of prevalence and control of ascariasis in swine populations in Serbia. **Acta Parasitologica**, v.58, n.3, p.278–283, 2013.

JACKSON, F.; HOSTE, H. In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: Vercoe, P.E., Schlink, A.C., Makkar, H.P.S. (Eds.), *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*. Springer, London, UK, p. 24–45, 2010.

JOHNSON, R.W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1244–1255, 1997.

KAGIRA, J.M.; KANYARI, P.W.N.; MUNYUA, W.K.; WARUIRU, R.M. Relationship between the prevalence of gastrointestinal nematode infections and management practices in pig herds in the Trika District, Kenya. **Livestock Research For Rural Development**, v.20, n.10, 2008.

KATAKAM, K.K.; THAMSBORG, S.M.; KYVSGAARD, N.C.; DALSGAARD, A.; MEJER, H. Development and survival of *Ascaris suum* eggs in deep litter of pigs. **Parasitology**, v.141, p.646–1656, 2014.

KIPPER, M.; ANDRETTAB, I.; MONTEIROA, S.G.; LOVATTOB, P.A.; LEHNENB, C.R. Meta-analysis of the effects of endoparasites on pig performance. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.316–320, 2011.

KLEIN, R.M. Contribuição à identificação de árvores nativas nas florestas do sul do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1982, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p.421-440. Publicado na Silvicultura em São Paulo, v.16 A, parte 1, 1982.

KNECHT, D.; POPIOŁEK, M.; ZALESNY, G. Does meatiness of pigs depend on the level of gastro-intestinal parasites infection? **Preventive Veterinary Medicine**, v.99, p.234–239, 2011.

KRIMPEN, M.M.; BINNENDIJK, G.P.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GAASENBEEK, C.P.H. Anthelmintic effects of phytogenic feed additives in *Ascaris suum* inoculated pigs. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.269–277, 2010.

KUNTE, D.; YEOLE, T.; RANADE, D. Two-stage anaerobic digestion process for complete inactivation of enteric bacterial pathogens in human night soil. **Water Science and Technology**, v.50, p.103–108, 2004.

LAI, M.; ZHOU, R.Q.; HUANG, H.C.; HU, S.J. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. **Research in Veterinary Science** (*in press*), 2011.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.139–146, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas naturais do Brasil**. São Paulo. Editora Plantarum, 1992, 197p.

MACIEL, M.A.M.,PINTO, A.C., VEIGA, V.F.J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MANOLARAKI, F., 2011. **Propriétés Anthelminthiques du Sainfoin (Onobrychis viciifoliae): Analyse des Facteurs de Variations et du rôle des Composés Phénoliques Impliqués.**Soutenue le 21 Janvier, 2011.INP, Toulouse, France.

MEJER, H. **Transmission, infection dynamics and alternative control of helminths in organic swine.**Ph.D.Diss.The Royal Vet.Agric.University, p. 148, 2006.

MIAO Z.H.; GLATZ P.C.; RU Y.J. Review of production, husbandry and sustainability of free- range pig production. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.17, p.1615–1634, 2004.

MORGAN-JONES G. & RODRÍGUEZ-KÁBANA R. Infections events in the fungus nematode system.In: POINAR O.G. & BORNE J.H. (ED.) DISEASES OF NEMATODES. CRC PRESS, Boca Raton, Florida, p.59-62, 1998.

MOTA M.A.; CAMPOS A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, p.93–100, 2003.

NEJSUM, P.; THAMSBORG, S.M.; PETERSEN, H.H.; KRINGEL, H.; FREDHOLM, M.; ROEPSTORFF, A. Population dynamics of *Ascaris suum* in trickle infected pigs. **Journal of Parasitology**, v.95, p.1048–1053, 2009a.

NEJSUM, P.; ROEPSTORFF, A.; JORGENSEN, C.B.; FREDHOLM, M.; GORING, H.H.H.; ANDERSON, T.J.C.; THAMSBORG, S.M. High heritability for *Ascaris* and *Trichuris* infection levels in pigs. **Heredity**, v.102, p.357–364, 2009b.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 1-11, 2006.

NORDIN, A.; NYBERG, K.; VINNERÅS, B. Inactivation of *Ascaris* eggs in source-separated urine and feces by ammonia at ambient temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.662–667, 2009.

OLIVEIRA, P.A.V. **Criação de suínos em cama sobreposta: fases de crescimento e terminação**. 2008. Disponível em: www.cnpsa.embrapa.br/down.php. Acesso em 9 de janeiro de 2015.

ROEPSTORFF, A.; ERIKSEN, L.; SLOTVED, H.C.; NANSEN, P. Experimental *Ascaris suum* infection in the pig: worm population kinetics following single inoculations with three doses of infective eggs. **Parasitology**, v.115, p.443–452, 1997.

ROEPSTORFF, A. ***Ascaris suum* in Pigs: Population Biology and Epidemiology**. p. 112, 2003. Dr. Diss. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

ROEPSTORFF, A.; MEJER, H.; NEJSUM, P.; THAMSBORG, S.M. Helminth parasites in pigs: New challenges in pig production and current research highlights. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.72-81, 2011.

ROPPA, L. **Suinocultura Brasileira. Suinocultura Industrial**, v.20, n.134, p.24-32, 1998.

SALAJPAL, K.; KAROLYI, D.; LUKOVIĆ, Z. **Sanitary aspects of outdoor farming systems**. 8th International Symposium on the Mediterranean Pig, Slovenia, Ljubljana, October 10th–12th, 2013.

SANDOVAL-CASTRO, C.A.; TORRES-ACOSTAA, J.F.J.; HOSTEB, H.; SALEMD, A.Z.M.; CHAN-PÉREZ, J.I. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p.192–201, 2012.

SATRIJA, F.; NANSEN, P.; BJORN, H.; MURTINI, S.; HE, S. Effect of papaya latex against *Ascaris suum* in naturally infected pigs. **Journal of Helminthology**, v.68, p.343–346, 1994.

SIMÕES, .C.M.O; SCHNKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 2004. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS, Porto Alegre.

SINGH, B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.5579-5597, 2003.

SILVA, N.R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P.J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends in Parasitology**, v.19, p.547–551, 2003.

SILVA, C.A.; OLIVEIRA, E.R.; GAVIOLI, D.F.; SILVA, A.A. Cama para suínos: estratégia de manejo e bem-estar animal. **Suínos & Cia**.n.37, 2010.

SOBESTIANSKY, J.; REIS, A.T.& REIS, R. **Monitoramentos sanitários**. In: Sobestiansky J.& Barcellos D>E>S>N> (Eds). Doenças dos Suínos. Goiânia: Cãnone, p.721-722, 2007.

SPURLOCK, M.E. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1773–1783, 1997.

STEENHARD, N.R.; JUNGENSEN, G.,; KOKOTOVIC, B.; BESHAN, E.; DAWSON, H.D.; URBAN JR.;ROEPSTORFF, A.; THAMSBORG, S.M.*Ascaris*

suum infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. **Vaccine**, v.27, p.5161–5169, 2009.

STEENHARD, N.R.; KRINGEL, H.; ROEPSTORFF, A.; THAMSBORG, S.M.; JUNGENSEN, G. Parasite-specific IL-4 responses in *Ascaris suum* and *Trichuris suis*-infected pigs evaluated by ELISPOT. **Parasite Immunology**, v.29, p.535–538, 2009.

TERRILL, T.H.; LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HUSTED, S.; MILLER, J.E.; KAPLAN, R.M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat faces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.285–296, 2004.

TINÔCO, I.F.F.; SOUZA, C.F.; OLIVEIRA, P.A.V. Avaliação do índice de temperatura de globo negro e umidade e desempenho de suínos nas fases de crescimento e terminação criados em sistemas em camas sobrepostas em condições de verão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1624-1629, 2007.

THAMSBORG, S.M.; ROEPSTORFF, A. & LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.169-186, 1999.

THAMSBORG, S.M.; ROEPSTORFF, A.; NEJSUM, P.; MEJER, H. Alternative approaches to control of parasites in livestock: Nordic and Baltic perspectives. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, Suppl 1, 2010.

THAMSBORG, S.M., NEJSUM, P., MEJER, H., 2013. **Impact of *Ascaris suum* in Livestock**. In: *Ascaris: The neglected parasite*. Academic Press. 363p.

THOMSEN, L.E.; MEJER, H.; WENDT, S.; ROEPSTORFF, A.; HINDSBO, O. The influence of stocking rate on transmission of helminth parasites in pigs on permanent pasture during two consecutive summers. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.129–146, 2005.

VAN KRIMPEN, M.M.; BINNENDIJK, G.P.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GAASENBEEK, C.P.H. Anthelmintic effects of phytogetic feed additives in *Ascaris suum* inoculated pigs. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.269–277, 2010.

VAZQUEZ, M.J.S.; SMITHB, R.P.; KANGA, S.; LEWISA, F.; NIELENC, M.; GUNNA, G.J.; EDWARDS, S.A. Identification of factors influencing the occurrence of milk spot livers in slaughtered pigs: A novel approach to understanding *Ascaris suum* epidemiology in British farmed pigs. **Veterinary Parasitology**, v.173, p.271–279, 2010.

VAZQUEZ, M.J.S.; NIELENC, M.; GUNNA, G.J.; LEWIS, F.I. National monitoring of *Ascaris suum* related liver pathologies in English abattoirs: A time-series analysis, 2005–2010. **Veterinary Parasitology**, v.184, p.83–87, 2012.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326–33, 2006.

WENG, Y.B.; HU, Y.J.; LI, Y.; LI, B.S.; LIN, R.Q.; XIE, D.H.; GASSER, R.B.; ZHU, X.Q. Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, Peoples Republic of China. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.333–336, 2005.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar epidemiologia, formas de diagnóstico das helmintoses de suínos e métodos alternativos no controle de *Ascaris suum* na produção de suínos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de lesões hepáticas de suínos abatidos na micro-região de Ponte Nova, localizada na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil;
- Associar as lesões com a época do ano de ocorrência, tamanho e localização do rebanho de origem;
- Determinar o perfil fitoquímico de diferentes preparações utilizando o pó obtido a partir das folhas de *Piptadenia gonoacantha*;
- Avaliar *in vitro* a atividade anti-helmíntica de extratos aquosos obtidos da folha de *P. gonoacantha* sobre *Panagrellus* sp.;
- Avaliar *in vivo* a ação toxicológica de extratos obtidos da folha de *P. gonoacantha* sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos de camundongos Balb/C.
- Avaliar soluções hipersaturadas (NaCl, MgSO₄, NaNO₃, ZnSO₄) e solução de açúcar na realização da técnica de OPG (técnica de McMaster) em fezes de suínos, contaminadas com ovos de *Ascaris suum*.
- Avaliar a atividade ovicida *in vitro* de diferentes concentrações de clamidósporos e de diferentes isolados fúngicos de *P. chlamydosporia* sobre ovos de *A. suum*.

CAPÍTULO 1

***Ascaris suum* in the micro-region of Ponte Nova, Minas Gerais, Brazil**

***Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**

ABSTRACT

Among the parasites that affect pigs, *Ascaris suum* stands out for causing the greatest losses to livestock production systems. This parasite can be monitored during the slaughter of animals through the identification of "milk spots" or white patches on the liver caused by its larval migration. However, infection in the herd is usually subclinical, which is why the presence of this parasite in industrial pig production has been overlooked. The aim of this study was to evaluate the occurrence of milk spots on the liver of animals slaughtered in the micro-region of Ponte Nova, located in the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil, and associate these lesions with the time of year, herd size and origin of the animals. Were evaluated 1069 lots, totaling 108,073 animals, based on data extracted from the Federal Inspection Service. The animals were slaughtered during January 2011 to June 2013. Out of the total number of slaughtered animals, 10,535 (9.75%) showed positivity for these lesions. Therefore, veterinarians and producers should be warned about the inefficiency of the deworming protocols that have been used, and the need to develop and/or review control strategies for this parasite in production systems.

Keywords: slaughter, liver, nematodes, deworming, pigs.

RESUMO

Dentre os parasitas que acometem os suínos, *Ascaris suum* destaca-se como o mais impactante nos sistemas de criação. Seu monitoramento pode ser realizado durante o abate dos animais, por meio da identificação de "milk spots" ou manchas de leite presentes no fígado, decorrentes da sua migração larval. Entretanto devido ao fato da infecção ocorrer no rebanho normalmente de forma subclínica, a presença desse parasita na produção industrial de suínos vem sendo negligenciada. O objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência de "manchas de leite" no fígado de animais abatidos na micro-região de Ponte Nova, localizada na Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil, e associar tais lesões com a época do ano, tamanho do rebanho e local de origem dos animais. Foram avaliados 1069 lotes, totalizando 108.073 animais. Os dados foram extraídos do Serviço de Inspeção Federal, e eram referentes aos animais

abatidos, durante o período de janeiro de 2011 a junho de 2013. Do total de animais abatidos, 10.535 (9,75%) foram positivos para a lesão. Portanto, veterinários e produtores devem ser alertados quanto à ineficiência dos protocolos de vermifugação que tem sido utilizados e a necessidade do desenvolvimento e/ou revisão de estratégias de controle para este parasita na produção.

Palavras-chave: abate, fígado, nematoides, vermifugação, suínos.

INTRODUCTION

Parasites that affect pigs are present in all production systems. Among them, *Ascaris suum* deserves special attention, both for its ability to survive in the environment in the form of embryonated eggs and for its zoonotic potential (SANCHEZ-VAZQUEZ et al., 2012). Although *A. suum* is usually not associated with clinical signs in animals, its presence has been associated, among other things, with low feed conversion, interference in the quality of post-vaccination immunity against various pathogens such as *Mycoplasma hyopneumoniae*, and economic losses due to the rejection of infected organs (ROEPSTORFF et al., 2011).

During the slaughter of these animals, livers with white patches called "milk spots", which result from the larval migration of *A. suum*, are rejected as unfit for human consumption. This practice causes economic losses to the industry due to the disposal of the organ, a byproduct that adds value to the supply chain (MCGAVIN & ZACHARY, 2009; FRUET et al., 2013). However, although inspection during slaughter is considered important to verify the effectiveness of health programs implemented in swine production, little use has been made of this tool (PIFFER et al., 1991).

Due to losses in pig production, several countries have strict *A. suum* control and prevention programs. These programs are aimed at determining the prevalence and epidemiology of the parasite in the herd, based on the detection of milk spots on the liver of slaughtered animals (SANCHEZ-VAZQUEZ et al., 2010; BOES et al., 2010). The findings are

systematically passed onto producers as a strategy to encourage control of the parasite in the herd (SANCHEZ-VAZQUEZ et al., 2012). In Brazil, although there is monitoring in slaughterhouses with Federal oversight, there is no official program that requires this information be transferred to producers and veterinarians responsible for the animals. Thus, little is known about the prevalence and epidemiology of *A. suum* in the Brazilian herd.

The purpose of this study is to evaluate the occurrence of liver lesions described as “milk spots”, resulting from larval migration of *Ascaris suum*, in pigs slaughtered in the micro-region of Ponte Nova, located in Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil, associating these lesions with the time of year when they occur, and the size and location of the farms from which the animals originated.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted based on data collected from the Brazilian Federal Inspection Service (SIF), pertaining to 1,069 lots, totaling 108,073 pigs slaughtered during the period of January 2011 to June 2013 in a commercial slaughter house located in the municipality of Ponte Nova (19°09'09” S latitude and 47°40'29” W longitude), west of the Zona da Mata region of Minas Gerais. The animals came from 37 farms with intensive and technology-dependent production, distributed in 17 municipalities in the region. All the animals were of commercial lines, males (neutered) and females, with approximately 110 kg live weight. The farms were identified and classified as small (herd with up to 300 sows), medium (301 to 1000 sows) and large (herd with more than 1001 sows). During slaughter, the livers of all the animals were inspected according to the guidelines of RIISPOA, the Brazilian Sanitary and Industrial Inspection Regulation of Products of Animal Origin (2001) and the fibrotic livers due parasite migration should be condemned. An analysis of variance (ANOVA) and the Kruskal-Wallis test were performed to identify correlations between the occurrence of the lesion and the time of year; the municipality of origin of the animals and the degree of infection; and the size of the herd and the degree of infection. The Dunn test was used for comparison between groups. The

correlations were considered at a level of significance of 1 to 5%. Data were analyzed using SigmaPlot software (version 11.0).

RESULTS AND DISCUSSION

Among the 108,073 animals analyzed, 10,535 (9.75%) tested positive for liver lesions (Table 1).

Table 1: Percentage of liver lesions (milk spots) caused by *Ascaris suum*, according to farm size, in the micro-region of Ponte Nova, Minas Gerais, Brazil, from January 2011 to June 2013.

Farm size	Number of lots (%)	Number of pigs evaluated	Positive pigs (%)
Small (up to 300 sows)	11 (1%)	765	81 (10.58%) ^A
Medium (from 301 to 1000 sows)	235 (22%)	17573	3.534 (20.11%) ^A
Large (herds with more than 1001 sows)	823 (77%)	89735	6.920 (7.71%) ^B
Total	1,069	108,073	10,535 (9.75%)

Numbers followed by different letters (A and B) in the column differ statistically ($p < 0.01$)

Monitoring during slaughter allows for fast and inexpensive evaluation of herd health (ČERNEK et al., 2012), which in turn allows for the estimation of economic losses based on the number of discarded organs and on the number of infected animals. Sanchez-Vazquez et al. (2010) recently demonstrated that infection by this parasite can decrease the animal's daily weight gain by up to 10%, and the feed conversion of pigs by up to 13% in the growing phase and at slaughter. A high occurrence of the parasite has also been reported in the herds of several countries, such as Slovakia, England and Poland (ČERNEK et al., 2012; SANCHEZ-VAZQUEZ et al., 2012; KNECHT et al., 2012).

In the present study, 235 (22%) of the 1,069 lots of animals evaluated each had more than 20% of animals affected with this type of lesion. According to Sobestiansky et al. (2001) and Lippke et al. (2009), this finding is important, because the discovery of more than 20% of livers showing white spots during monitoring of the digestive tract has epidemiological significance.

There was also a difference in the number of animals with liver lesions ($p < 0.01$) depending on the size of the farms from which they originated. Animals from larger farms (more than 1000 sows) had fewer livers rejected due to the presence of milk spots than animals from medium (301-1000 sows) and small (up to 300 sows) farms (Table 1).

The lower rate of hepatic lesions in animals from larger farms may be related to their level of biosafety, since they are better protected from the sanitary standpoint. Larger operations are usually more technology oriented, have higher investments, and therefore better sanitation. Sanchez-Vazquez et al. (2010) reported similar findings. These authors found that differences in the occurrence rate of the parasite are related to investments in veterinary care and in the implementation of sanitation, disinfection and deworming programs. Garcia et al. (2012) also found that the larger the farm the higher its investment in production technologies. Thus, farms with larger numbers of sows tend to face fewer challenges since they are aided by these technologies.

Another relevant fact is that Brazilian farms classified as large have a higher in-house turnover rate because they produce their own breeding sows (IRGANG et al., 2002). Due to the introduction of fewer young animals, the introduction of infectious agents from outside the herd is also lower (GARDNER et al., 2002). As a consequence, the animals develop higher levels of immunity, reducing the prevalence of parasites such as *A. suum* in the herd, and eggs of this parasite in the environment (JOACHIM et al., 2001; VAZQUEZ et al., 2010).

An analysis of the prevalence of *A. suum* by municipality also revealed differences ($p < 0.01$). However, this difference can not be found. Evaluating absolute values, the municipality of Oratórios, followed by the municipality of Coimbra and Piranga, stood out for presenting the highest proportion of pigs with discarded livers (Table 2).

Table 2: Number of animals evaluated per municipality and percentage of animals positive for “milk spots” caused by migrating larvae of *Ascaris suum* in the micro-region of Ponte Nova, Minas Gerais, Brazil from January 2011 to June 2013.

Municipality	Number of pigs evaluated	Number of positive pigs	(%)
Abre Campo	1.369	176	12.80
Acaiaca	60	1	1.70
Amparo do Serra	50	3	6.00
Catas Altas da Noruega	200	14	7.00
Coimbra	14.216	3.252	22.90
Guaraciaba	325	53	16.30
Jequeri	10087	303	3.00
Oratórios	14.756	3.986	27.00
Piedade de Ponte Nova	3.965	126	3,17
Piranga	770	260	33.46
Ponte Nova	34.392	1.088	3.16
Raul Soares	917	38	4.14
Rio Casca	3112	257	8.25
Rio Piracicaba	60	3	5.00
Santa Cruz do Escalvado	52	4	7.70
Teixeiras	4.337	480	11.0
Urucânia	19.405	491	2.53
Total	108.073	10.535	

In the municipality of Oratórios, this fact can be explained by the high animal housing density; indeed, this municipality is considered a large swine producer in the region, and has a nearby slaughterhouse which is under Federal Inspection. In the municipality of Coimbra and Piranga, the lack of inspection, non-compliance with environmental regulations, and poor planning in the construction of farms, most of which are small and located close to urban areas, contributed to this result. According to Alayande et al. (2012), farms located in the proximities of urban centers are more prone to contamination by *A. suum*, since its eggs can survive and remain viable for up to five years in the environment. Moreover, according to these authors, *A. suum* is very similar to the species *Ascaris lumbricoides*, which infects humans. Leles et al. (2012) concluded that populations of *Ascaris* sp. that occur in humans and pigs have

only minor adaptive changes in their phenotype and genotype, and a single natural history. Thus, *A. suum* is able to infect humans, which contributes to their persistence in the environment.

The transmission of *A. suum* in the pig population has been ascribed to several factors, including seasonality (SANCHEZ- VAZQUEZ et al., 2012). In this study, no difference was found between the two half-year periods under study ($p=0.09$). On other words, in the first period (January to June of each year analyzed), 5,887 (9,88%) of the 59,526 animals evaluated tested positive for "milk spots". In the second period (July to December), the number of positive animals was 4,642, which represented 9,56% of the total number of evaluated animals (48,547 animals). This finding is in agreement with that reported by Dias et al. (2011). According to these authors, the climatic conditions inside and outside swine production facilities ensure the reinfection of animals, which is why deworming programs should be implemented intensively along the year. On the other hand, in countries with temperate climates, such as England, the occurrence of such lesions is concentrated in the second half of the year, coinciding with the summer and autumn seasons (JOACHIM et al., 2001). Therefore, since changes in climate may influence the development of the parasite's eggs in the environment, it is of paramount importance to understand the parasite's prevalence and epidemiology to ensure the success of measures adopted for its control (LAI et al., 2012).

The parasite *A. suum* is a persistent problem in swine herds located in the micro-region of Ponte Nova in the Zona da Mata region of the state of Minas Gerais, where it occurs continuously in subclinical form in pig production systems. However, this challenge is even greater at medium and small farms and in regions close to urban centers, and with higher animal housing densities. Thus, there is a need for a better understanding about the prevalence of this parasite in the herd and to reassess the deworming protocols that have been used. The implementation of monitoring programs during the slaughter of pigs, based on data from post-mortem inspections, has proved to be an effective and inexpensive tool that allows for improvements and modifications in control and prevention measures. Such programs should therefore be adopted not only in the region of

this study but also in other regions of livestock production in the country, since they can contribute to the health of Brazilian swine herds.

Acknowledgements

The authors thank CAPES, CNPq and FAPEMIG for financial support.

REFERENCES

Alayande MO, Danmaigoro A. Occurrence of “Milk Spot” due to *Ascaris suum* on liver of pigs slaughtered at Zuru, Nigeria. *J Vet Adv* 2012; 2(8): 430-433.

Boes J, Kanora A, Havn KT, Christiansen S, Vestergaard-Nielsen K, Jacobs J, Alban L. Effect of *Ascaris suum* infection on performance of fattening pigs. *Vet Par* 2010; 172: 269–276.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) Divisão de Normas Técnicas; 2001.

Černek AOL, Prokeš1 M, Ondrejka R, Hurníková Z, Takáčová D. Monitoring of *Ascaris suum* in slaughter pigs during 2000 – 2009 in: *Slovakia Helminthol* 2012; 49(4): 221 – 224.

Dias AS, Tanure AM, Manhães HGVC. Ocorrência de *Ascaris suum* em suínos abatidos na Zona da Mata, Minas Gerais. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci* 2011; 48(2): 101-106.

D'alencar S, Farias MPO, Rosas EO, Lima MM, Aves LC, Faustino MAG. Influência do manejo higiênico-sanitário na infecção por helmintos gastrintestinais em suínos de granjas tecnificadas e de subsistência abatidos na Região Metropolitana de Recife e Zona da Mata do estado de Pernambuco, BRASIL. *Arq Insti Biol* 2011; 78(2): 207-215.

Fruet APB, Scortegagna A, Fabricio EDA, Kirinus JK, Dörr AC, Nörnberg JL. Perdas econômicas por condenação de órgãos suínos em matadouros sob

serviço de inspeção municipal. *Rev Eletr Gest Educ Tecnol Amb* 2013; 11(11): 2307-2312.

Garcia SK, Gonçalves JPM. Suinocultura mineira e sua defesa sanitária. *Rev V Z Minas* 2012; Jul./Ago./Set: 114.

Gardner IA, Willeberg P, Mousing J. Empirical and theoretical evidence for herd size as a risk factor for swine diseases. *Anim Health Res Rev* 2002; 3: 43–55.

Irgang R. Reposição de reprodutores suínos. Boletim Técnico nº 1 - Dezembro de 2002. Disponível em: <http://www.sossuinos.com.br/Tecnicos/biribas/boltec01dez 2002.htm>.

Joachim A, Dülmer N, Dauschies A, Roepstorff A. Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. *Vet Par* 2001; 96: 135–146.

Knecht D, Jankowska A, Zale'sny G. The impact of gastrointestinal parasites infection on slaughter efficiency in pigs. *Vet Par* 2012; 184: 291– 297.

Lai M, Zhou RQ, Huang HC, Hu SJ. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. *Res Vet Sci.* 2011; 91: 121–124.

Leles D, Gardner SL, Reinhard K, Iñiguez A, Araujo A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasit Vector* 2012; 5: 2.

Lippke RT, Kummer R, Marques BMFPPM, Mores TJ, Gonçalves MAD, Barcellos DESN. Monitoria sanitária em suinocultura. *Acta Sci Vet* 2009; 37: 133–146.

Mcgravin MD, Zachary JF. *Bases da patologia em veterinária*. 4 ed. Brasil: Editora Elsevier; 2009.

Piffer IA, Brito JRF. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice de classificação de rebanhos. Documentos 23. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA; 1990.

Roepstorff A, Mejer H, Nejsum P, Thamsborg SM. Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. *Vet Par* 2009; 180: 72– 81.

Sanchez-Vazquez MJ, Smith RP, Kanga S, Lewisa F, Nielen M, Gunna GJ, Edwards DAS. Identification of factors influencing the occurrence of *milk spot* livers in slaughtered pigs: a novel approach to understanding *Ascaris suum* epidemiology in British farmed pigs. *Vet Par* 2010; 173: 271–279.

Sanchez-Vazquez MJ, Nielen M, Gunn GJ, Lewis FI. National monitoring of *Ascaris suum* related liver pathologies in English abattoirs: a time-series analysis, 2005-2010. *Vet Par* 2012; 184: 83–87.

Sobestiansky J, Matos MPC, Souza CM. *Monitoria patológica de suínos em matadouros*. Goiânia: 2001

Stewart TB, Hoyt PG. *Internal parasites*. In: Straw EB, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor DJ (Eds.), *Diseases of Swine*, 9th ed. Blackwell Publishing; 2006. p.904–905.

CAPÍTULO 2

Atividade anti-helmíntica *in vitro* e efeitos do extrato aquoso da folha de *Piptadenia gonoachanta in vivo* sobre parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos de camundongos Balb/C

RESUMO

Piptadenia gonoacantha (Leguminosae-Mimosoideae) é uma espécie arbórea que habita predominantemente a região sul e sudeste do país. Sua ação antiparasitária foi demonstrada em bovinos, após administração do extrato aquoso 10%, produzido a partir das folhas da planta. Contudo, para que uma espécie vegetal seja utilizada com esta finalidade, é importante conhecer quais princípios farmacológicos estão presentes e avaliar sua toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Diante disso, este trabalho teve como objetivos determinar o perfil fitoquímico de diferentes preparações produzidas a partir do pó das folhas de *P. gonoacantha*, avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro*, em *Panagrellus* sp. e sua ação *in vivo*, sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos de camundongos Balb/C, tratados por via oral durante 10 dias consecutivos nas dosagens de 100, 200 e 400 mg.Kg⁻¹. Observou-se, após análise fitoquímica baseada em testes cromáticos e de precipitação, que as folhas de *P. gonoacantha* possuem metabólitos secundários, como taninos, flavonóides, cumarinas, saponinas, heterosídeos, compostos fenólicos e antraquinona, que possam atribuir às características anti-helmínticas a esta planta. Após 24 horas de incubação, todas as preparações e doses do extrato avaliadas apresentaram ação significativa ($p < 0,05$) sobre *Panagrellus* sp.. Além disso, o mesmo se mostrou seguro e com baixa toxicidade, de acordo com os parâmetros bioquímicos, histológicos e hematológicos avaliados, possibilitando o avanço para a realização de estudos clínicos em espécies-alvo.

Palavras-chave: análise fitoquímica, antiparasitário, extrato aquoso.

ABSTRACT

Piptadenia gonoacantha (Leguminosae-Mimosoideae) is a tree species that predominantly inhabits the south and southeast of the country. Its antiparasitic action was presented in cattle after administration of the aqueous extract 10%, produced from the leaves of the plant. However, for a species to be used for this purpose, it is important to know which pharmacological principles are present and evaluate their toxicity *in vitro* and *in vivo*. Thus, this study aimed to determine the phytochemical profile of different preparations produced using the powder obtained from the leaves of *P. gonoacantha*, evaluate the anthelmintic activity *in vitro*, on *Panagrellus* sp. and its action *in vivo*, on the biochemical, hematological and histological parameters of BALB / C mice treated with aqueous extract produced from the leaves of the plant, orally, for 10 consecutive days, at dosages 100, 200 and 400 mg. kg⁻¹. According to the phytochemical analysis based on chromatography tests and subsequent precipitation, *P. gonoacantha* have in their leaves secondary metabolites such as tannins, flavonoids, coumarins, saponins, heterosides, phenolics and anthraquinone that can be allocated to anthelmintic characteristics of this plant. After 24 hours incubation, all preparations and evaluated extract dosages showed significant efficacy ($p < 0.05$) on *Panagrellus* sp. Moreover, it proved to be safe with low toxicity according to the biochemical, histological and hematological parameters evaluated, allowing advance for clinical studies in other target species.

Keywords: phytochemical analysis, antiparasitic, aqueous extract

1. INTRODUÇÃO

O interesse na utilização de compostos bioativos de plantas, responsáveis por ações terapêuticas, tem sido uma área de pesquisa crescente (Sandoval-Castro et al., 2012; Viegas et al. 2006). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) 85% da população de países emergentes fazem uso de plantas medicinais, no estado *in natura* ou em formulações fitoterápicas.

Contudo, para que uma espécie vegetal seja utilizada com esta finalidade, é importante conhecer quais princípios farmacológicos estão presentes e se as mesmas possuem componentes tóxicos que tragam riscos para a saúde animal e humana (Carvalho et al., 2014a; Simões et al., 2004). Para isso, sua ação precisa ser comprovada por meio de testes *in vitro* e *in vivo* (Mellor, 2000).

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma imensa variedade de medicamentos nos últimos anos, tem-se observado um aumento de microrganismos resistentes as estas drogas, o que incentiva a busca por fontes alternativas, como substâncias fitoterápicas com ação antimicrobiana (Padilha et al., 2010; Ribeiro, 2008).

Piptadenia gonoacantha (Leguminosae-Mimosoideae) é uma espécie arbórea que habita predominantemente a região sul e sudeste do país. A mesma também tem sido descrita em alguns estados da região norte e nordeste. Esta espécie é facilmente identificada por suas asas lenhosas longitudinais repletas de acúleos presente no tronco e nos galhos. Isto lhe confere nomes vulgares como: pau jacaré, jacaré, casco de jacaré, dentre outros (Carvalho et al., 2010). Trabalhos fitoquímicos têm identificados diversos compostos presentes nas folhas dessa planta como antraquinonas, compostos fenólicos, taninos, saponinas, cumarinas e flavonóides (Carvalho et al., 2010; Carvalho et al., 2014). A presença desses compostos tem sido relacionada com propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianase antiparasitárias.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo determinar o perfil fitoquímico de diferentes formulações utilizando o pó obtido a partir das folhas de *P. gonoacantha*, bem como avaliar sua atividade anti-helmíntica *in vitro* em *Panagrellus* sp.e sua ação *in vivo* sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos de camundongos Balb/C, após administração oral do extrato aquoso, por dez dias consecutivos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Material vegetal e preparação dos extratos*

Foram coletadas 1000g de folhas frescas de *P. gonoacantha* em Viçosa, localizada no estado de Minas Gerais - Brasil, latitude 20°45'14"S e longitude 42°52' 55"W, no mês de novembro de 2014, na estação primavera. O material foi identificado e depositado no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa (UFV), exsicata nº 35.530. Estas foram selecionadas, limpas e secas em estufa a 40°C com circulação de ar forçada, por três dias para desidratação. Após secagem, o material vegetal foi triturado em moinho de facas (Marconi modelo 340), como descritos por Carvalho (2012). O extrato aquoso foi preparado de três formas diferentes. Preparação I: maceração (EAM): 20g do pó seco da planta diluído em água destilada (200mL) durante 1 h à temperatura ambiente. Preparação II: ultrassonicação (EAU): realizada segundo Carvalho et al. (2011), com modificações: 20 g do pó seco da planta, foi submetido à extração assistida por ultra-som (Unique® - MaxiClean 1400), em água (200mL) durante 1 h a 40 °C. As preparações I e II foram filtradas à vácuo em filtro qualitativo, para obtenção máxima da solução e remoção da matéria seca. Preparação III: liofilização (EAL): 200mL do extrato obtido na preparação II, após filtração, foi liofilizado, até total desidratação e em seguida ressuspenso em água destilada autoclavada, completando um volume final de 200mL.

2.2. *Testes fitoquímicos*

Os aspectos fitoquímicos foram realizados nos extratos aquosos produzidos a partir das folhas da planta. O mesmo foi submetido a uma série de reações de caracterização de classes de compostos secundários presentes como: naftoquinona (reação ácido/base), caracterização de flavonóides (reação de cianidina e ácido sulfúrico), taninos (reação com sais de ferro, precipitação de proteínas), cumarinas (observação sob a luz ultravioleta), compostos fenólicos (reação de Fólin-ciocalteau), triterpenos e esteroides (reação de Liebermann-Burchard), identificação de heterosídeos cardiotônicos (teste de Baljet e teste de Kedde) e caracterização de saponinas (reação de Lieberman-

Buchard e índice de espuma), identificação de presença de alcaloides pelos reagentes Mayer, Hager e Gragendorff segundo metodologia descrita em Simões et al. (2000). A prospecção fitoquímica foi realizada em triplicata. Todos os testes utilizados são baseados em reações cromáticas e de precipitação (Simões et al., 1999).

2.3. Ensaio de mobilidade em helmintos

O ensaio de motilidade foi realizado segundo Cunha et al. (2003). O conteúdo das placas de Petri contendo meio de cultura aveia-água, infestadas com *Panagrellus* sp., foram removidos, embrulhados em gaze cirúrgica e colocado sobre o topo de um copo griffin, cheio com água da torneira à temperatura ambiente. Após 12 h, o sedimento contendo os *Panagrellus* sp. foi recuperado no fundo do copo e lavado três vezes com água destilada, por centrifugação a 250 g, durante 5 min a 20°C. *Panagrellus* sp. ativos e inativos foram identificados e contados sob microscopia óptica (modificado de Barçante et al., 2003). Em placas de cultura, com 24 poços, foram colocados 0,5 mL da suspensão de nematóides (2000 *Panagrellus* sp.) e 1,5 mL do extrato de *P. gonoacantha*, em diferentes concentrações (25, 50 e 100 mg/mL) e preparações (I, II e III). Como controle positivo, utilizou-se fembendazol 2%, e como controle negativo, água destilada. Foram realizadas seis repetições para cada preparação. As contagens do número de larvas vivas e mortas foram realizadas após 24, 48 e 72 h de incubação, em alíquotas de 100 µL. Consideraram-se indivíduos mortos aqueles sem motilidade. No teste com os *Panagrellus* sp., os resultados obtidos foram convertidos em percentagem.

2.4. Animais

Camundongos, fêmeas adultas, com cerca de 60 dias de idade (25-35 g) foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Os animais foram mantidos, em condições ambientais controladas (temperatura: 22-24 °C; ciclo luz/escuro de 12 horas), com ração comercial própria para a espécie (PRESENCE®) e água *ad libitum*, no Departamento de Veterinária da mesma instituição. Durante os sete primeiros dias, os mesmos permaneceram em processo de adaptação na área experimental. O protocolo de

experimentação utilizado nesse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética com o Uso de Animais da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – CEPEUA/FACISA, sob número de protocolo 106/2014-II (Anexo I). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos testes e controle, totalizando 5 grupos, com cinco animais cada e confinados em caixas coletivas. Os grupos 1, 2, 3, 4 e 5 receberam por via oral, uma vez ao dia, respectivamente, Ivermectina 1% ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, dose única; controle positivo), água destilada (controle negativo), extratos aquosos da folha de *P. gonoacantha* (preparação II), nas doses de 100, 200 e 400 mg.kg^{-1} , durante 10 dias consecutivos. Após esse período, os animais foram induzidos com indometacina (30 mg.kg^{-1}), intraperitoneal e eutanasiados por sobredose anestésica de tiopental sódico para coleta de sangue, intestino, fígado e rim.

2.5. Análise hematológica e bioquímica

A coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca, utilizando-se agulhas e seringas e tubos de micro-hematócrito. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio de um analisador automático de células hematológicas Human Count (Human do Brasil LTDA[®]). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços corados com corante de Romanowsky. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas. Os esfregaços sanguíneos foram analisados em microscópio Olympus (objetiva 40X). Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a $1.183,3425 \text{ g}$ durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros uréia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (FA), proteínas totais e triglicerídeos. Os ensaios foram realizados em aparelho automático HumaStar 300 (Human do Brasil LTDA[®]) com sistemas comerciais da Labtest[®].

2.5. Análise histopatológica

Após a necrópsia, os órgãos (intestino, fígado e rim) foram removidos, lavados com solução salina (0,9%) e fixados em solução a 10% de formol neutro tamponado, por 24 horas. Após esse período, o material foi submetido às técnicas histológicas, desde a desidratação na série crescente de álcoois 70, 80, 90 e 100%, até a inclusão em parafina histológica purificada (ponto de fusão entre 56 e 60° C). Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação manual (Americal Optical Company[®]), com espessura de 5µm e os cortes teciduais corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) (Grimaldi Filho, 1981). No fígado foram analisados os parâmetros: infiltrado inflamatório, vacuolização, hiperemia, fibrose, degeneração e necrose. No rim avaliou-se: fibrose e hiperemia renal; esclerose, infiltrado e retração glomerular; infiltrado, necrose e degeneração tubular. E no intestino, foi avaliada a presença de edema, hiperemia e infiltrado inflamatório. Em todos os órgãos foram considerados os escores de 0 a 3, de acordo com o tamanho da área do fragmento comprometida sendo: grau 0 (sem lesão); grau 1 (lesão discreta – até 25%), grau 2 (lesão moderada - 25 a 50%) e grau 3 (lesão acentuada - 50%) (modificado de Biondo-Simões et al., 2006). As interpretações histológicas foram realizadas por dois examinadores, sem conhecimento prévio dos grupos em estudo. A análise histológica foi realizada no Laboratório de Patologia do Departamento de Veterinária/UFV e as fotos foram tiradas e documentadas no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Medicina e Enfermagem/UFV, em microscópio de luz BX 41 (Olympus, Tóquio, Japão[®]) com objetivas 4X, 10X, 40X e 100X.

2.7. Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variâncias. Sendo cumpridas as premissas, realizou-se a ANOVA; caso contrário, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Como teste *post-hoc*, foi empregado o Student-Newman-Keuls. Todos os testes foram realizados no programa Sigma Plot, versão 11.0, considerando o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise fitoquímica das três preparações utilizando as folhas da espécie *P. gonoacanthae* os respectivos testes utilizados, estão na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados da prospecção fitoquímica dos Extratos Aquosos produzidos a partir das folhas de *Piptadenia gonoacantha*.

Fitoquímico	Teste	EAM	EAU	EAL
Alcalóides	Dragendorff	-	-	-
	Hager	-	-	-
	Mayer	-	-	-
Antraquinona	Borntrager	+	+	+
	Acetato de magnésio	+	+	+
Cumarinas	Hidróxido de potássio	+	+	+
Compostos fenólicos	Fólin-ciocalteau	+	+	+
	Flavonóides	Cloreto de alumínio	+	+
	Cloreto férrico	+	+	+
Heterosídeos	Baljet	+	+	+
Cardiotônicos				
Taninos	Acetato de chumbo	+	+	+
Saponinas	Liebermann-burchard	+	+	+

EAM: pó de *P. gonoacantha* macerado em água (Preparação I a 10%); **EAU:** extrato aquoso de *P. gonoacantha* (Preparação II a 10%); **EAL:** extrato aquoso de *P. gonoacantha*, liofilizado e ressuspendido em água destilada. Preparação III a 10%); (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo.

Foi possível detectar os mesmos compostos químicos nas três preparações da folha da planta. Dessa forma, a análise fitoquímica revelou a presença de flavonóides, compostos fenólicos, taninos, antraquinona, saponinas, cumarinas, heterosídeos e cardiotônicos. Contudo, é importante ressaltar que todos os testes utilizados foram qualitativos, ou seja, quantidade presente de cada composto não foi detectada.

Carvalho et al., (2014), ao avaliarem compostos hidroalcolólicos extraídos da folha da planta, encontraram os mesmos compostos químicos, corroborando com os resultados aqui apresentados. Segundo Leão (2007), tais compostos

são denominados metabólitos secundários e estão relacionados com a defesa química da planta, garantido sua sobrevivência no habitat natural. Além disso, os mesmos apresentam uma ampla diversidade e sua presença em determinada solução irá depender do processo de extração e solução extratora utilizada (Alawa et al., 2003). Normalmente soluções hidroalcoólicas são mais eficientes no processo de extração do que as soluções aquosas, por serem capazes de solubilizar compostos com alta e baixa polaridade (Chaicouski et al., 2014). Já as preparações aquosas permitem somente a obtenção de compostos de alta solubilidade como heterosídeos, taninos e alcalóides (Fonseca et al., 2005). Contudo, este último composto não foi encontrado no presente trabalho.

Buscando avaliar propriedades nematocidas, a atividade citotóxica de diferentes preparações da folha de *P. gonoacantha* foi avaliada *in vitro* sobre *Panagrellus* sp., por meio do ensaio de mobilidade. Apesar de não se tratar de um parasita animal, estes foram utilizados como modelo experimental pelo fato de poderem ser mantidos e multiplicados em laboratório (Katiki et al., 2011). Se as preparações avaliadas forem eficazes em baixas concentrações, é possível acreditar que as mesmas possuam atividade anti-helmíntica contra demais espécies de nematóides (Thompson et al., 1996).

Após 24 horas de incubação, o extrato apresentou ação sobre os *Panagrellus* sp., em todas as preparações (I, II e III) e concentrações avaliadas e foram igualmente capazes de inibi-las, quando comparadas com os grupos controles ($p < 0,05$). Em valores absolutos, o EAPG na concentração de 50mg/mL apresentou maior percentual de inibição, chegando a 99,88%. Demais concentrações: 25, 50 e 100mg/mL da preparação I (EAM), 25 e 100mg/mL da preparação II (EAU) e 25, 50 e 100mg/mL da preparação III (EAL), apresentaram percentual de inibição de 93,93%, 99,39%, 96,15%, 96,57%, 96,45%, 95,01%, 99,74% e 99,44% respectivamente (Figura 1).

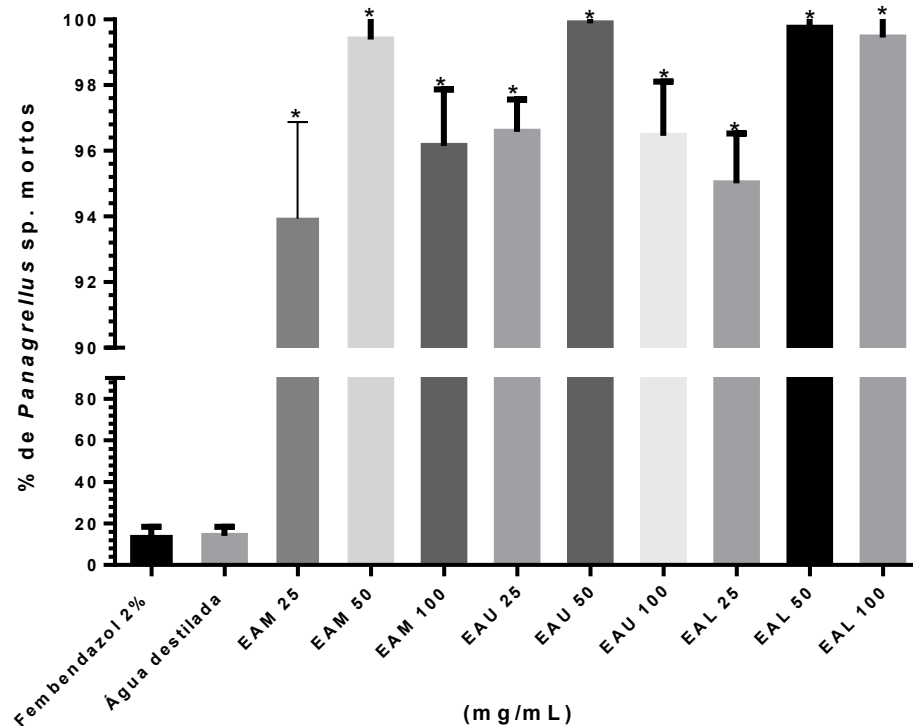


Figura 1: Ensaio de mobilidade: ação do extrato aquoso produzido a partir de folhas de *Piptadenea gonoacantha* sobre *Panagrellus* sp., após 24 horas de incubação. **EAM:** pó de *P. gonoacantha* macerado em água; **EAU:** extrato aquoso ultrassonicado de *P. gonoacantha*; **EAL:** extrato aquoso de *P. gonoacantha*, liofilizado e ressuspendido em água destilada. Colunas representam os valores médios e desvio padrão (n=6). *p<0,05: diferença significativa quando comparada com os grupos controle. Teste Kruskal-Wallis e com teste *post hoc* Student-Newman-Keuls.

Avaliando os tipos de preparações, a preparação I apresenta-se como uma alternativa eficiente, acessível e barata para ser utilizada no controle de helmintos. A suspensão do pó de plantas medicinais em água é uma prática comumente empregada na medicina popular e a utilização dessas plantas como vermífugos naturais vem ganhando espaço, como método alternativo, sustentável e de fácil adaptação para comunidades rurais (Bizimenyera et al., 2006; Fonseca et al., 2005; Alawa et al., 2003). Contudo, visando uma formulação para produção industrial e em larga escala, o extrato liofilizado é a técnica aceitável por proporcionar maior estabilidade física, química e microbiológica e facilitar a homogeneização e padronização dos princípios ativos (Runha et al., 2001; Chaicouski et al., 2014).

A maior parte dos *Panagrellus* sp., presentes no controle negativo apresentou-se viável durante toda a avaliação, ou seja, após 72 horas (Figura 2a). Em contrapartida, todas os *Pangrellus* sp. que entraram em contato com o extrato, apresentaram uma pequena perfuração na membrana, que resultou em um extravasamento pontual do conteúdo interno e que, possivelmente, provocou a morte dos mesmos (Figura 2b). Leituras realizadas após 48h de interação permitiram observar uma fragilidade da membrana, em toda a extensão dos *Panagrellus* sp., que estavam em contato com o extrato (Figura 2c) e também que não houve diferença entre preparações e concentrações utilizadas, uma vez que 100% foram eliminadas. Após esse período, *Panagrellus* sp., utilizados no controle positivo tornaram-se inviáveis, após 48 horas, pois o fenbendazol dissolveu a cutícula, impossibilitando a avaliação e contagem das mesmas (Figura 2d).

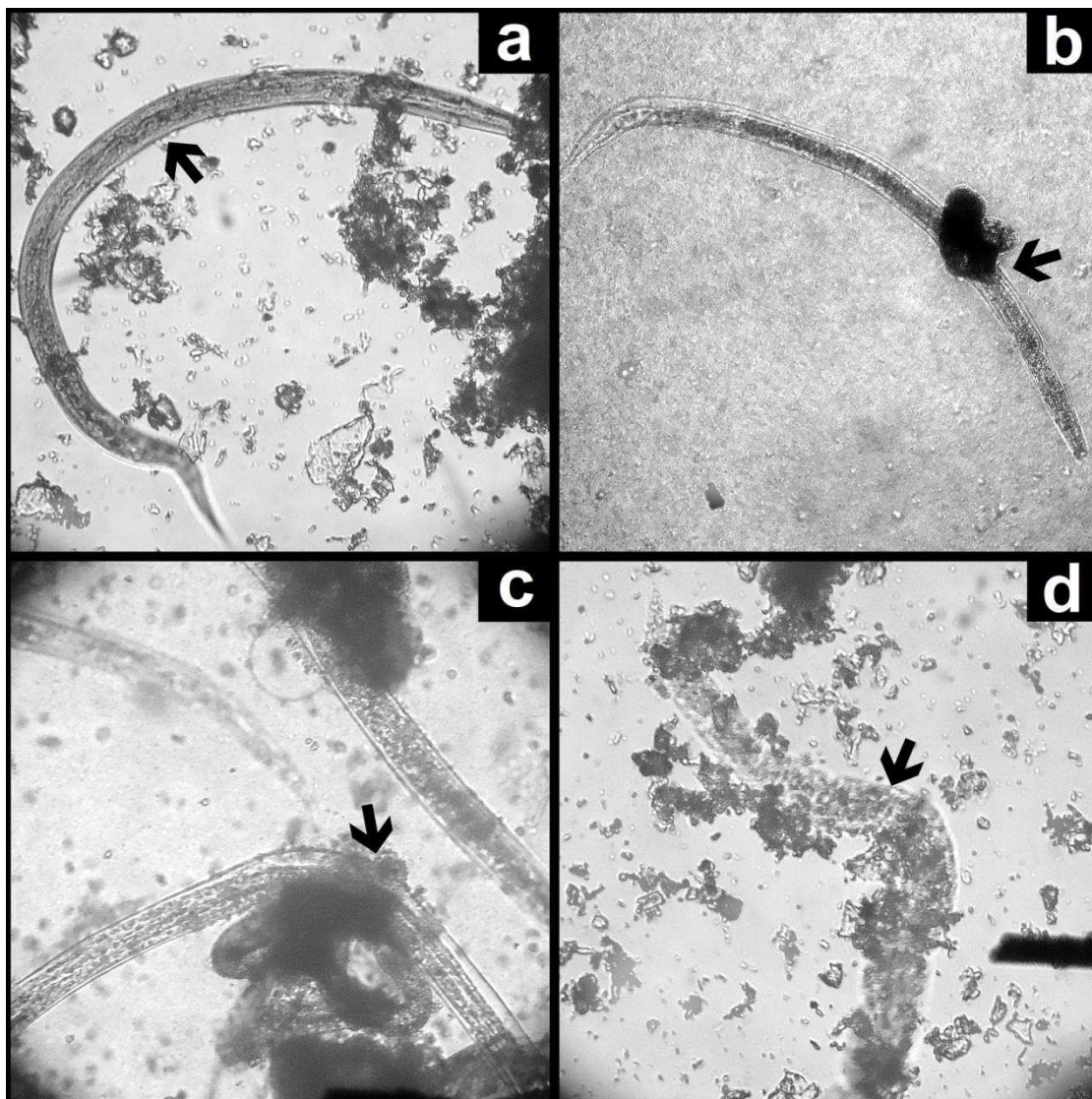


Figura 2: Ação do extrato aquoso ultrassonicado (EAU - 50 mg/mL) sobre *Panagrellus* sp.. (a) *Panagrellus* sp. após 48 horas de incubação (controle negativo – água destilada). (b) *Panagrellus* sp. após incubação por 24 horas. (c) *Panagrellus* sp., após incubação por 48 horas. (d) Ação do fenbendazol 2%, sobre *Panagrellus* sp., após incubação por 48 horas. (a, c e d: lentes objetivas de 40x ; b: objetiva de 10x).

No presente estudo, o extrato utilizado foi capaz de inibir com eficiência *Panagrellus* sp. Cunha et al., (2003), ao verificar a ação do extrato em metanol, obtido a partir das folhas de *Leucaena leucocephala*, pertencente a mesma família da *P. gonoacantha* (Leguminosae - Mimosoideae) verificaram indução da mortalidade em 98,69% dos *Panagrellus redivivus* utilizados. No mesmo trabalho, o extrato foi submetido ao fracionamento, que indicou que a substância nematicida produzida por *L. leucocephala* era um alcalóide. Silva et al. (2013) também associaram a presença de alcalóides com a destruição e inviabilização

de larvas de parasitos intestinais no ambiente. Dessa forma, apesar desse composto não ter sido encontrado na análise fitoquímica realizada nesse trabalho, sua presença nas folhas da *P. gonoacantha* não pode ser descartada, uma vez sua ausência pode ser decorrente do processo e de extração utilizado.

A ação nematicida apresentada nesse trabalho é a produção de taninos pela folha. Na sua forma condensada, taninos possuem a capacidade de se ligar e alterar propriedades físico-químicas de proteínas (Hoste et al., 2006). Visto que a cutícula dos parasitos é rica em prolina e hidroxiprolina, não apenas em toda a extensão do corpo, mas também na cavidade bucal, esôfago, cloaca e vulva, tal habilidade pode justificar mudanças cuticulares observadas em trabalhos utilizando microscopia eletrônica, após o contato do nematóide com essa substância (Thompson et al., 1995; Santos et al., 2013). A ação nematicida dos taninos é a capacidade de se ligarem e inibirem proteínas enzimáticas envolvidas em atividades secretórias, excretórias e metabólicas, essenciais para a vida do nematóide (Athanasiadou et al., 2001). Contudo, de acordo com Githiori et al. (2005), essa ação pode variar de acordo com a espécie da planta, do parasita e do hospedeiro envolvido.

Assim como os taninos, flavonóides também podem estar relacionados com a atividade anti-helmintica (Bastos et al., 2013; Silva et al., 2013; Silva et al. 2009; Fonseca et al., 2005). Estes são compostos heterosídeos e constituem um grande grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza (Arantes et al. 2005). Possuem a capacidade de formar complexos com proteínas extracelulares solúveis e também, devido ao seu caráter lipofílico, promover a ruptura na membrana de diversos microrganismos, entre eles os parasitas (Sartori, 2005).

Diante disso, a avaliação do efeito nematicida das folhas de *P. gonoachanta* deve ainda ser objeto de pesquisas futuras, visando fracionar e quantificar os compostos químicos obtidos em diferentes formas de extração, a partir de folhas da planta e verificar se essa atividade depende de um único princípio ativo ou do conjunto de várias substâncias e suas concentrações (Júnior et al., 2008). Além disso, trabalhos utilizando microscopia eletrônica poderão auxiliar no entendimento sobre o mecanismo

de ação desses compostos, especialmente sobre a membrana destes organismos (Hoste et al.,2006).

A toxicidade da planta também foi avaliada *in vivo* por meio da análise dos parâmetros bioquímicos de camundongos tratados por via oral, durante 10 dias consecutivos, com diferentes concentrações do extrato aquoso produzido a partir das folhas de *P. gonoachanta* e não foram verificadas alterações significativas ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores bioquímicos médios de camundongos BALB/C, tratados com diferentes doses extrato aquoso obtido das folhas *Piptadenia gonoacantha*, administrado via oral durante 10 dias consecutivos.

Parâmetros	EAU				
	Ivermectina 1% (n=5)	Água (n=5)	100mg/kg (n=5)	200mg/kg (n=5)	400mg/kg (n=5)
ALB (mg/dL)	4,92± 0,64a	5,1± 0,76a	8,44± 2,36a	5,54± 0,75a	6,42± 0,87a
AST (U/L)	349,5± 185,18a	418,2± 61,42a	443± 90,67a	450,4±24,72a	471,6±76,66a
ALT (U/L)	130,8± 43,77a	96± 10,98a	77,8± 8,95a	82,8± 21,07a	103,2± 23,41a
COL (mg/dL)	123,42±30,65a	125,4± 15,45a	100,2± 43,77a	138,8± 37,04a	93,6± 22,02a
FAL (U/L)	85,62± 27,10a	31,58± 6,56a	70,02± 23,28a	83,28±32,57a	53,86±14,80a
TRI (mg/dL)	193,8± 25,18a	117,75± 3,97a	191,2± 287,58a	119± 9,23a	117,8±17,96a
URE (mg/dL)	85,2 ± 12,88a	66,6± 15,85a	50,8± 5,22a	56,8± 11,69a	50,2± 4,74a

ALB: albumina. AST: aspartato aminotransferase. ALT: alanina aminotransferase. COL: colesterol total. FAL: fosfatase alcalina. TRI: triglicerídeos. URE: uréia. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados no experimento (n=5). n representa o número de animais em cada grupo. Teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls Method comoteste *post hoc*, $p < 0,05$.

Comparando os valores bioquímicos, com os disponíveis na literatura, referentes a animais da mesma espécie, idade, sexo e linhagem, foi possível verificar que os valores encontrados no presente trabalho, encontram-se acima dos demais (Spinelli et al., 2012; Almeida et al., 2008). Contudo as variações

intraespécies podem ser justificadas por diferenças nas condições sanitárias, de manejo, bem como no tipo de metodologia experimental adotada (Santos et al., 2010). Assim, estes poderiam ser comparados caso o Biotério de origem tivesse seus próprios intervalos de referência estabelecidos (Hooper et al., 2009).

Considerando valores absolutos verificou-se um aumento nos níveis de uréia, triglicérides e ALT entre os animais do grupo tratado com Ivermectina 1%, em comparação com os animais dos demais grupos.

Dentre as transaminases, ALT é a mais específica para avaliar danos hepáticos (Giannini et al., 2005). Uma vez que o fígado é o principal órgão de degradação da droga, a mesma pode provocar danos à membrana dos hepatócitos promovendo o aumento nos níveis da enzima (Rocha et al., 2012). Contudo, de acordo com Qureshi et al. (2013), as alterações bioquímicas induzidas pela ivermectina, são de difícil explicação e estão associadas aos mecanismos responsáveis por sua atividade antiparasitária.

Na avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue, por meio do hemograma, verificou-se um aumento ($p < 0,05$) na contagem de eritrócitos no sangue dos animais pertencentes aos grupos 2 e 3, tratados com 200 e 400mg/kg do extrato, respectivamente, quando comparados com animais dos demais grupos. Já comparando os valores de HCM, a diferença foi entre os animais pertencente ao grupo controle negativo e o grupo tratado com ivermectina 1%, em relação aos animais dos demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3: Valores hematológicos médios de camundongos BALB/C, tratados com diferentes doses extrato aquoso obtido das folhas *Piptadenia gonoacantha*, administrado via oral durante 10 dias consecutivos.

Parâmetros	EAU				
	Ivermectina 1% (n=5)	Água (n=5)	100mg/kg (n=5)	200mg/kg (n=5)	400mg/kg (n=5)
Hemácias (mm³)	8,27±1,66a	8,76±0,24a	8,62±0,38a	10,18±0,47b	9,83±0,30b
Hematócrito (%)	40,21±9,64a	47,43±1,79a	42,91±1,90a	50,52±2,86a	48,95±1,96a
Hemoglobina (g/dL)	11,75±2,68a	14,15±0,60a	13,10±0,53a	14,25±0,22a	13,87±0,44a
CHCM (%)	25,83±5,73a	29,90±0,76a	30,53±0,58a	28,36±1,08a	28,42±0,68a
HCM (pg)	12,78±2,75a	16,18±0,73b	15,2±0,28b	14,02±0,45a	14,11±0,25a
VCM (fL)	43,37±10,06a	54,16±2,51a	50±1,37a	49,5±1,15a	49,87±1,20a
Leucócitos totais (mm³)	3,00±0,78a	3,57±0,76a	2,58±0,19a	2,84±0,22a	3,81±0,13a
Linfócitos (%)	84±2,03a	80,66±1,32ab	80,37±3,26ab	80,62±1,58ab	76±2,58b
Segmentados (%)	12,5±1,46a	16,83±1,91a	19,12±6,58a	15,75±1,80a	20±3,07a
Monócito (%)	3,25±0,81a	2,88±0,24a	2,62±0,74a	3,37±1,14a	4,25±0,67 ^a

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados no experimento (n=5). n – representa o número de animais em cada grupo. Valores seguidos por letras distintas na linha diferem entre si. Teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls Method comoteste *post hoc*, p<0,05.

Os valores encontrados estão dentro dos padrões de referência estabelecidos por Spinelli et al. (2012). Apesar da diferença, segundo Santana et al. (2013), reduções nos níveis de hemoglobina, hemácias e hematócrito podem indicar anemia, hemorragia recente ou retenção de líquido e levam a hemodiluição. Contudo, Smith e Scherman (1994) afirmam que para ser considerada anemia, a diferença observada no eritrograma deve ser acompanhada também da diminuição nos valores referentes a proteínas plasmáticas.

Dessa maneira, a provável hipótese para justificar tais alterações no presente trabalho, é o processo de hemólise ocorrido em algumas amostras durante a coleta. Como regra geral, a hemólise, libera o conteúdo eritrocitário, provocando alteração nos resultados (Vieira et al., 2002).

Houve também diferença ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos, quando comparados aos animais pertencentes a grupo tratado com Ivermectina 1% e com EAPG 400mg/kg. Animais tratados com a droga apresentaram uma maior quantidade dessas células. Segundo Bonamin & Paulino (1996), medicamentos como o levamisol e o ivermectina podem ser utilizados como imunomoduladores, por serem capazes de promover um aumento na indução da proliferação de linfócitos T, aumento da quimiotaxia e da atividade fagocítica.

Por outro lado, a diminuição destas células no grupo tratado com a maior dose do extrato, pode ser explicada, segundo, Melo et al. (2008), pela maior quantidade de taninos ingerida pelos animais, uma vez que este composto responsável pela diminuição no número total de linfócitos. Além disso, a atividade anti-inflamatória de extratos hidroalcoólicos produzidos a partir das folhas da planta já foi previamente demonstrada em estudos realizados por Carvalho et al., (2014), e poderia justificar a diminuição dessas células no sangue dos animais que ingeriram a maior quantidade do extrato. Finalmente, é importante considerar que, apesar de todos os animais terem sido submetidos às mesmas condições experimentais, os que ingeriram maior dose do extrato passaram por uma maior situação de estresse pelo volume fornecido. Uma vez que os linfócitos representam as principais células da linhagem branca do camundongo, sua diminuição pode ocorrer devido à ação de hormônios adrenocorticais liberados pelos animais em situação de estresse (Thrall, 2007).

Lesões histopatológicas significativas ($p < 0,05$) foram também encontradas somente nos animais tratados com a ivermectina 1%. Os animais pertencentes aos demais grupos, não apresentaram achados histopatológicos relevantes (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação histológica de camundongos BALB/C, tratados com extrato aquoso obtido das folhas de *Piptadenia gonoacantha*, administrado por via oral durante 10 dias consecutivos. Valores referentes à média dos escores encontrados.

	Parâmetros (Lesões)	EAU				
		Ivermectina 1% (n=5)	Água (n=5)	100mg/kg (n=5)	200mg/kg (n=5)	400mg/kg (n=5)
Fígado	Degeneração/necrose	0,2±0,2a	0,4±0,24a	1,6±0,4a	1,0±0,0a	1,0±0,0a
	Fibrose	0,6±0,24a	0,8±0,2a	1,4±0,24a	0,8±0,2a	0,6±0,54a
	Hiperemia	0,8±0,2a	0,4±0,24a	1,6±0,4a	1,0±0,31a	1,4±0,4a
	Infiltrado	2,4±0,24b	1,4±0,24a	1,6±0,4a	1,0±0a	1,4±0,54a
	Vacuolização	1,8±0,37b	0,4±0,24a	0,8±0,2a	1,6±0,24a	1,2±0,20a
Glomérulo	Esclerose	0,2±0,2a	0,4±0,24a	0,4±0,24a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
	Infiltrado	1,2±0,44b	0,0±0,0a	0,4±0,89a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
	Retração	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
Rim	Túbulos Infiltrado	0,6±0,4a	1,8±0,48a	1,2±0,48a	1,0±0,31a	2,0±0,44a
	Necrose/degeneração	1,4±0,24a	1,4±0,24a	1,0±0,44a	0,6±0,24a	0,6±0,24a
	Hiperemia	1,0±0,0b	0,0±0,0a	0,6±0,54a	0,4±0,54a	0,4±0,54a
	Fibrose	0,0±0,0a	0,2±0,2a	0,8±0,48a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
Intestino	Edema	0,6±0,24a	0,2±0,2a	0,4±0,24a	0,2±0,2a	0,6±0,24a
	Hiperemia	0,8±0,2a	0,2±0,2a	0,8±0,2a	0,6±0,24a	0,6±0,24a
	Infiltrado	1,0±0,31a	1,0±0,54a	0,4±0,24a	0,6±0,24a	1,0±0,31a

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados no experimento (n=5). n – representa o número de animais em cada grupo. Valores seguidos por letras distintas na linha diferem entre si (p<0,05). Teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls Method comoteste *post hoc*, p<0,05.

Animais tratados com a ivermectina 1%, apresentaram lesões significativas ($p < 0,05$) no fígado, caracterizada por vacuolização dos hepatócitos e presença de infiltrados inflamatórios, com predomínio de células polimorfonucleares, e no rim com a presença de infiltrado glomerular e hiperemia tubular. Já no intestino delgado, apesar de não significativa ($p > 0,05$), foi possível verificar ruptura da camada submucosa e descolamento da túnica muscular (Figura 3).

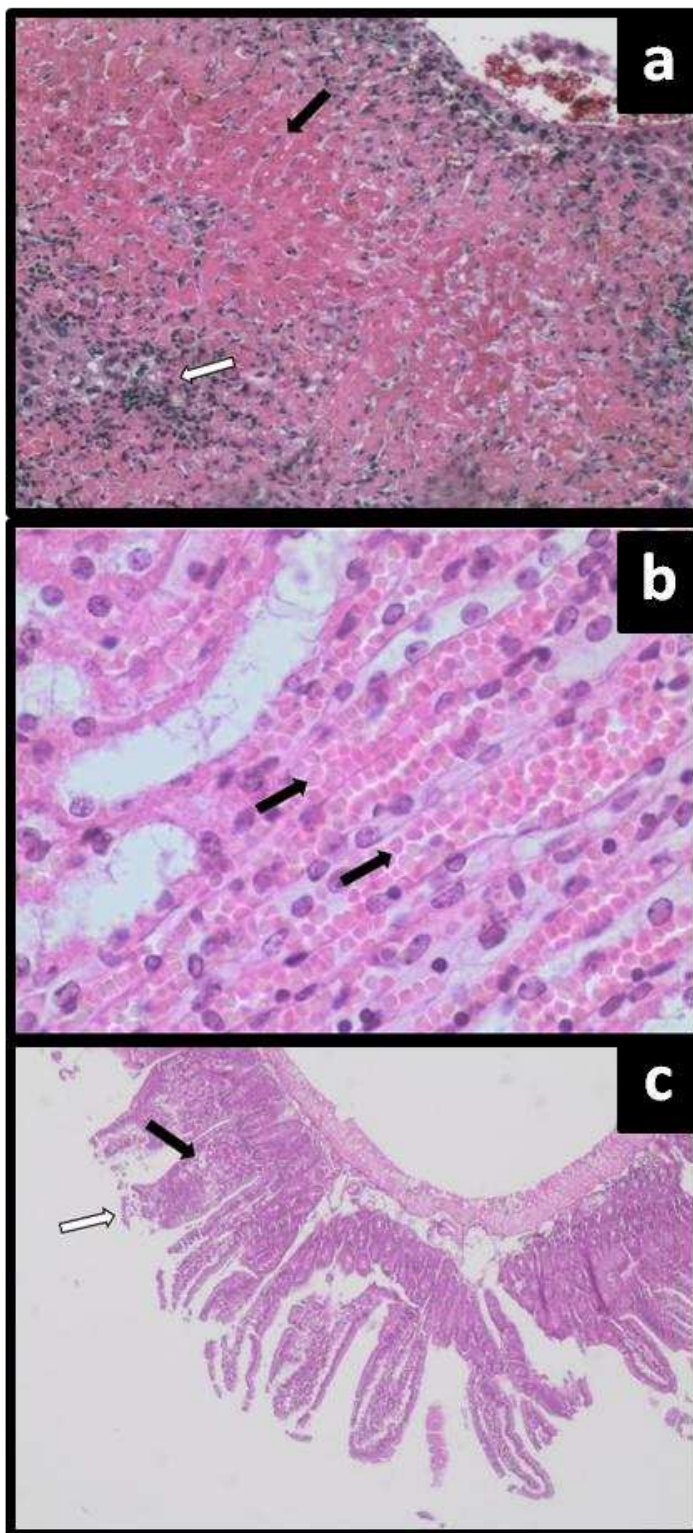


Figura 3: Fotomicrografias de órgãos de camundongos tratados com ivermectina 1%. **a)** Fígado com áreas de necrose evidenciada pela presença de feixes de hepatócitos com núcleos ausentes (seta preta), circundada por infiltrado inflamatório (seta branca) (x40). **b)** Região medular do rim com leitos capilares dilatados e repletos de hemácias indicando hiperemia (setas) (x200). **c)** Segmento intestinal com vilosidades dilatadas pelo infiltrado inflamatório (seta preta) e com o epitélio descontínuo (seta branca).

Lesões no fígado e intestino podem ser justificadas pelo fato da Ivermectina ser principalmente metabolizada nesses órgãos (Arise et al., 2012).

Em um estudo realizado por Arise et al. (2012), ratos tratados com uma combinação oral de Ivermectina e Albendazole também apresentaram um

aumento da população de células polimorfonucleares no fígado. Como o órgão é o principal local de detoxificação de drogas, a degradação da Ivermectina pode levar à produção e concentração de radicais livres, que ao se ligarem ao oxigênio podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio capazes de causar danos à membrana e proteínas, acarretando em um processo de vacuolização, morte e necrose celular (Dadarkar et al., 2007; Filho et al., 2006). Nos rins, a ivermectina 1%, pode causar inibição da excreção renal de diversas substâncias (Fricke et al., 1999). De acordo com Whelton et al., (1994), o mal funcionamento da filtração glomerular, promoverá a retenção de substâncias como a uréia, justificando o aumento dos seus níveis no soro desses animais.

Por outro lado, animais tratados com diferentes doses do extrato não apresentaram lesões significativas. Dessa forma, sugere-se que, embora nas doses estudadas, não houve ação sobre fígado, rim ou intestino após a administração aguda (10 dias consecutivos). É possível acreditar que isso se deve à presença de determinados metabólitos secundários que lhe confere à atividade antioxidante e anti-inflamatória, demonstrada em trabalhos anteriores (Carvalho et al., 2014; Pereira et al., 2010; Jain et al., 2008). Entretanto, estudos envolvendo a administração crônica do extrato aquoso produzido a partir das folhas de *P. gonoachanta* devem ser realizados, para que futuros testes clínicos, com espécies-alvo, sejam conduzidos.

4. CONCLUSÃO

De acordo com a análise fitoquímica, *P. gonoacantha* possui metabólitos secundários que possam atribuir características anti-helmínticas ao extrato aquoso produzido a partir das folhas de *P. gonoachanta*, dando suporte para sua utilização no controle de parasitoses gastrointestinais de animais. De acordo com os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, avaliados em diferentes formulações, a planta demonstrou ser segura e possuir baixa toxicidade após exposição aguda, possibilitando o avanço para a realização de estudos clínicos, a fim de comprovar possíveis benefícios em demais espécies-alvo.

REFERÊNCIAS

ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSIC, O.J.; ABDU, P. A.; CHIEZEY, N.P.; ALAWA, J.N.; BRWMAM, D.D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernoniaamygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v.133, p.73-81, 2003.

ARANTES, V.P. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.26, n.3, p.195-198, 2005.

ARISE, R.O.; MALOMO, S.O. Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. African Journal of **Biochemistry Research**, v.3, n.5, p.190-197, 2009.

ARISE R.O.; MALOMO S.O.; OYEWOLE O.I. Histological changes in selected tissues of ivermectin and/or albendazole treated rats. **International Journal of Toxicology and Applied Pharmacology**, v.2, n.1, p.1-5, 2012. Disponível em: <<http://www.urpjournals.com>>. Acesso em: 27 de jan de 2015.

ATHANASIADOU, S. Direct anthelmintic effects of condensed towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.205–219, 2001.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766p.

BASTOS, J.A.R.; PINTO, R.; PONTES, K.C.S.; FAUSTO, G.C.; CARVALHO, C.A.; SARAIVA, L.H.G. Tratamento Antiparasitário em Bovinos com Erva de Macaé (*Leonurus Sibiricus*) e Pau Jacaré (*Piptadenia Gonoacantha*) – Uma alternativa terapêutica. In: VI SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE, 6, 2014, Viçosa. **Anais...** Viçosa: FACISA, Outubro, 2014.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; ALCANTARA, E. M.; DALLAGNOL, J. C.; KELLY OKAMOTO YOSHIKUMI, K. O.; TORRESIV, L. F. B.; BORSATO, K. S. Cicatrização de feridas: estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.2, p.74-8, 2006.

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

BONAMIN, L.V.; PAULINO, C.A. Imunofarmacologia. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p.465- 476.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; SANTOS, L.F.L.; ROCHA, M.F.G.; BEVILAQUA, C.M.L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CARVALHO, M.G.; CARDOZO, M.A.; CATUNDA JUNIOR, F.E.; CARVALHO, A.G. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. An. **Academia Brasileira de Ciências**, v.82, p.561-567, 2010.

CARVALHO, C. A.; SANTANA, G.S.; AMARO, M. O. F.; LIMA, L.M.; PIRES, F.B.; PRÁ, V.D.; CARDOSO, S.A.; ROSA, M.B.; OLIVEIRA, L.L. Aspectos químicos e atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha* (FABACEAE). **Ciência e Natura**, v.36, p. 732-744, 2014a.

CHAICOUSKI, A.; SILVA, J.E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.16, n.1, p.33-41, 2014b.

CENCI, F.B.; LOUVANDINI, H.; McMANUS, C.M.; DELL'PORTO, A.; COSTA, D.M.; ARAÚJO, S.C.; MINHO, A.P., ABDALLA, A.L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally gastrointestinal helminthes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.132-137, 2007.

CUNHA, F.R.; F.R.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P. Extratos Vegetais com Propriedades Nematicidas e Purificação do Princípio Ativo do Extrato de *Leucaena leucocephala*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.4, 2003.

DADARKAR, S.S., DEORE, M.D.; GATNE, M.M. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, p.257-60, 2007.

FILHO, G.B.; BOGLIOLO, L. **Bogliolo Patologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.1472p.

FRICKER, A.; CUTMANN, H.; DROULLE, A.; DREWE, J.; MILLER, D.S. Epithelial transport of anthelmintic ivermectin: a novel model of isolated proximal kidney tubules. **Pharmaceutical Research**, v.16, p.1570-1575, 1999.

FONSECA, S.G.C. **Farmacocinética de Fitoterápicos**. 2005. Disponível em: <http://www.farmacotecnica.ufc.br/>. Acesso em: 22 de janeiro de 2015.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzymealteration: a guide for clinicians. **Canadian MedicalAssociation Journal**, v.172, p.367-79, 2005.

GITHIORI, J. B.; HOGLUND, J.; WALLER, P. J. Ethnoveterinary plant preparation as dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for future. **Animal Health Research Reviews**, v.6, p.91-103, 2005.

GRIMALDI, F. **Técnica Histológica**. Rio de Janeiro, RJ, 1981.

HOOPER, C.; JUSTEN, A.; OLIVEIRA, M.; FARIA, E.; LANNA, C.; RAMOS, S.; MAJEROWICZ, J. Valores Bioquímicos de camundongos da linhagem C57BL/6. In: Simpósio de Animais de laboratório, SBCAL, (2009).

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

ISHIKAWA, T.; KATO, E.T.M.; YOSHIDA, M.; KANEKO, T. M. Morphoanatomic aspects and phytochemical screening of *Plinia edulis* (Vell.)Sobral (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.515-20, 2008.

JÚNIOR, J. O. C. S.; VIEIRA, J.L.F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, p.671-677, 2006.

KATIKIA, L.M.; FERREIRA, J.F.S.; ZAJACC, A.M.; MASLERD, C.; LINDSAYC, D.S.; CHAGASE, A.C.; AMARANTE, A.F.T. Caenorhabditis elegans as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. **Veterinary Parasitology**, v.182, p.264– 268, 2011.

LEÃO, J.D.J. **Bioatividade de extratos vegetais no controle de *Sitophilus oryzae* (Linné, 1973) em arroz**. 2007, 91p.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J. Anti-ulcer drugs of plant origin In: **Progress in medicinal chemistry**. VI 28. Ed. G. P. Ellis and G. B. West. Elsevier Science Plubishers, 201-231, 1991.

LONGUI, E. L., Anatomia comparada do lenho de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F.Macbr. em dois tipos de vegetação. **Hoehnea**. São Paulo, v. 36, n.4, 2009.

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

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. **NutrHosp**, v.17, n.6, p.271-8, 2002.

MENDES, F.T. Fígado e drogas. In: Dani, R, Castro, LP. **Gastroenterologia clínica**. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, cap. 80, p.1035-1042.

MELO, M.M.; JÚNIOR, D.V.;PINTO, M.C.L.; SILVEIRA, J.B.; FERRAZ, V.; ECCO, R.; PAES, P.R.O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos.**Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.631-640, 2008.

MELLOR, S. Herbs and spices promote health and growth. **Pig Progress**, v.16, n.4, 2000.

MORIN, M. P.; BARROSO, G. M. Leguminosae arbustivas e arbóreas da Floresta Atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, sudeste de Brasil: Subfamílias Caesalpinoideae e Mimosoideae. **Rodriguésia**, v.58, n.2, p.423-468, 2007.

PEREIRA, B.S.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; VASCONCELOS, A.K.P.; PINHEIRO, A.D.N.; RODRIGUES, P.A. Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia* L. **Revista Brasileira Plantas Medicinai Botucatu**, v.12, n.3, p.311-316, 2010.

QURESHI, S. Biochemical Toxicity of Ivermectin in Wistar Albino Rats. **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, v.5, n.1, p.15-19, 2013.

ROCHA, A.O.B.; PITA, J.C.L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MOTA, C.A.X.; ESTEVAM, E.C.; VIANA, W. P., SÁ, R.C.S.; DINIZ, M. F. M. Efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.93, n.3, p.371-378, 2012.

RUNHA, F.P.; CORDEIRO, D.S.; PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.; OLIVEIRA, W.P. Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during operation. **Food and Bioproducts Processing**, v.79, Part C, September, 2001.

SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p101–107, 2005.

SANTANA, L.C.L.R.; BRITO, M.R.M.; SOUSA, G.F.; FREITAS, R.M. Propriedades físicoquímicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico padronizado a 70% das folhas de *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.15, n.4, supl. I, p.742-750, 2013.

SANTOS, M.R.V.; SOUZA, V.H.; MENEZES, I.A.C.; BITENCURT, J.L.; REZENDE-NETO, J.M. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scienta Plena**, v.6, nº1, p.1-6, 2010.

SANTOS, I.A.; SOUZA, F.J.M.A.; AKISUE, G.; COELHO, F.A.S.; COELHO, M.D.G. Avaliação da atividade ovicida e larvicida de dez extratos vegetais ante *Ancylostoma* spp.. **Revista de Patologia Tropical**, v.42, n.2, p.209-216, 2013.

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de fração de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**, 2005, 81p. Dissertação (Mestrado) Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina.

SIMÕES, C.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMÃO, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS, 2004. 821p.

SILVA, J.G.; PEREIRA, M.S.V.; GURGEL, A.P.D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SOUZA, I.A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.19, n.3, p.790-794, 2009.

SILVA, R.M.F.; GOMES, T.C.B.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA JUNIOR, J.O.C.; BARBOSA, W.L.R.; ROLIM NETO, P.J. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p.103-109, 2012b.

SIMÕES, C.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMÃO, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1999.

SIMÕES, C.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000, p.1104.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. **Goat medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994,620p.

THOMPSON, D.P.; GEARY, T.G. The structure and function of helminth surfaces. In **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites** (Marr, J.J. and Muller, M., eds), 1995, pp. 203–232, Academic Press.

THOMPSON, D.P.; KLEIN, R.D.; GEARY, T.G. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. **Parasitology**, v.113, p.217–238, 1996.

VARADY, M.; CERNANSKA, D.; CORBA, J. Use of two *in vitro* methods for the detection of anthelmintic resistant nematode parasites on Slovak sheep farms. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.325-331, 2006.

VIEIRA, J.G.H. Avaliação dos potenciais problemas pré-analíticos e metodológicos em dosagens hormonais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n.1, 2002.

WHEALTON, A.; WATSON, A.J.; ROCK, R.C. Colorimetric Determination of serum urea concentration. In **Tietz Textbook of Clin. Chem.** Burtis CA, Ashwood ER (eds.). WB Saunders Company London pp. 1528- 1531, 1994.

CAPÍTULO 3

Influência da solução de flutuação na realização do método de McMaster para a quantificação de ovos de *Ascaris suum* em fezes de suínos

RESUMO

Cinco soluções com densidades variando entre 1,20 e 1,27 (sulfato de magnésio, cloreto de sódio saturado, nitrato de sódio, sulfato de zinco e solução saturada de açúcar), foram avaliadas para realização da contagem de ovos de *Ascaris suum* em amostras de fezes de suínos, utilizando a câmara de McMaster. Para isso, amostras de fezes foram coletadas de suínos livres de parasitismo e inoculadas com ovos de *A. suum*, numa proporção de 2.000 ovos por grama de fezes. Todas as amostras foram avaliadas em quinze repetições, contendo dois gramas de fezes cada, utilizando câmaras de McMaster. O tipo de solução de flutuação utilizada influenciou significativamente nas contagens de ovos de *A. suum* obtidas. Todas as cinco soluções foram capazes de flutuar ovos, sendo que a solução de nitrato de sódio (densidade 1.20) foi mais eficiente do que as demais. As soluções de açúcar e sulfato de zinco foram as que recuperaram menor quantidade de ovos.

Palavras chave: *Ascaris suum*; contagem de ovos nas fezes; suínos.

ABSTRACT

In this work, five solutions with densities varying between 1.20 and 1.27 (magnesium sulfate, saturated sodium chloride, sodium nitrate, zinc sulfate and saturated sugar solution) were evaluated for the performance of *Ascaris suum* egg counts in pig feces samples using the McMaster chamber. For this, samples of feces were collected from pigs free of parasites and inoculated with a rate of 2000 *Ascaris suum* eggs per gram of feces. All samples were analyzed within fifteen repeats containing two grams each stool, using McMaster's chambers. The type of used floating solution significantly influenced in the obtained *Ascaris suum* eggs counts. All five solutions were capable of floating eggs, and sodium nitrate solution (density 1.20) was more effective than the

others (1533.33). The sugar and zinc sulfate solutions which were recovered minor amount of eggs. The factors related to the results obtained are discussed.

Keywords: *Ascaris suum*; faecal egg counts; swine

1. INTRODUÇÃO

Ascaris suum permanece como uma das principais espécies de parasitos do rebanho suíno brasileiro mesmo nos mais modernos sistemas de produção (Dias et al., 2011). Entretanto, frequentemente, em criações tecnificadas não são observados sinais clínicos evidentes do parasitismo, mas esses agentes causam perdas principalmente em leitões em crescimento (Nishi et al., 2000, Silva et al., 2011).

O monitoramento da carga parasitária nos rebanhos é uma medida indispensável para a manutenção da saúde dos animais de produção. Neste sentido, a análise microscópica de amostras de fezes para a detecção de ovos, larvas de parasitas, cistos e oocistos é o procedimento de diagnóstico mais utilizado, tanto na parasitologia veterinária quanto na humana. O método rotineiro para realizar a avaliação das infecções por helmintos gastrintestinais é baseado em técnicas de flutuação para contagem dos ovos presentes nas fezes dos animais (Foreyt, 2005).

As técnicas de flutuação fecal envolvem a separação dos ovos de helmintos, presentes no material fecal, por meio do uso de soluções, as quais possuem gravidades específicas que permitem a flutuação dos ovos para a superfície da suspensão (Pereckiene et al., 2007). Dentre estas técnicas, a técnica de McMaster é universalmente utilizada para observar estruturas parasitárias em fezes e estimar a carga parasitária de diferentes espécies animais. Esta técnica apresenta vantagens como a praticidade de realização e rapidez para a obtenção dos resultados. No entanto, na literatura muitas variações da mesma são descritas, existindo, portanto, a necessidade de padronização (Cringoli et al., 2004).

Fatores como a composição, gravidade específica e a viscosidade da solução de flutuação podem influenciar nos resultados da técnica de flutuação utilizada (Foreyt, 2005; Rehbein et al., 1999). Fernandes et al. (2005), citam a

utilização das soluções de açúcar, cloreto de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio e nitrato de sódio nas técnicas de McMaster, flutuação direta e centrífugo-flutuação. Contudo, não existe uma avaliação que compare a eficácia dessas soluções na realização das técnicas de flutuação para detecção de ovos de *Ascaris*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar distintas soluções saturadas preparadas com quatro sais diferentes (NaCl, MgSO₄, NaNO₃, ZnSO₄) e uma solução de açúcar, na realização da técnica de OPG (técnica de McMaster) em fezes de suínos, contaminadas com ovos de *A. suum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Soluções hipersaturadas

Soluções de açúcar (C₁₂H₂₂O₁₁), cloreto de sódio (NaCl), nitrato de sódio (NaNO₃), sulfato de magnésio (MgSO₄) e sulfato de zinco (ZnSO₄), foram preparadas seguindo o protocolo descrito em Foreyt, 2005 (Tabela 1). A viscosidade das soluções foi medida à 25 °C, com base em uma taxa de deformação de 100 s⁻¹ utilizando um reômetro de cilindros concêntricos tipo Searle, marca Brookfield, modelo R/S Plus.

Tabela 1- Composição, gravidade específica e viscosidade de soluções utilizadas para de flutuação de ovos de *Ascaris suum* a partir de fezes suínas, pela técnica de McMaster.

Solução de Flutuação	Composição	GE	Viscosidade
Solução de Açúcar	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , 454 g; H ₂ O 355 mL	1.27	3,42 mPas
Cloreto de Sódio	NaCl, 400g; H ₂ O, 1000 mL	1.2	2,14 mPas
Nitrato de Sódio	NaNO ₃ , 400g; H ₂ O, 1000 mL	1.2	1,37 mPas
Sulfato de Zinco	ZnSO ₄ , 371g; H ₂ O 1000 mL	1.18	1,92 mPas
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄ , 400g; H ₂ O 1000 mL	1.2	3,65 mPas

Legenda: mPas: Milipascal. GE: gravidade específica

2.2. Amostras fecais e ovos de *Ascaris suum*

Fezes de suínos previamente vermifugados, livres de helmintos gastrintestinais, foram coletadas da ampola retal. Os ovos de *Ascaris suum* foram obtidos por meio da dissecação de fêmeas adultas, as quais foram coletadas nas fezes de suínos naturalmente infectados.

2.3. Ensaio experimental

Fezes recém-coletadas foram inoculadas com solução aquosa contendo ovos de *A. suum*, na proporção de 2000 ovos férteis não embrionados por grama de fezes. O material foi então homogeneizado em copo Griffin e, subdividido em alíquotas de 2g, para a realização dos exames com as diferentes soluções. A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada em câmara de McMaster, de acordo com a metodologia descrita por Gordon e Whitlock (1939), utilizando as soluções previamente mencionadas. Para cada uma das soluções avaliadas, foram realizadas 15 repetições.

2.4. Análise estatística

Os dados foram tabulados, testados quanto à normalidade e homocedasticidade. Não atendendo as premissas da ANOVA, procedeu-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey utilizando o programa Sigma-Plot (versão 11.0), considerando-se o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das contagens de OPG em câmara de McMaster utilizando diferentes soluções estão descritas na tabela 2. Todas as soluções avaliadas foram capazes de flutuar ovos de *A. suum*, entretanto, o tipo de solução influenciou significativamente no número de ovos observados nas contagens

em câmara de McMaster. Mesmo para soluções com mesma densidade, foram observadas diferenças significativas.

Tabela 2. Valores médios de OPG (contagem de ovos por grama de fezes) obtidas em câmara de McMaster em função da GE (gravidade específica).

Solução de Flutuação	OPG	Ge	Viscosidade
Nitrato de Sódio	1533,33 ± 409,99a	1.2	1,37 mPas
Cloreto de Sódio	926,66 ± 321,75 ab	1.2	2,14 mPas
Sulfato de Magnésio	720 ± 174,02 b	1.2	3,65 mPas
Sulfato de Zinco	526,66 ± 284,01 b	1.18	1,92 mPas
Solução de Açúcar	480 ± 227,40 b	1.27	3,42 mPas

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Segundo Maff (1986), os ovos de *Ascarideos*, assim como o de alguns trematódeos, são mais pesados e maiores que ovos de estrogilídeos, necessitando de soluções com densidades mais elevadas para flutuar. Pereckiene et al. (2007) relatam melhor desempenho das soluções contendo açúcar com densidade de (1.27) em comparação com as soluções salinas com densidade de 1.20 para a flutuação de ovos de *Ascaris*.

Os resultados aqui obtidos com a solução de açúcar não estão de acordo com esta afirmativa, pois, apesar de apresentar a densidade mais elevada, os menores valores de OPG foram obtidos com a solução de açúcar. Outras propriedades físico-químicas da solução, que não a densidade podem interferir na flutuação dos ovos (Quinn et al., 1980). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho podem estar relacionados à viscosidade da solução, visto que esta propriedade pode influenciar na flutuação de estruturas parasitárias, como já descrito por Kuczynska & Shelton (1999).

Os maiores valores de OPG foram obtidos com a solução de NaNO₃, que apresentou maior eficiência na flutuação de ovos ($p < 0,05$), que as soluções de MgSO₄, ZnSO₄ e de açúcar, respectivamente.

Tradicionalmente, a solução de NaCl é a mais utilizada para a realização da contagem em câmaras de McMaster (Elsheika e Khan, 2011). O bom desempenho obtido em nosso estudo com a solução de cloreto de sódio, com valores de OPG semelhantes aos obtidos com a solução de NaNO₃, indicam que este sal, que apresenta baixo custo e facilidade de aquisição, seria uma opção para o diagnóstico laboratorial da ascaridíase em suínos.

A viscosidade pode ser também um dos fatores responsáveis pela baixa recuperação de ovos observada com a solução de sulfato de magnésio. Cringoli et al. (2004) obteve as menores contagens de ovos de *Dicrocoelium dendriticum* utilizando uma solução deste sal com densidade de 1.28.

Por outro lado, a viscosidade da solução de sulfato de zinco se aproxima da solução de nitrato, com a qual se obteve os valores mais próximos de 2000 OPG. Dentre as soluções avaliadas, esta é a que apresenta menor densidade, fato que poderia estar relacionado a uma baixa recuperação de ovos. Para a flutuação de ovos de strongilídeos de ovinos, a utilização de solução de sulfato de zinco com densidade de 1.35 resultou em baixas contagens de ovos, quando comparadas com outras soluções (Cringoli et al., 2014). Já para a flutuação de ovos do trematoda *Dicrocoelium dendriticum*, o aumento da densidade de 1.2 para 1.35 resultou em um melhor desempenho dos exames de fezes (Rinaldi et al., 2010). A avaliação de soluções de sulfato de zinco com maiores densidades deve ser avaliada para verificar se esta propriedade pode influenciar na taxa de flutuação de ovos de *Ascaris suum*.

Os ovos das diferentes espécies de helmintos apresentam diferenças em tamanho, formato e peso e não podem ser considerados simplesmente como elementos inertes na solução de flutuação (Cringoli et al., 2004). Estas diferenças dificultam comparações entre os resultados descritos na literatura especializada e dificultam a utilização de um único exame parasitológico de fezes até mesmo para uma mesma espécie animal. Neste sentido, os resultados obtidos com as soluções aqui avaliadas não podem ser extrapolados para ovos de outras espécies de helmintos parasitos de suínos e

outros animais, tornando fundamental a realização de experimentos avaliando estas soluções no diagnóstico de outras parasitoses dos animais domésticos.

Como descrito na metodologia, foram utilizados dois gramas de fezes para a realização da técnica, o que resulta num limiar mínimo de detecção para a técnica de McMaster de 100 ovos por grama de fezes (Hoffman, 1987). Em condições naturais, os animais podem apresentar baixas cargas parasitárias, o que torna importante avaliar as soluções aqui utilizadas em fezes contendo menores concentrações de ovos para comparar a performance das diferentes soluções nessas infecções de baixa intensidade.

Segundo Pereckiene et al., (2007), soluções hipersaturadas de sal apresentam a desvantagem de cristalizarem mais rapidamente, entretanto, durante a realização das contagens em nosso laboratório, não foi observada a cristalização das soluções salinas durante as contagens.

O método de diagnóstico ideal em helmintologia deve combinar a facilidade de uso, acessibilidade, e boa sensibilidade, especialmente na quantificação dos ovos (Barda et al., 2014). Portanto, considerando-se a praticidade e acessibilidade da técnica de McMaster e de acordo com os resultados aqui obtidos, seriam indicadas para o diagnóstico da infecção por *Ascaris* em suínos, a utilização das soluções de cloreto e nitrato de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARDA, B.; CAJAL, P.; VILLAGRAN, E.; CIMINO, R.; JUAREZ, M.; KROLEWIECKI, A.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; BURIONI, R.; ALBONICO, M. Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: three methods, one goal; highlights from north Argentina, **Parasites & Vectors**, v.7, p.271, 2014.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G.; SCALA, A. The influence of flotation solution, sample dilution and choice of McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.121–131, 2004.

DIAS, A.S.; TANURE, A.M.; MANHAES, H.G. Ocorrência de *Ascaris suum* em suínos abatidos na Zona da Mata, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, p.101-106, 2011.

ELSHEIKHA H.M.; KHAN, N.A. **Essentials of Veterinary Parasitology**. Loughborough: Caister Academic Press, 2011, 221 p.

FERNANDES, R. M.; FARIAS, E. H.S., BATISTA, K. M.; FERNANDES, M. Z.L. C.M.; RODRIGUES, M.L.A. Comparação entre as técnicas McMaster e centrífugo-flutuação para contagem de ovos de nematóides gastrintestinais de ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.6 (2),p.105-109, 2005.

FOREYT, W. J. **Parasitologia veterinária: manual de referência**, 5.ed. São Paulo: Roca, 2005.

GORDON, H. MCL; WHITLOCK, A.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal Council Scientific Industry Research Australia**, v.12, p.50-52, 1939.

HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 1987.

KUCZYNSKA, E. & SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures and soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65(7), p 2.820-2.826, 1999.

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). **Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques**, 3rd ed. HMSO, London, 1986, 24 pp.

NISHI, S. M.; GENNARI, M. N. T. S.; LISBOA, A.; SILVESTRIM, L.; CAPRONI, J. R.; UMEHARA, O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados

de São Paulo e Minas Gerais. **Arquivo do Instituto de Biológico**, São Paulo, v.67, (2),p.199-203, 2000.

PERECKIENĖ A, KAZIŪNAITĖ V, VYŠNIAUSKAS A, PETKEVIČIUS S, MALAKAUSKAS A.;ŠARKŪNAS, M.; TAYLOR, M.A.A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.111–116, 2007.

QUINN, R.; SMITH, H.V.; BRUCE, R.G.; GIRDWOOD, R.W.A. Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris* spp. ova in the environment. 1. A comparison of flotation procedures for recovering *Toxocara* spp. ova from soil. **Journal of Hygiene**, v.84, p.83–89, 1980.

RINALDI, L.; COLES, G.C.; MAURELLI, M.P.; MUSELLA,V.; CRINGOLI, G. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep.**Veterinary Parasitology**, v.177, p.345-352, 2011.

REHBEIN, S., KOKOTT, S., LINDNER, T. Evaluation of techniques for the enumeration of *Dicrocoelium* eggs in sheep faeces. **Journal of Veterinary Medicine**,v.46, p.133–139, 1999.

CAPÍTULO 4

Atividade predatória de *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ascaris suum* em condições laboratoriais

RESUMO

Clamidósporos são estruturas de resistência responsáveis pela sobrevivência de fungos nematófagos no ambiente. Tais fungos atuam no controle biológico de nematóides do trato gastrointestinal dos animais. Contudo, existem poucos trabalhos sobre a utilização de clamidósporos para destruição de ovos de helmintos. Diante disso, o objetivo do trabalho foi utilizar clamidósporos do fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) na destruição de ovos de *Ascaris suum*, num ensaio *in vitro*, realizado no intervalo de 21 dias. Em cada placa de Petri com ágar-água 2% foram vertidos 1.000 ovos de *A. suum* em 1.000, 10.000 ou 100.000 clamidósporos de cada isolado do fungo (grupos tratados). Foram realizadas as contagens para verificar a atividade ovicida, classificada em quatro níveis de efeito: sem efeito, tipo 1 (efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico a casa, onde são visualizadas as hifas aderidas à mesma), tipo 2 (efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da mesma) e tipo 3 (efeito lítico com alteração morfológica da casca e do embrião, com penetração de hifas e colonização interna do ovo). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos efeitos sobre os ovos, quando comparados o número de ovos dos grupos tratados com os ovos do grupo controle. O efeito tipo 3 caracterizado pela destruição total dos ovos, não foi observado por nenhum dos isolados avaliados. Estes apresentaram maior efeito, ou seja, efeito tipo 2, na concentração de 1.000 clamidósporos por placa, apresentando 20% (VC4) e 7,33% (VC1) de ovos danificados. Concentrações maiores de clamidósporos por placa apresentaram menor efeito sobre os ovos, sugerindo que ocorra uma redução da atividade predatória do agente devido ao excesso de inóculo. Dessa forma para que clamidósporos de diferentes isolados do fungo *P. chlamydosporia* sejam efetivos contra ovos de *Ascaris suum*, estudos devem ser realizados para determinar a concentração ideal a ser utilizada.

Palavras-chave: fungos nematófagos, ovicida, *Ascaris suum*, clamidósporos.

ABSTRACT

Chlamyospores are resistance structures responsible for the survival of nematophagous fungi in the environment. This fungus act in the biological control of nematodes of the gastrointestinal tract of animals. However, there are few studies on the use of chlamyospores for destruction of helminth eggs *in vitro*. Thus, the aim of this work was to use chlamyospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) in the destruction of *Ascaris suum* eggs, an *in vitro* assay, performed during 21 days. In each Petri dish with 2% water-agar were poured 1000 *A. suum* eggs in 1000, 10.000 or 100.000 chlamyospores of each fungal isolate (treated groups). Counts were performed to verify the ovicidal activity classified in four effect levels: none, type 1 (physiological and biochemical effect, without morphological injury to shell, where displaying hyphae adhered to same), type 2 (effect lithic, with morphological alteration in the shell and egg embryo without hyphae penetration through the same) and type 3 (lithic effect with morphological alteration in the shell and embryo, hyphae penetration and internal egg colonization). The results showed a significant difference ($p < 0.05$) in the effects on the eggs when eggs treated groups were compared with the eggs of the control group. The effect type 3 characterized by the complete destruction of the eggs, was not observed by any of the isolates. The greater effect on the eggs, or type 2 effect, was at a concentration of 1.000 chlamyospores per plate, with 20.0% (VC4) and 7.33% (VC1) of damaged eggs. Concentrations of chlamyospores per plate had little effect on the eggs, suggesting the occurrence of a reduction agent predation due to excess inoculum. Thus for chlamyospores of different isolates of the fungus *P. chlamydosporia* are effective against *Ascaris suum*, studies should be conducted to determine the optimal concentration to be used.

Keywords: nematophagous fungi, ovicidal, *Ascaris suum*, chlamyospores.

1. INTRODUÇÃO

Ascaris suum é um parasito que acomete suínos em todo o mundo, ocorrendo especialmente em sistemas de criação orgânico e extensivo (Roepstorff et al., 2011). A infecção provoca prejuízos diretos à produção, como diminuição no ganho de peso e eficiência na conversão alimentar, e indiretos relacionados à depreciação da carcaça e condenação de órgãos, durante o processo de abate e inspeção dos animais (Thamsborg et al., 2013).

Este parasito possui o ciclo de vida direto e os suínos se infectam via fecal-oral. Os vermes adultos vivem no lumen do intestino delgado, onde as fêmeas produzem ovos que são eliminados junto às fezes. No ambiente, em condições adequadas de temperatura e umidade, os ovos se desenvolvem até o terceiro estágio larval (L₃) e após ingestão, os mesmos eclodem no intestino delgado dos animais, liberando a larva L₃, que migra para o fígado, causando lesões comumente conhecidas como manchas brancas, manchas de leite ou *milk spots*. Em seguida, a L₃ migra para os pulmões, atingindo o trato respiratório, chegando à faringe onde é então deglutida. Novamente no intestino delgado, essa larva muda a L₄ (17-19 mm), L₅ (22-36 mm), tornando-se adultos por volta do 42º dia pós-infecção. Dessa maneira, o período pré-patente decorrente desde a ingestão dos ovos infectivos pelos suínos, até a produção de ovos pelas fêmeas, são de 6 a 8 semanas (Dias et al., 2011; Nejsun et al., 2009; Roepstorff et al., 1997).

Apesar da ocorrência do *A. suum* estar relacionada com as práticas de manejo adotadas dentro do rebanho e também com a localização geográfica, raramente um rebanho conseguirá ser livre da infecção (Peng et al., 2012; Nganga et al., 2008). Dessa forma, estudos epidemiológicos permitem compreender o mecanismo de transmissão do parasita e auxiliar no controle do mesmo (Peng et al., 2012).

Até o momento, estratégias de controle do parasito, dentro da produção de suínos, têm sido baseadas unicamente na utilização rotineira de drogas anti-helmínticas (Dias et al., 2011). Contudo, a persistência destes helmintos nos

rebanhos pode ser atribuída à contaminação e à resistência dos ovos no ambiente (Roepstorff et al., 2011). Diante disso, existe a necessidade de serem implantados, juntamente com o controle químico, programas estratégicos alternativos e sustentáveis, visando assegurar a saúde dos organismos vivos e do ambiente (Roepstorff et al., 2011; Mota et al., 2003; Graminha et al., 2001).

Trabalhos realizados em laboratório e a campo vêm demonstrando a habilidade de alguns fungos nematófagos em controlar parasitos que acometem suínos. Entre eles destaca-se, o fungo *Pochonia clamydosporia*, classificado como um fungo parasita, capaz de colonizar e destruir ovos de helmintos, por meio de hifas apresórias indiferenciadas, que penetram a parede desses ovos (Nordbring-Hertz et al., 2006). Estudos utilizando os isolados VC1 e VC4 de *P. chlamydosporia* demonstraram que os mesmos foram eficazes contra ovos de *A. suum*, por causarem a destruição de 56.67% e 55.33% dos ovos, respectivamente, após 21 dias de incubação, (Ferreira et al., 2011). Araújo et al. (2008) avaliou os efeitos de tais isolados e relatou a atividade ovicida sobre ovos de *A. suum*, com porcentagem de destruição de 13.0% e 17.3%, 13.9% e 17.7% e 19.0% e 20.0%, de VC1 e VC4, após 7, 14 e 21 dias de interação, respectivamente. Também Braga et al. (2007) demonstrou a eficácia desses isolados, porém contra ovos da espécie *Ascaris lumbricoides*, espécie similar ao *A. suum* e que acomete o homem.

Em outro trabalho, também realizado por Ferreira et al. (2011), o mesmo fungo foi oferecido a suínos via oral e, mesmo após passagem pelo trato gastrointestinal desses animais, germinaram em amostras fecais e foram capazes de destruir ovos do parasita, após 30 dias de interação. Diante disso, a utilização de clamidósporos para o controle biológico de nematóides passa a ser considerada uma alternativa promissora, pois como tais estruturas são responsáveis pela sobrevivência do fungo no ambiente, as mesmas podem aumentar a viabilidade destes nos testes de passagem pelo trato gastrointestinal dos animais (Blaszowska et al., 2014; Dias et al., 2012).

Existem até o momento, poucos trabalhos sobre a utilização de clamidósporos para a destruição de ovos de helmintos (Braga et al., 2011). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade ovicida *in vitro* de

diferentes concentrações de clamidósporos e de diferentes isolados fúngicos de *P. chlamydosporia* sobre ovos de *A. suum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de ovos de *Ascaris suum*

Ovos de *A. suum* foram recuperados a partir da dessecação de fêmeas nematóides adultas obtidas do intestino delgado de suínos que tiveram morte por causas naturais. Os ovos foram morfológicamente analisados quanto a sua integridade, sobre microscópio óptico (objetiva de 10x), de acordo com Urquhart et al. (1998), lavados dez vezes com água destilada e centrifugados a 1.183,3425 g por 5 minutos em cada lavada. O sobrenadante foi descartado ao final de cada ciclo de centrifugação. Os ovos foram então incubados a 25°C por 21 dias em solução contendo formalina 0,05%, sulfato de estreptomicina 0,005% e cloranfenicol 0,01%, conforme descrito por Araújo et al. (1995).

2.2. Produção e contagem dos clamidósporos

A produção da massa de clamidósporos de *P. chlamydosporia* foi realizada em grãos de arroz, em frascos erlenmeyer. Em cada frasco foram depositados 300 g de grãos de arroz branco e 40 mL de água destilada autoclavados por 30 minutos a 121°C. Dentro de uma capela vertical de fluxo laminar, seis discos médios de aproximadamente 5 mm diâmetro, contendo micélio do fungo, foram removidos do ágar-água 2% e transferidos para os frascos contendo o arroz, à temperatura ambiente. Os mesmos foram selados para evitar a contaminação, e colocados em Incubadora Refrigerada com Agitação (TECNAL TE-421) a 25°C, no escuro e sob agitação de 25 rpm durante 21 dias. Em intervalos de cinco dias até o fim do período de incubação, os blocos dos grãos colonizados dentro de frascos foram desfeitos de forma asséptica, para garantir o crescimento fúngico uniforme. Após esse período o substrato foi homogeneizado e 6 amostras de 1g foram removidas de cada frasco. Cada amostra foi colocada em um erlenmeyer contendo 10 mL de água destilada autoclavada e polissorbato 80 (Tween[®] 80) a 0,2% (v/v) e foram agitadas durante 2 minutos em um agitador magnético para maximizar a

separação dos clamidósporos. Em seguida, a suspensão fúngica foi filtrada através de gaze (4 malhas) de forma a reduzir os fragmentos, e coletou-se 20mL em copo Griffin. Logo após, o número de clamidósporos por mililitro de suspensão foi estimado em alíquotas de 10 uL colocados na câmara de Neubauer de acordo com Alfenas e Mafia (2007).

2.3. Ensaio experimental

O experimento foi constituído por seis tratamentos e um grupo controle. Para isso 1.000 ovos de *A. suum* foram inoculados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio ágar-água 2% (2% AA) com diferentes concentrações de clamidósporos (1.000, 10.000 e 100.000) de cada isolado fúngico (VC1 ou VC4). O grupo controle foi constituído de placas contendo apenas 1000 ovos de *A. suum*. Para cada tratamento foram realizadas 6 repetições. No final do período experimental (21dias), 100 ovos foram removidos de cada placa (grupos tratados e controle) e examinadas para verificação da atividade ovicida, modificado de Lysek et al.(1982): a) ausência de efeito; b) efeito tipo 1: sem efeito lítico e morfológico que levam danos à casca de ovo, com hifas aderindo à parede; c) efeito tipo 2: efeito com alteração morfológica do embrião e da casca, porém sem a penetração de hifas através da casca de ovo; d)efeito tipo 3: efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca do ovo e com penetração de hifas e colonização interna. Os ovos foram coletados de cada placa contendo os isolados e de placas do grupo controle e colocados em lâminas de vidro, com uma gota do corante Azul de Aman 1%, para avaliação sob uma lente de 40x, conforme descrito por Araújo et al. (1995).

2.4. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e como *post-hoc* o método de Student-Newman-Keuls. Todos os testes foram realizados no programa Sigma Plot, versão 11.0, considerando o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os clamidósporos de *P. chlamydosporia* foram eficazes em atuar contra ovos de *A. suum*, pois houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre os ovos pertencentes ao grupo tratado quando comparado aos do grupo controle.

Contudo, o efeito tipo 3 caracterizado pela destruição total dos ovos, não foi observado por nenhum dos isolados avaliados. O efeito tipo 2 foi o maior efeito encontrado sobre os ovos, na concentração de 1.000 clamidósporos por placa, apresentando 20,0% (VC4) e 7,33% (VC1) de ovos danificados. Para a concentração de 10.000 clamidósporos, a porcentagem, para o mesmo efeito, foi de 3,66% (VC4) e 0,5% (VC1) e para 100.000 clamidósporos de 0,0% (VC4) e 1,66% (VC1). Dessa forma, os melhores resultados sobre os ovos foram, VC4 100.000, VC1 100.000, VC1 10.000, VC4 10.000, VC1 1.000, VC4 1.000, em ordem crescente (Figura 1).

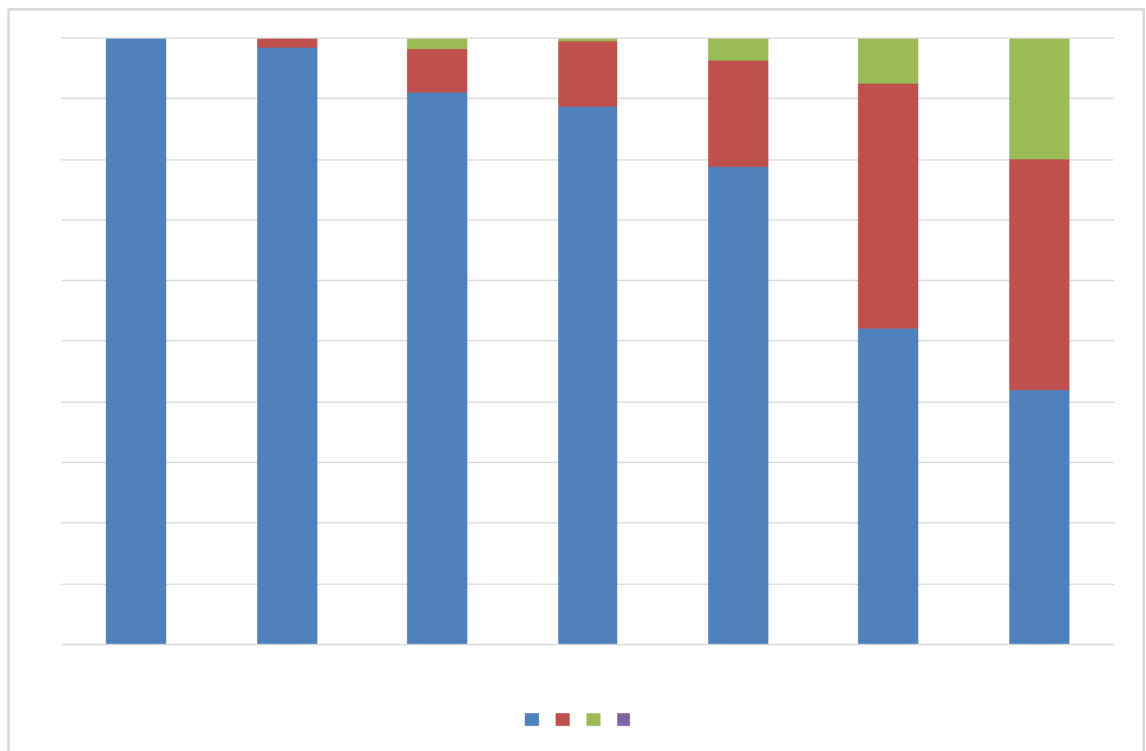


Figura 1: Efeito ovicida causado por diferentes concentrações de clamidósporos (1.000, 10.000 e 100.000) de *P. chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) em ensaio *in vitro*, após 21 dias de interação com ovos de *Ascaris suum*. SE: sem efeito; T1: tipo 1; T2: tipo 2; T3: tipo 3.

No presente trabalho, menores concentrações de clamidósporos demonstraram maior eficiência de efeito sobre os ovos. Além disso, o isolado VC4 mostrou ser melhor do que VC1, na concentração de 1.000 clamidósporos.

Diferentemente do resultado aqui encontrado, trabalho realizado por Braga et al. (2011), demonstraram que aumento nas concentrações de clamidósporos provocou um aumento na eficiência de destruição dos ovos *in vitro* de *Taenia taeniaeformis* e que os mesmos foram mais eficientemente destruídos na concentração de 20.000 clamidósporos. Araújo et al. (2013) também demonstrou um aumento na destruição de ovos de *Toxocara canis* quando em contato com altas concentrações de clamidósporos.

Segundo Araujo et al. (2009) e Braga et al. (2010), o efeito direto do parasitismo do fungo sobre o desenvolvimento do embrião é através da ação de enzimas sobre a casca do ovo, aumentando sua permeabilidade e facilitando a passagem de toxinas. Os fungos possuem exigências específicas para a produção máxima de suas enzimas e portanto, condições distintas de cultivo podem levar a resultados diferentes sobre os ovos (Araújo et al., 2013; Esteves et al., 2009). Assim, uma possível justificativa para explicar tais diferenças entre estudos é o tipo de meio utilizado para cultivo do fungo e produção dos clamidósporos (Giaretta et al., 2011). Além disso, também a contaminação durante o processo de produção de clamidósporos pode interferir nos resultados (Araújo et al., 2004).

Trabalho realizado por Monteiro et al., (2013), avaliando o efeito de clamidósporos produzidos por *Duddingtonia flagrans* para o controle de *Meloidogyne javani* demonstrou que, a partir da dose em que houve maior redução, o aumento da concentração de clamidósporos diminuiu a efetividade. Ou seja, segundo os autores, houve redução da atividade predatória do agente em decorrência do excesso de inóculo. McKee & Robinson (1988) explicam que culturas e suspensões densas produzem metabólitos voláteis que inibem o

processo de germinação do fungo. Conforme relatado por Robinson et al. (1989), esse processo é denominado autoinibição.

Portanto, para que isolados de *P. chlamydosporia* possam ser utilizados como controladores biológicos de ovos de *A. suum*, é necessária a avaliação da ação dos clamidósporos em diferentes concentrações e em diferentes tempos de exposição. Além disso, estudos de microscopia eletrônica poderão auxiliarno entendimento sobre o processo de germinação e ação dos clamidósporos sobre a casaca dos ovos.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 382p.

ANDERSON, T.J.C. Ascaris infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. **Parasitology**, v.110, p.215–219. 1995.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n.1, p.37-42, 1995.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.165-170, 2004.

ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitology Research**, v.102, p.787–790, 2008.

ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; CAMPOS, A.K. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus

Pochonia chlamydosporia on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**, v.121, p.338-341, 2009.

ARAÚJO, J.V.; ARAÚJO, J.M.; BRAGA, F.R.; FERREIRA, S.F.; TAVELA, A.O. Predatory activity of chlamydospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, p.171–174, 2013.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O.; MACIEL, A.S. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, p.356–358, 2007.

BRAGA, F.R.; FERREIRA, S.R.; ARAÚJO, J.V.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; CAMPOS, A.K.; FREITAS, L.G. Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (*syn. Neoascaris*) *vitulorum* eggs. **Tropical Animal Health Production**, v.42, p.309–314, 2010.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; PINTO, P.S.A. Ovicidal activity of different concentrations of *Pochonia chlamydosporia* chlamydospores on *Taenia taeniaeformis* eggs. **Journal of Helminthology**, v.85, n.1, p.7-11, 2011.

BLASZKOWSKAA, J.; KURNATOWSKIB, P.; WOJCIKB, A.; GORALSKAB, K.; SZWABEBA, K. *In vitro* evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.199, p.165–171, 2014.

DIAS, A.S.; TANURE, A.M.; MANHÃES, H.G.V.C. Ocorrência de *Ascaris suum* em suínos abatidos na Zona da Mata, Minas Gerais. **Brazilian**

Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.48, n.2, p.101-106, 2011.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; PUPPIN, A.C.; FERNANDES, F.M.; RAMOS, R.F.; BERTONCELI, R.M.; DA SILVA, R.G.; PERBONI, W.R. Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. **Parasitology Research**, v.110, p.663–667, 2012.

ESTEVES, I.; PETEIRA, B.; ATKINS, S.D.; MAGAN, N.; KERRY, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycology Research**, v.113, p.867-876, 2009.

FERREIRA, S.R.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; FRASSY, L.N.; FREITAS, L.G. Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.639–642, 2011.

GIARETTA, R.D.; FREITAS, L.G.; CAIXETA, L.B.; XAVIER, D.M.; FERRAZ, S.; FABRY, C.F.S. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciênc.agrotec.,Lavras**, v.35, n.2, p.314-321, 2011.

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CÂNDIDO, R. C.; SILVA, G. F.; COSTA, A. J. Avaliação in vitro da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. **Semana: Ciências Agrárias**. Londrina, v.22, n.1, p.11-162001.

LARSEN, M. Biological control of helminthes. **Internacional Journal of Parasitology**, v.29, n.1, p.139-146, 1999.

LELES, D.; GARDNER, S.L.; REINHARD, K.; INIGUEZ, A.; ARAUJO, A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasites and Vectors**, v.5, n.42, 2012.

LÝSEK, H.; FASSATIOVÁ, O.; PINEDA, N.C.; HERNÁNDEZ, N.L. Ovicidal fungi in soils of Cuba. **Folia Parasitology**, v.29, n.3, p.265-270, 1982.

MCKEE, N.D.; ROBINSON, P.M. Production of volatile inhibitors of germination and hyphal extension by *Geotrichum candidum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, p.157–160, 1988.

MONTEIRO, T. S. A. **Controle biológico do nematóide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans***. 2013. 66f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

MOTA M.A.; CAMPOS A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p.93–100, 2003.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 1-11, 2006.

NGANGA, C.J.; KARANJA, D.N.; MUTUNE, M.N. The prevalence of gastrointestinal helminth infections in pigs in Kenya. **Tropical Animal Health Production**, v.40, p.331–334, 2008.

NEJSUM, P.; PARKER, E.D.; FRYDENBERG, J.; ROEPSTORFF, A.; BOES, J.; HAQUE, R.; ASTRUP, I.; PRAG, J.; SKOV SORENSEN, U.B. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.1142–1148, 2005.

NEJSUM, P.; THAMSBORG, S.M.; PETERSEN, H.H.; KRINGEL, H.; FREDHOLM, M.; ROEPSTORFF, A. Population dynamics of *Ascaris suum* in trickle infected pigs. **Journal of Parasitology**, v.95, p.1048–1053, 2009.

NEJSUM, P.; BETSON, M.; BENDALL, R.P.; THAMSBORG, S.M.; STOTHARD, J.R. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. *Journal of Helminthology*, v.86, p.148–55, 2012.

PENG, W.; CRISCIONE, C.D. Ascariasis in people and pigs: New inferences from DNA analysis of worm populations. *Infection, Genetics and Evolution*, v.12, p.227–35, 2012.

ROBINSON, P. M.; McKEE, N.D.; THOMPSON, L. A.A. Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*. *Mycological Research*, v.93, n.2, p.214-222, 1989.

ROEPSTORFF, A.; ERIKSEN, L.; SLOTVED, H.C.; NANSEN, P. Experimental *Ascaris suum* infection in the pig: worm population kinetics following single inoculations with three doses of infective eggs. *Parasitology*, v.115, p.443–452, 1997.

ROEPSTORFF, A.; MEJER, H.; NEJSUM, P.; THAMSBORG, S.M. Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. *Veterinary Parasitology*, v.180, p.72–81, 2011.

THAMSBORG, SM.; NEJSUM, P.; MEJER, H. Impact of *Ascaris suum* in livestock. *In*: Holland C, ed. *Ascaris the neglected parasite*. London: Academic Press, 2013.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p 373, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

Ascaris suum representa um desafio atual dentro da produção intensiva de suíno. Isso se deve à falta de um programa estratégico para o seu controle, uma vez que o mesmo é feito única e rotineiramente com a utilização de drogas anti-parasitárias.

Além disso, é crescente a necessidade de maiores estudos envolvendo a utilização de formas alternativas de controle, como a utilização de plantas com compostos bioativos para a redução da carga parasitária no animal e a utilização de fungos nematófagos para o controle no ambiente.

Contudo, tais estratégias devem ainda ser associadas ao controle químico, objetivando a diminuição da quantidade de drogas utilizadas para um limiar aceitável, ajudando assim a combater parasitos resistentes, reduzindo custos e bem como problemas relacionados à toxicidade dessas drogas para o animal e o homem.

E por último, para que um programa de controle seja realizado com sucesso, técnicas de diagnósticos utilizadas na rotina precisam ser revistas e padronizadas, pois a sensibilidade dessas técnicas varia de acordo com o parasita a ser pesquisado. Assim, evitam-se erros de técnicas como resultados falsos negativos, que prejudicam na escolha das medidas a serem tomadas dentro de um programa de controle.

ANEXO I



UNIÃO DE ENSINO SUPERIOR DE VIÇOSA
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM USO DE ANIMAIS - FACISA

Viçosa, 31/10/2014

Informo que o Projeto de pesquisa intitulado “Avaliação Histológica, Morfométrica Bioquímica e Hematológica de Camundongos BALB/C Tratados com Extrato Aquoso de *Piptadenia gonoacantha*”, sob responsabilidade da professora Mariana Costa Fausto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com uso de animais da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (CIAEP/CONCEA Nº 01.0322.2014).

Por ter se adequado às resoluções e diretrizes Regulamentares do CEPEUA/FACISA, este foi aceito, sendo liberado para execução, sob número de protocolo 106/2014 –II.

Por ser verdade assino a presente:



Rogéria Pinto
Prof.ª Rogéria Pinto
C.P. Nº 1560/2

Vice Coordenador do CEPEUA/FACISA