

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

LARICE TOSI MARQUES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS E SUA EFICÁCIA NO
CONTROLE *in vitro* DE OVOS DE *Fasciola hepatica***

ALEGRE-ES

2017

LARICE TOSI MARQUES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS E SUA EFICÁCIA NO
CONTROLE *in vitro* DE OVOS DE *Fasciola hepatica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Isabella Vilhena Freire Martins.

ALEGRE-ES

2017

LARICE TOSI MARQUES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS E SUA EFICÁCIA NO
CONTROLE *in vitro* DE OVOS DE *Fasciola hepatica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Aprovado em de de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Isabella V. Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Juliana Aparecida Severi
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

Prof^a. Dr^a. Milena Batista Carneiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Francisco Careta
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida.

A orientadora Profa. Dra. Isabella Vilhena Freire Martins, que confiou no meu desempenho e incentivou a realização deste trabalho, orientando-me e principalmente sendo exemplo constante de dedicação, responsabilidade e amizade.

A Dra. Juliana Severi, que sempre se mostrou disposta a elucidar dúvidas e coletar materiais vegetais para preparação dos extratos. Obrigada pela ajuda e amizade.

Aos meus Pais João Francisco e Marilza, exemplos de caráter e luta. Agradeço pela educação, pelo amor incondicional, amizade e companheirismo. Agradeço também por sempre me mostrarem a importância do respeito ao próximo e aos animais.

Ao meu noivo Bismark, sempre ao meu lado me apoiando nas decisões mais difíceis, sendo um verdadeiro companheiro, sempre me incentivando e mostrando que nem sempre o difícil é impossível.

Aos meus companheiros de laboratório, Roselena, Marcelle e Winner, sem a ajuda de vocês nada disso seria possível.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, à CAPES pela concessão da bolsa e Fapes por financiar o projeto.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas,
mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os
pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito,
porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem
nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

MARQUES, LARICE TOSI. **Composição química de extratos vegetais e sua eficácia no controle in vitro de ovos de *Fasciola hepatica***. 2017. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

A fasciolose tem sido diagnosticada nas espécies bovina, caprina, ovina e equina nas regiões sul e sudeste do Brasil, com relatos de infecções em búfalos, e os casos humanos, muitas vezes, acompanham a distribuição da doença nos animais. Objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia *in vitro* de extratos vegetais que possam apresentar atividade ovicida. Os ovos de *Fasciola hepatica* foram retirados diretamente da vesícula biliar de bovinos diagnosticados como positivos no abate. Os ovos foram submetidos à sedimentação e à contagem, realizado o teste de eficácia de cada extrato e contados após 15 dias de incubação, a cada hora, com o auxílio de microscópio estereoscópio. Os extratos brutos testados nas concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5%, foram *Harpagohytum procumbens* (Garra-do-diabo), *Guapira graciliflora* (João Mole), *Guapira opposita* (Maria Mole), *Guapira noxia* (Guapira do Cerrado), *Uncaria guianensis* (Unha de gato), *Psidium guajava* L. (Goiabeira), *Momordica charantia* L. (Melão de São Caetano), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira). Para uma padronização, foi determinada uma média de 100 ovos por amostra, estes ovos foram depositados em tubos tipo Falcon. Juntamente com os ovos, foram adicionados 3 mL do extrato vegetal a ser testado. Para um melhor resultado, foram realizadas triplicatas de cada amostra. Para controle positivo, utilizou-se albendazol na concentração de 0,5%, e para controle negativo utilizou-se água de torneira. Os extratos vegetais na forma bruta foram submetidos aos testes fitoquímicos. Os ensaios permitiram avaliar que os extratos *Harpagohytum procumbens* (Garra-do-diabo), *Psidium guajava* L. (Goiabeira) e *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), apresentaram eficácia de 100% relacionado à presença de compostos bioativos neles presentes como flavonoides, taninos, alcaloides, compostos fenólicos, saponinas e terpenos. O tanino foi o composto que predominou em todos os extratos vegetais utilizados, fazendo com que não houvesse eclosão de

miracídios e em alguns casos, impossibilitando sua formação no interior do ovo. Foram observadas alterações microscópicas nos ovos das amostras tratadas como invaginações em sua superfície, redução do tamanho do ovo, fragmentações e formação de miracídio inviável.

Palavras-chave: Extrato vegetal. Fasciolose. Fitoquímica.

ABSTRACT

MARQUES, LARICE TOSI. Chemical composition of plant extracts and your effectiveness in-vitro control of *Fasciola hepatica* eggs . 2017. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Fasciolosis has been diagnosed in bovine, caprine, ovine and equine species in Brazil's southern and southeastern, with reports of buffalo infections, and human cases often accompany the disease distribution in animals. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* efficacy of plant extracts that may present fascioloid activity in *Fasciola hepatica* eggs. *Fasciola hepatica* eggs were collected directly from the gallbladder of the animals diagnosed as positive on post-mortem examination. The eggs were submitted to sedimentation, counting, performed the efficacy test of each extract, and counted every hour with the aid of stereoscope microscope. The crude extracts tested at concentrations of 0.1%, 0.25% and 0.5% were *Harpagohytum procumbens*, *Guapira graciliflora*, *Guapira opposita*, *Guapira noxia*, *Uncaria guianensis* (Cat's claw), *Psidium Guajava* L. (guava), *Momordica charantia* L. (São Caetano melon), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) and *Eugenia uniflora* L. For a standardization, the number of eggs per mL was calculated using arithmetic mean, where the means of 3 samples were calculated for the determination of the number of eggs. Once the amount of eggs per sample was determined, the 100 eggs were deposited in Falcon tubes. Together with the eggs, 3 mL of the vegetable extract to be tested was added. For a better result, triplicates of each sample were performed. For positive control, albendazole was used at 0.5% concentration, and tap water was used for the negative control. To determine the efficacy of each plant extract, efficacy calculations were performed. The crude extracts were submitted to phytochemical tests. The tests allowed to evaluate that the extracts *Harpagohytum procumbens*, *Psidium guajava* L. (guava) and *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), showed a 100% efficacy related to the presence of bioactive compounds present in them as flavonoids, tannins, alkaloids , phenolic compounds, saponins and terpenes. The tannin was the compound that predominated in all the vegetal extracts used, so that there was no hatching of

miracidia and in some cases, making it impossible to form inside the egg. Microscopic changes were observed in the eggs of samples treated as invaginations on its surface, reducing the size of the egg, fragmentation and formation of miracídio impractical.

Keywords: Plant Extract. Fasciolose. Phytochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAO – Casca de *Anacardium occidentale* - Cajú
- CSA – Casca de *Stryphnodendron adstringens* – Barbatimão
- CUT – Casca de *Uncaria tomentosa* – Unha de gato
- FAO – Folhas de *Anacardium occidentale* - Cajú
- FEU – Folhas de *Eugenia uniflora* - Pitangueira
- FPG – Folhas de *Psidium guajava* - Goiabeira
- GG – *Guapira graciliflora*- João Mole
- GN – *Guapira noxia*- Guapira do Cerrado
- GO – *Guapira opposita*- Maria Mole
- MSC – Folhas de *Momordica charantia* - Melão de São Caetano
- RHP – Raízes de *Harpagophytum procumbens* – Garra do diabo

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1	Extratos vegetais utilizados neste estudo com suas respectivas famílias, espécies, nome popular e as atividades de cada extrato baseadas em evidências da literatura.....	26
Tabela 2	Descrição e procedência das espécies vegetais utilizadas no ensaio fasciolicida.....	34
Tabela 3	Avaliação da eclodibilidade de ovos de <i>Fasciola hepatica</i> após incubação com extratos vegetais brutos testados nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5%, em 3 horas de experimento.....	36
Tabela 4	Avaliação quantitativa da eclodibilidade de ovos de <i>Fasciola hepatica</i> após incubação com extratos vegetais em 3 horas de experimento, e porcentagem da eficácia de cada um.....	38
Tabela 5	Média de eclosão para cada concentração avaliada da parte aquosa dos cinco extratos vegetais utilizados no ensaio fasciolicida.....	39
Tabela 6	Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos com as reações de identificação positiva para cada classe dos compostos testados com todos os extratos em sua forma bruta.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Principais aspectos da <i>Fasciola hepatica</i>	15
2.2 Epidemiologia no Espírito Santo.....	16
2.3 Diagnóstico.....	17
2.4 Controle e Tratamento	20
2.5 Extratos Vegetais	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Localização do Experimento	27
3.2 Preparo do Material Vegetal para realização dos testes <i>in vitro</i>	27
3.3 Atividade <i>in vitro</i> da eficácia dos extratos vegetais sobre ovos de <i>Fasciola hepatica</i>	29
3.4 Análise microscópica dos ovos	30
3.5 Análise Fitoquímica	30
3.6 Análise estatística dos dados	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Preparo do Material Vegetal para realização dos testes <i>in vitro</i>	33
4.2 Análise Microscópica dos ovos	39
4.3 Análise Fitoquímica	42
5 CONCLUSÃO	47
6 REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma doença causada por trematódeos do gênero *Fasciola* e é de importância veterinária principalmente em regiões com criações de ovinos e bovinos, pois a infecção leva a grandes perdas econômicas. O prejuízo associado a esta patologia não é apenas consequência da reprovação de vísceras em matadouro-frigorífico, mas também à diminuição do rendimento dos animais e ao aumento da suscetibilidade a outras doenças. Por ser considerada uma zoonose, também é de preocupação da saúde pública (MAS-COMA, 2014).

A fasciolose apresenta distribuição cosmopolita e a presença do parasito é confirmada, comumente, pela detecção de ovos nas fezes (ANDERSON; LUONG; VON, 1999). A fasciolose tem sido diagnosticada em bovinos, caprinos, ovinos e equinos nas regiões sul e sudeste do Brasil (ZAIDEN et al., 2008), com relatos de infecções em búfalos (PILE et al., 2001a), e os casos humanos, muitas vezes, acompanham a distribuição da doença nos animais (GUIMARÃES, 2003).

Em relação ao potencial de disseminação dessa enfermidade parasitária no mundo, constata-se uma ampla distribuição vinculada a dispersão no ambiente de espécies de moluscos capazes de albergar estágios larvais do parasito na condição de hospedeiro intermediário. No Brasil foram registradas quatro espécies pertencentes ao gênero *Lymnaea*, sendo estas: *L. columella* (GONZALES et al., 1974); *L. viatrix* (REY, 1957); *L. cubensis* (RESENDE et al., 1973) e *L. rupestris* (PARAENSE, 1982). Dentre estas, segundo Bruno et al. (1995), somente as três primeiras foram caracterizadas como hospedeiras intermediárias em diferentes localidades do país.

Nas últimas décadas, a fasciolose passou a se tornar de grande importância para a saúde pública, pois houve um crescente número de casos humanos diagnosticados em diversos países (ESTEBAN et al., 2003). O homem é um hospedeiro acidental e a principal forma de transmissão da fasciolose para os seres humanos é a ingestão de água ou verduras com desenvolvimento aquático ou semi-aquático, como o agrião, contaminadas com metacercárias do parasito (GUIMARÃES, 2003).

Segundo Martins et al. (2012), o modelo espacial de distribuição do risco de fasciolose no sul do Espírito Santo indica que 50% das áreas já estudadas estão classificadas como risco alto ou muito alto para a enfermidade. Além disso, é importante considerar a ocorrência de resistência do parasito à medicamentos já existentes no mercado o que faz com que medidas alternativas sejam procuradas, principalmente para eliminar os ovos presentes no ambiente (BRAGA et al., 2008).

Uma saída para a redução da frequência da fasciolose poderia ser a eliminação do hospedeiro intermediário, neste caso, o molusco. Porém, o uso de moluscidas utilizados para a realização do controle populacional é proibido, dificultando desta forma, o controle da infecção por *Fasciola hepatica* (WANG et al., 2006).

O uso de medicamentos anti-helmínticos é uma das medidas mais utilizadas para a diminuição da infecção por *F. hepatica*. Os benzimidazóis são conhecidos por impedirem a eclosão de ovos de trematodeos e nematoides (ALVAREZ et al., 2009). Dentre estes, o triclabendazol, um derivado halogenado, é o mais eficaz ao combate de *F. hepatica* devido a sua excelente atividade sobre a forma adulta, jovem e de ovo do parasito (BORAY et al., 1983), entretanto, este princípio ativo não é mais comercializado no Brasil devido ao seu custo e baixa procura por produtores.

Além da resistência, a busca do mercado consumidor por fontes de tratamento em substituição aos produtos sintéticos, têm justificado pesquisas que buscam plantas medicinais para o controle de nematoides gastrintestinais (RATES, 2001). É de grande importância enfatizar o controle de *F. hepatica* pelos ovos, pois principalmente quando se fala a nível de ambiente, estes são eliminados nas fezes de animais infectados durante todo o ano, contaminando o ambiente e infectando novos hospedeiros intermediários.

Ibarra et al. (2012) realizaram um estudo com o uso de plantas, onde os extratos obtidos a partir de algumas plantas típicas do México utilizadas na medicina tradicional mostrou um efeito anti-helmíntico de mais de 80% contra as fases juvenis e adultas de *F. hepatica*. Dos 60 extratos de plantas testados, os que mostraram percentual de 80% e 90% de eficácia foram *Achillea millefolium* (Mil-ramas), *Menthapiperita* (Menta), *Lippiagraveolens* (Orégano), *Justicia spicigera* (Justiça Sidicaro), *Artemisia mexicana* (Artemísia), *Populus alba*

(Amieiro-branco), *Artemisia absinthium* (absinto) , *Chenopodium graveolens* (Espada do Zorro), *Thymus vulgaris* (Tomilho), *Limpia critridora* (Cedron) e *Castela Tortuos* (Chaparroamargo).

No Brasil, poucos autores avaliaram a atividade de substâncias de origem vegetal, como óleos essenciais, extratos vegetais e substâncias isoladas sobre *F. hepatica*, porém Sunita et al. (2013) avaliaram vários fitoterápicos no controle de rédias e cercárias de *F. hepatica* sobre moluscos e encontraram atividade em algumas combinações envolvendo a azadiractina, presente na planta *Azadirachta indica* (neem). Pile et al. (2001) indicaram a possibilidade do uso do látex de *Euphorbia splendens* como subsídio em programas de controle estratégico de fasciolose.

Pereira et al. (2016) realizaram um trabalho com *Momordica charantia* L. (Melão de São Caetano), onde o extrato bruto liofilizado a partir das folhas e suas sub-fracções, obtidos a partir de partição líquido-líquido com solventes orgânicos, foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e constataram haver a inibição da formação miracídios.

Desta forma, objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia *in vitro* de extratos vegetais que possam ter atividade em ovos de *F. hepatica*, avaliando seus constituintes por meio da fitoquímica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Principais aspectos de *Fasciola hepatica*

A fasciolose é provocada pelo trematoda *Fasciola hepatica*. São grandes helmintos de forma foliácea, que parasitam os canais biliares de mamíferos. São portadores de uma cutícula espinhosa, responsável pela sua ação patogênica mecânica, testículos e ovários muito ramificados, responsáveis pelo seu potencial biótico. Tem uma distribuição quase cosmopolita, ocorre sob a forma enzoótica em quase todo o mundo (CORRÊA, 1976).

Em infecções moderadas cada indivíduo elimina 3000- 3500 ovos/dia, sendo que o número de ovos eliminados pelas fezes pode chegar a 20.000/dia. No entanto, a liberação dos ovos depende de fatores relacionados com o hospedeiro e com o parasito, as estações do ano, o grau de parasitismo, duração da infecção, reinfeções e a alimentação. Independentemente destas variações, são eliminados ovos durante todo o ano (CORDERO DEL CAMPILLO; ROJO VÁZQUEZ, 1999).

O ciclo de vida de *F. hepatica* se inicia quando os ovos são excretados por animais infectados. Em condições ótimas de umidade, temperatura e luz, os miracídios eclodem dos ovos e infectam *Lymnaea* spp, um hospedeiro intermediário (DALTON, 1999).

Síndromes clínicas severas podem estar associadas ao número de parasitos e ao seu estágio. Na fase aguda há edema submandibular e a morte sobrevém repentinamente, em decorrência das graves lesões no fígado causadas pelas fascíolas durante a migração. Em sua forma crônica, as mucosas se apresentam pálidas, há perda de peso, diminuição do apetite, edema submandibular, abdome dilatado, respiração acelerada, diarreia e morte (FORTES, 2004).

2.2 Epidemiologia no Espírito Santo

A fasciolose tem sido registrada nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sul e Sudeste, porém os primeiros relatos ocorreram no estado do Rio de Janeiro (PILE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA e FILHA, 2009).

É importante saber que dados relacionados aos impactos econômicos ocasionados pela fasciolose no Espírito Santo ainda são insuficientes, contudo sabe-se que desde o primeiro relato oficial da doença registrado em 2005 pelo Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF), os pecuaristas vêm acumulando inúmeras perdas devido a condenação de fígados em matadouros, diminuição do peso de carcaças, retardo no desenvolvimento e queda na produção leiteira (BAPTISTA, 2008). Conforme Bernardo et al. (2011), as perdas foram calculadas em mais de 380 mil dólares entre os anos de 2006 e 2009.

Em estudo com utilização do Sistema de Informação Geográfica para análise de risco de fasciolose no sul do Espírito Santo, Martins et al. (2012) concluíram que mais de 50% do sul do Espírito Santo apresentam risco alto ou muito alto para fasciolose. Os autores mostraram de forma comparativa que estas áreas apresentavam alta temperatura, com média acima de 20°C, mas relativamente baixa declividade, baixa precipitação e baixa altitude propensa à inundação periódica das pastagens e/ou solos que promovem a retenção de água, favorecendo o desenvolvimento do molusco hospedeiro intermediário.

Carneiro et al. (2013) mostraram pela primeira vez no estado do Espírito Santo a presença de *F. hepatica* em caprinos, ovinos e búfalos. Um total de 58 (13,68%) amostras de ovinos, 76 (21,78%) amostras de caprinos e 10 (23,81%) amostras de bubalinos foram positivas para ovos de *F. hepatica* na técnica de sedimentação. Além disso foi registrada a presença do molusco do gênero *Lymnaea* em algumas das propriedades. Em bovinos, Alves et al. (2011) examinando 10 municípios também localizados na região Sul do estado, verificaram que de 717 amostras de fezes coletadas, em diferentes propriedades, 153 foram consideradas positivas para *F. hepatica* resultando em uma frequência observada de 21,33% para fasciolose naquelas localidades. Uma atualização da distribuição geográfica e dos fatores associados à fasciolose

bovina no Sul do Estado do Espírito Santo foi realizada e a fasciolose foi diagnosticada em 18 (78%) dos 23 municípios.

Alves et al. (2011) verificaram que, no sul do Espírito Santo, em propriedade com bovinos positivos para *F. hepatica* a presença de ovinos, caprinos e búfalos também positivos para este parasito, com acesso ao mesmo pasto, favorecem uma ampla disseminação dos ovos no meio ambiente e, conseqüentemente, um maior risco de infecção para o gado.

Com relação aos dados de abatedouros, em um estudo realizado por Bernardo et al. (2011) com dados originários de um matadouro-frigorífico no município de Atílio Vivácqua, no sul do estado, 27.625 fígados foram condenados devido a fasciolose, o que representou uma prevalência de 24,89% entre os anos de 2006 a 2009.

Diversos estudos epidemiológicos têm sido conduzidos no estado do Espírito Santo, demonstrando que a região sul do estado pode ser considerada endêmica, assim como tradicionalmente outras áreas no sul do país já o são (ALVES et al., 2011; MARTINS et al., 2014). Considerando os dados do SIE-ES para o sul do estado, a prevalência de fígados bovinos condenados por fasciolose chegou a 17,57% em 2011 e 13,49% no ano de 2014.

Em 2015, segundo um levantamento realizado por Novaes et al. (2016) em um matadouro-frigorífico no município de Cachoeiro de Itapemirim, foram abatidos e inspecionados um total de 12.428 bovinos, sendo 3.716 fígados (30%) condenados por fasciolose. Destes municípios, os com maiores índices de condenação no ano de 2015 foram Cachoeiro de Itapemirim com 12,7%, Castelo com 6,5 % e Vargem Alta com 3,39% de animais parasitados.

2.3 Diagnóstico

No Brasil, a maioria dos casos de fasciolose é diagnosticada em matadouros-frigoríficos fiscalizados pelos Serviços de Inspeção Federal (SIF/MARA) (FILGUEIRA et al., 2006; GOMES et al., 2006). Este diagnóstico *post mortem*, baseado na observação direta dos parasitos no fígado, é a análise mais precisa na fase aguda da doença animal, permitindo visualizar as lesões típicas no parênquima hepático (causadas pela migração das formas imaturas e

sua presença). Na fase crônica, os ductos biliares apresentam-se espessados, salientes e com calcificações (no caso de bovinos) e as formas adultas estão presentes (ECHEVARRIA, 1985).

O diagnóstico baseia-se em histórias prévias de fasciolose na propriedade, sintomatologia clínica, na ocorrência sazonal, nos tipos de climas prevalentes, identificação de habitats de caramujos, presença de ovos nas fezes (FORTES, 2004) ou pela presença do parasito no fígado e ductos biliares no exame *post mortem* (MOLLOY; ANDERSON, 2005). A fasciolose pode ser difícil de ser diagnosticada, pois os ovos podem não ser detectados nas fezes de animais infectados (FORTES, 2004).

As formas de diagnóstico possuem fatores positivos e negativos. No exame coproparasitológico não é possível detectar infecções recentes pois os ovos dos parasitos não aparecem nas fezes até 70 dias pós-infecção (REICHEL, 2002), já os testes ELISA possuem a capacidade de detectar IgG anti-*Fasciola hepatica* a partir da segunda semana pós-infecção (IBARRA et al., 1998).

Ainda que a presença de ovos nas fezes confirme a presença do parasito, novos métodos de detecção como testes de ELISA de captura coproantígenos, vêm sendo empregados para o diagnóstico da doença, principalmente em seu estágio inicial, porém não determinam informações epidemiológicas importantes para o ciclo desse parasito e nem substituem o diagnóstico por exames de fezes (KLEIMAN et al., 2005).

Estes testes são mais sensíveis que os métodos coprológicos, permitindo, assim, a detecção precoce da infecção ativa por fascíolas imaturas (DUMÉNIGO et al., 2000). No entanto, a presença do parasito revelada pela detecção de coproantígenos não implica oviposição real. Além disso, estes métodos imunológicos não fornecem informações sobre o número de ovos ou a proporção de hospedeiros definitivos espalhados no ambiente, que são variáveis importantes para estudos epidemiológicos desde a oferta de miracídios potencialmente infectantes para as populações dos hospedeiros intermediários. Portanto, métodos coprológicos fornecem informações específicas, que não podem ser substituídas por qualquer outro tipo de diagnóstico (KLEIMAN et al., 2007).

Um método coprológico frequentemente utilizado, inclui formalina e éter como solventes e centrifugação para se concentrar ovos. Este método foi

adaptado para ser usado em condições de campo e em laboratórios de diagnóstico, substituindo centrifugação por sedimentação espontânea (DENNIS; STONE; SWANSON, 1954; GROCK et al., 1998). A fim de eliminar os detritos fecais, a peneiração de fezes antes da sedimentação foi incorporada nesta técnica (ZUKOWSKI; WAYNE; MALONE, 1993; GROCK et al., 1998; ANDERSON; LUONG; VON, 1999; PARR; GRAY, 2000).

As técnicas que determinam a presença do parasito são importantes para determinar os animais positivos e selecionar um padrão de infecção. São utilizadas para o diagnóstico da fasciolose técnicas como a de Flukefinder e de quatro tamises metálicos, onde utiliza-se uma série de peneiras com diferentes malhas, tornando o diagnóstico mais caro e trabalhoso (FARIA; CURY; LIMA, 2008).

Martins et al. (2008) afirmam que a melhor técnica para diagnóstico de fasciolose, é a técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005) que se mostrou mais sensível, simples e de menor custo do que a técnica de quatro tamises.

Uma vantagem do exame de fezes em relação ao teste ELISA é que após o tratamento com triclabendazol de animais parasitados por *F. hepatica* haverá uma redução na contagem de ovos do parasito nas fezes do hospedeiro, já os níveis de anticorpos irão diminuir de forma gradativa, podendo estes serem encontrados mesmo após o tratamento (IBARRA et al., 1998). Em contrapartida uma desvantagem das técnicas coproparasitológicas é que, segundo Fairweather (2011) a contagem de ovos não se relaciona com o número de parasitos.

É importante ressaltar que no Brasil, estas técnicas sorológicas citadas ainda não estão disponíveis para avaliações populacionais, estando restritas às pesquisas experimentais, para as quais muitos kits ainda estão sob testes de validação para ovinos, bovinos e bubalinos (MATTOS; CUNHA; MARQUES, 2009).

Técnicas imunológicas como as de coproantígenos (VALERO et al., 2009) e detecção de anticorpos no soro e leite (MEZO et al., 2010a) vêm sendo utilizadas para o diagnóstico da fasciolose bovina e ovina. Quando comparado exame de fezes e o teste ELISA, o primeiro mostrou porcentagens maiores de detecção de animais positivos (IBARRA et al., 1998).

Para a investigação da presença de anticorpos contra antígenos de *F. hepatica*, no leite, pode-se utilizar amostras individuais ou um *pool* de amostras de leite (DUSCHER et al., 2011; MOLLOY; ANDERSON, 2005). Segundo Reichel (2002), esse tipo de teste pode ser utilizado com alta sensibilidade (98%) e especificidade (100%) e consegue diagnosticar a fasciolose na segunda semana pós-infecção. Sabe-se que animais parasitados por *Fasciola* apresentam queda de produção, portanto a detecção de animais positivos em amostras obtidas de tanques de armazenagem de leite depende do curso e grau de infecção individual dos animais (DUSCHER et al., 2011).

A reação cruzada entre outras parasitoses pode ocorrer, dificultando a detecção dos animais verdadeiramente infectados por *F. hepatica*, Aronstein et al. (2009) encontraram reação cruzada de antígenos de *Schistosoma mansoni* com *F. hepatica* e *Trichinella spiralis* utilizando a caracterização molecular.

2.4 Controle e Tratamento

Medidas de controle devem ser implementadas para diminuir a prevalência das metacercárias (DALTON 1999). Contudo, a indicação da drenagem de áreas em zonas endêmicas também pode ser dificultada quando essas se consistem de canais de irrigação em lavouras agrícolas (TORGERSON; CLAXTON, 1999).

O conhecimento epidemiológico sobre quando, onde e qual intensidade de risco de infecção por *F. hepatica* é essencial para o desenvolvimento de programas de controle estratégicos (KLEIMAN et al., 2007). Além disso, os animais que permanecem sem tratamento contribuem para a contaminação do pasto, através da eliminação de ovos nas fezes (GOMES et al., 2002).

A implantação de um programa de controle contra a fasciolose pode ocorrer em qualquer região ou país mediante um sistema de manejo integral bem planejado e executado que deve combinar a administração de antihelmínticos no hospedeiro no momento mais adequado de prevenir a contaminação das pastagens, a diminuição do número de hospedeiros intermediários mediante drenagem ou outras medidas agrícolas, e a redução da possibilidade de infecção

do animal mediante um bom manejo de pastagem (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, 1994).

Os programas de controle integrado recomendam medidas estratégicas preventivas associadas ao tratamento de pessoas doentes e à melhoria das condições socioeconômicas e de saneamento básico, além do uso de moluscidas. No entanto, os moluscidas acarretam prejuízos ao ambiente, e a recolonização das áreas afetadas tornam o processo de aplicação dispendioso e operacionalmente impossível de ser realizado. Estas razões levaram à necessidade de desenvolver medidas alternativas de controle. Algumas dessas medidas são baseadas na possibilidade do uso de plantas ou de seus derivados como moluscida (PILE et al., 2001b).

Este controle necessita de uma correta integração na redução do número de hospedeiros intermediários, pelo emprego de métodos químicos, físicos e biológicos. Quanto ao controle biológico, alguns autores defendem o uso de palmípedes (patos e gansos) e moluscos terrestres ou aquáticos que desempenhem algum tipo de predação sobre os limineídeos. Ainda são citados três tipos de moluscos que podem ser usados como controle biológico do *Lymnaea*: *Zonitoides nitidus* e *Oxychilus draparnaudi*, ambos moluscos terrestres, e a terceira espécie, aquática, *Physa acuta* (XIMENES et al., 1995).

É importante considerar que os medicamentos fasciolídeos empregados no controle desta parasitose sejam de fácil aplicação, baixo custo, atóxico, que não deixem resíduos e que sejam altamente eficazes no combate às formas adultas e imaturas do parasito. Além disso, adquirir animais com certificação de sanidade é de extrema importância em regiões endêmicas (CUNHA; MARQUES; MATTOS, 2007). Os benzimidazóis são os compostos antihelmínticos de amplo espectro usados na medicina veterinária e em humanos para o controle de infecções causadas por nematódeos, cestódeos e trematódeos (MCKELLAR; SCOTT, 1990). Essas drogas têm como principal mecanismo de ação uma potente inibição da formação de microtúbulos do parasito (MARTIN; ROBERTSON; BJORN, 1997).

Somente algumas moléculas dentro da família dos benzimidazóis demonstram atividade contra *Fasciola hepatica* (FAIRWEATHER, 2005). O triclabendazol é o mais eficaz devido a sua ação contra as formas jovens e adultas do parasito (BORAY et al., 1983). Todavia, há no mercado, muitos

medicamentos utilizados no tratamento de *F. hepatica* como closantel, nitroxinil, clorsulon, rafoxanida e albendazol e, apesar de terem ação restrita à forma adulta, desempenham importante papel no controle da fasciolose (FAIRWEATHER, 2011).

É comum a combinação de drogas no controle de parasitos com o intuito de tratar infecções helmínticas mistas. Essas combinações ajudam a diminuir o desenvolvimento de resistência ao medicamento (SANGSTER, 2001).

O triclabendazol pode ser comercializado associado a ivermectina, levamisol, abamectina ou moxidectina para alcançar melhor controle contra *Fasciola* e nematódeos. Esse uso combinado, especialmente quando os compostos têm ações diferentes, permite um efeito sinérgico entre as drogas e possibilita a utilização de menores concentrações do fármaco no protocolo de tratamento (FAIRWEATHER, 2011). A associação do triclabendazol e clorsulon no tratamento da fasciolose hepática diminui em 95% os parasitos, enquanto que as drogas sozinhas promovem redução de aproximadamente 30% (FAIRWEATHER; BORAY, 1999).

É importante lembrar que embora o triclabendazol possua alta eficácia contra formas adultas e jovens de *F. hepatica*, não é muito utilizado no rebanho leiteiro já que possui alto período residual no leite (SHI et al., 1989). O triclabendazol é a única opção de tratamento da fasciolose em seres humanos. Porém, nenhum caso de resistência a essa droga foi documentado a partir de casos humanos, embora a ocorrência de tais casos, provavelmente deva ser decorrente do nível de resistência nos animais que servem como reservatório e como fonte de infecção para humanos (BRENNAN; FAIRWEATHER; TRUDGETT, 2007).

O tratamento químico é considerado apropriado quando há redução de 95% na contagem de ovos nas fezes 14 dias após o tratamento no teste coproparasitológico ou a ausência de coproantígenos nas amostras de fezes coletadas 14 dias após o tratamento no teste para detecção de coproantígenos (FAIRWEATHER, 2011).

A utilização de novas técnicas pode aprimorar as indicações de controle e tratamento, assim como a pesquisa da resistência do parasito aos medicamentos específicos (FAIRWEATHER 2005). Porém, para se estabelecer um diagnóstico de resistência, dentro de uma população em relação à

determinada cepa, é importante que se realize teste controlado nos animais do estudo com infecção artificial e número fixo de metacercárias por animal além de monitorar o impacto do tratamento medicamentoso por uma série de testes. É essencial que os resultados e conclusões não sejam baseados em apenas um teste, para não gerar informações erradas (FAIRWEATHER, 2011).

Como o triclabendazol é o antihelmíntico mais utilizado contra *F. hepatica*, seu uso gerou um processo de seleção de cepas e surgimento de populações de parasitos resistentes a essa droga (FAIRWEATHER, 2005) exigindo a criação de drogas alternativas que possuam atividade semelhante ao mesmo (FAIRWEATHER, 2011). Além disso, subdosagem e armazenamento inadequado do anti-helmíntico pode explicar a falha no tratamento (HANNA et al., 2015).

Alvarez et al. (2009) realizaram teste *in vitro* do efeito do triclabendazol, sulfóxido de triclabendazol, albendazol e sulfóxido de albendazol sobre ovos de cepas resistentes e suscetíveis de *F. hepatica*, e mostraram que o albendazol e sulfóxido de albendazol tiveram um efeito inibitório sobre o desenvolvimento de ovos enquanto o triclabendazol e sulfóxido de triclabendazol, que são normalmente usados no controle da fasciolose, não afetaram a eclosão de ovos mesmo na população de cepas suscetíveis aos compostos.

O uso de medicamentos anti-helmínticos sintéticos, em virtude ao alto custo dos produtos convencionais, faz com que os produtores utilizem subdosagens ou periodicidade inadequada o que conseqüentemente está sendo determinante à resistência dos parasitos a vários compostos ativos, dificultando desta forma o controle das parasitoses entre os animais de produção. Além disso, o uso de fitoterápicos pode contribuir para aumentar os lucros da criação, uma vez que reduz o uso de anti-helmínticos convencionais e estende a vida útil dos produtos sintéticos disponíveis (VIEIRA et al., 1999).

Não se sabe ao certo quando se iniciou o uso de plantas medicinais e aromáticas com propósitos curativos. O descobrimento das propriedades curativas das plantas foi no início pela observação dos animais que quando doentes, buscavam nas ervas a cura para as suas afecções (OLIVEIRA; SILVA, 1994).

No Brasil, fazem parte do arsenal terapêutico nacional pelo menos 300 plantas reconhecidamente com propriedades medicinais (GIULIETTI; FORERO,

1990) ainda que, muitas vezes desconhecidas, desacreditadas ou simplesmente, não aceitas como alternativa pelos médicos, são consumidas pela população (LORENZI; MATOS, 2002).

Diante da importância da fitoterapia, torna-se necessário estudar e aprofundar os efeitos terapêuticos das plantas inseridas no contexto agroecológico e social da população, pois mudanças no uso da terra devido à urbanização podem destruir o habitat das plantas úteis. Desta forma, a perda do conhecimento medicinal tradicional em uma cultura que submetida a uma mudança rápida é tão irreversível quanto a perda da espécie da planta. Conseqüentemente, esforços devem ser feitos para documentar o uso medicinal das plantas antes que muitas destas sejam eliminadas, ou ainda que curandeiros abandonem suas práticas médicas (JOSHI; JOSHI, 2000).

O uso de plantas medicinais pode constituir alternativa eficaz no controle de parasitas gastrintestinais. Muitas plantas são, tradicionalmente, conhecidas como possuidoras de atividade anti-helmíntica, necessitando, contudo, que suas eficácias sejam cientificamente comprovadas. Para que a eficácia de uma planta seja comprovada, é necessária a validação científica dos fitoterápicos que é a etapa inicial obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos. Os testes *in vitro* permitem uma avaliação da existência de propriedades anti-helmínticas nos extratos vegetais, e constituem uma etapa preliminar à caracterização de novos compostos ativos presentes nos vegetais, possibilitando desta forma, a criação de novas alternativas para o controle das parasitoses (COSTA et al., 2002).

2.5 Extratos Vegetais

A utilização de extratos vegetais para fins medicinais tem mostrado maior interesse nos últimos anos. Carvalho et al. (2008) mostraram em seu estudo que no Brasil encontram-se registrados 512 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas. As matérias-primas destes produtos são constituídas por extratos secos, que apresentam maior estabilidade química, físico-química e microbiótica, elevada capacidade de

transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas, maior concentração de compostos ativos e maior facilidade na padronização.

No México, algumas plantas foram identificadas como promissoras no controle de *Fasciola hepatica*, causando mortalidade de 100% em testes *in vitro* no primeiro dia de avaliação, como *Achillea millefolium*, *Castela tortuosa*, *Justicia spicigera*, *Mentha piperita* e *Populus alba* (IBARRA et al., 2012). Pereira et al. (2016) utilizaram o extrato bruto liofilizado a partir das folhas de *Momordica charantia* L. (Melão de São Caetano) e suas sub-fracções, obtidos a partir de partição líquido-líquido com solventes orgânicos, foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Os ovos foram incubados com concentrações acima de 12,5 mg / mL que afetou o desenvolvimento embrionário, apresentando a inibição da formação miracidios mostrando uma eficácia de até 90%.

Tendo em vista a falta de estudos sobre a eficácia de extratos com atividade fasciolicida, foi realizada uma revisão com plantas medicinais encontradas no Brasil e que tem ação sobre microorganismos. Na tabela 1 encontram-se os extratos utilizados e suas principais funções dentro da medicina, sendo eles *Harpagophytum procumbens* (Raiz de Garra do diabo); *Uncaria guianensis* (Unha de gato); *Psidium guajava* L. (goiabeira); *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão); *Guapira opposita* (Maria Mole); *Guapira noxia* (Guapira do Cerrado); *Guapira Graciliflora* (João Mole); *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e *Momordica charantia* L. (Melão de São Caetano).

Tabela 1: Extratos vegetais utilizados neste estudo com suas respectivas famílias, espécies, nome popular e as atividades de cada extrato baseadas em evidências da literatura.

Família	Espécie	Nome popular	Partes usadas	Atividades
Leguminosae-Mimosoideae	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão	Casca e Folhas	Controle de parasitoses e vetores. Sua ação resulta na capacidade de complexação com proteínas e do seu poder de sequestrar íons metálicos, principalmente ferro, essenciais ao desenvolvimento de microorganismos (SCALBERT, 1991).
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora L.</i>	Pitanga	Folhas	Ação antimalárica em camundongos e diversos extratos da folha apresentaram em testes <i>in vitro</i> , atividade tripanosomicida (ADEWUMNI et al., 2001).
Myrtaceae	<i>Psidium guajava L.</i>	Goiabeira	Folhas	Capacidade de atividade antimicrobiana, antimutagênica e atividade hipoglicêmica (AMARAL et al., 2006). Resultados promissores, para a atividade antibacteriana (ABDELRAHIM et al., 2002), antifúngica (HOLTEZ et al., 2002) e contra <i>Entamoeba histolytica</i> (TONA et al., 1998).
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia L.</i>	Melão de São Caetano	Folhas	Araújo-Lima (2002) indicaram o melão de São Caetano como plantas medicinais com ação sobre parasitos.
Nyctaginaceae	<i>Guapira graciliflora</i>	Maria-mole e pau-pirinha.	Folhas	Efeito cicatrizante (COELHO et al., 2005).
Nyctaginaceae	<i>Guapira opposita</i>	Maria-mole, pau-pirinha branco.	Folhas	Atividade antimicrobiana contra <i>Cladosporium cladosporides</i> (MORENO et al., 2004).
Nyctaginaceae	<i>Guapira noxia</i>	Pão-judeo, João-mole, capa-rosa, João-mole-do-campo.	Folhas	Estudos revelaram as atividades antiúlcera, anti-inflamatória, antimicrobiana e moduladora do sistema imunológico com os extratos dessa espécie (SEVERI, 2007).
Rubiaceae	<i>Uncaria guianensis</i>	Unha de gato	Casca	A atividade terapêutica do fitoterápico <i>U. tomentosa</i> é de antiinflamatória e modulador do sistema imunológico (SETTY; SIGAL, 2005).
Pedaliaceae	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Garra do Diabo	Raiz	Atividade antiinflamatória (CHANTRE et al., 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Localização do Experimento

As coletas para este experimento foram realizadas em matadouros-frigoríficos da região Sul do estado do Espírito Santo, com devida autorização prévia. Os ovos de *Fasciola hepatica* foram retirados diretamente do líquido biliar presente na vesícula biliar dos animais diagnosticados como positivos no exame *post mortem*. Para a armazenagem dos ovos foram utilizados vidros transparentes, nos quais foi condicionada a bile e estes foram encaminhados ao laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.2 Preparo do Material Vegetal para realização dos testes *in vitro*

Para a realização dos testes *in vitro*, foram utilizados extratos vegetais disponíveis no Laboratório de Produção Farmacêutica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da UFES, o qual foi instituído Profa. Dra. Juliana Aparecida Severi. A escolha foi realizada com base na disponibilidade de droga vegetal, de extrato bruto e/ou facilidade de acesso durante a coleta para obtenção de material em quantidade compatível com o requerido para execução de todas as etapas propostas neste projeto.

O procedimento de preparação do material vegetal ocorreu de forma semelhante para todas as espécies vegetais. Sucintamente, realizou-se a coleta em ambiente preferencialmente nativo, no período da manhã, a partir de exemplares adultos e sadios. Uma porção fértil foi selecionada para a confecção de exsiccatas e posterior depósito em Herbário para documentação. O restante do material foi separado manualmente de possíveis interferentes e inspecionado quanto à integridade das respectivas partes (cascas, raízes ou folhas), após desprezadas aquelas que apresentassem algum tipo de dano. Em seguida, foram higienizados em água corrente para a remoção de sujidades e submetidos à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 45° C. Posteriormente,

realizou-se a moagem em moinho de facas, com malha de 0,5 mm, a fim de obter um pó fino para extração. Além disso, algumas plantas foram provenientes de uma parceria firmada entre a pesquisa e o grupo Centroflora-Anidro do Brasil, localizado no município de Botucatu-SP.

Os procedimentos de extração variaram conforme a natureza da droga vegetal, tendo sido empregadas as técnicas de percolação e maceração. Na percolação uma alíquota da droga vegetal foi previamente intumescida com o líquido extrator e então transferida para o percolador. A extração ocorreu por meio da aplicação contínua de líquido extrator renovado no topo do percolador até a remoção completa dos compostos presentes. A maceração, por sua vez, consistiu na mistura do líquido extrator com a droga vegetal em proporções previamente definidas. A mistura foi mantida em recipiente fechado, durante um período de tempo definido (dois a três dias), sob a agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Após o período de extração, a mistura foi filtrada em papel filtro e o resíduo vegetal foi remacerado por mais duas vezes. Após a extração, as soluções extrativas resultantes foram concentradas em rotaevaporador (Laborata 4000 Heidolph) em temperatura inferior a 45°C. Para secagem completa dos extratos, as amostras foram transferidas para frascos de vidro previamente pesados e congeladas para que fosse feita a liofilização da água residual, sendo obtidos assim os extratos brutos secos.

Para os testes com as partes aquosas, realizou-se a extração líquido-líquido (partição) dos mesmos extratos a fim de remover pigmentos lipofílicos eventualmente interferentes. Alíquotas de 1 g do extrato bruto seco foram solubilizadas com 250 mL de água deionizada. A mistura foi transferida para funil de separação e a este foi adicionado 250 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada cuidadosamente por inversão e então mantida em repouso até observação de separação de fases. A fase orgânica foi coletada e levada à secagem em capela de exaustão, enquanto que a fase aquosa foi congelada e seca por liofilização. Após secagem, realizou-se o preparo das soluções das frações aquosas à 0,1%, 0,25% e 0,5%.

Antes da realização dos testes com a parte aquosa dos extratos vegetais, foi realizado um teste com extratos vegetais brutos para a determinação da eficácia destes e assim selecionar os mais adequados.

3.3 Atividade *in vitro* da eficácia dos extratos vegetais sobre ovos de *Fasciola hepatica*

Os ensaios de avaliação da atividade fasciolicida sobre os ovos foram inicialmente realizados com os extratos brutos em solução aquosa. Desta forma, pesou-se alíquotas dos extratos brutos em balança semi-analítica (AY220 Marte) e realizou-se a solubilização em água deionizada, com auxílio de banho ultrassônico (Sonielean 6 Sanders) para obtenção de soluções a 0,1%, 0,25% e 0,5%, em quantidade compatível para a execução do ensaio biológico em triplicata.

Em seguida, realizou-se a extração líquido-líquido (partição) dos mesmos extratos. A avaliação da atividade fasciolicida foi realizada conforme a metodologia de Fairweather et al. (2012). Os ovos foram submetidos à sedimentação, para que desta forma fosse possível separar o máximo possível dos ovos da bile. Para a sedimentação foram usados cálices de sedimentação e o material foi lavado por 5 vezes, até que o conteúdo se tornasse límpido. Terminado o processo de sedimentação, os ovos foram submetidos à contagem. Para isso, foi necessário pipetar 1mL do conteúdo do cálice para a determinação da quantidade de ovos. Para uma padronização, foi utilizado o cálculo da quantidade de ovos por mL, usando a média aritmética, onde eram calculados as médias de três amostras para a determinação da quantidade de ovos. Assim que foi determinada a quantidade de ovos por amostra, os 100 ovos foram depositados em tubos tipo Falcon de 50 mL. Juntamente com os ovos, foram adicionados 3 mL do extrato vegetal a ser testado. Para um melhor resultado, foram realizadas triplicatas de cada amostra testada. Para controle positivo, utilizou-se albendazol na concentração de 0,5%. Para a determinação da melhor concentração de albendazol a ser utilizada neste experimento, foram realizados ensaios experimentais em ovos de *Fasciola hepatica*, onde a concentração de 0,5% foi considerada ideal para o combate da eclosão de miracídios. Para controle negativo utilizou-se água de torneira.

Os tubos foram embalados em papel alumínio, para que os ovos não tivessem contato com a luz ambiente. Estes foram encaminhados para uma estufa de demanda de oxigênio tipo B.O.D., onde permaneceram por 14 dias a uma temperatura controlada de 25° C. Passados os 14 dias, os ovos foram

retirados da B.O.D. para realização da análise e expostos a luz incandescente de 100W por 3 horas (FAIRWEATHER et al.,2012). Os ovos foram analisados e contados a cada hora, durante 3 horas, com o auxílio de microscópio estereoscópio no aumento de 2x vezes.

3.4 Análise microscópica dos ovos

Ao fim das análises de eclosão, os ovos foram pipetados e depositados em lâminas, juntamente com água, e cobertos com lamínula, para que fossem avaliados morfológicamente. Foram observados tamanho, conservação da parede externa, formação ou não de miracídios e abertura ou não do opérculo, por meio de microscopia óptica, usando as objetivas de 40x e de 100x.

3.5 Análise Fitoquímica

A caracterização qualitativa da composição química dos extratos foi realizada com base nos protocolos sugeridos por Matos (2009) e Wagner (1984), com algumas modificações. Os testes realizados apresentam o objetivo de confirmar a presença ou não de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, glicosídeos cardiotônicos, alcaloides e saponinas.

Para a detecção de compostos fenólicos, adicionam-se três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico em um tubo de ensaio contendo a solução hidroalcoólica da amostra. Qualquer variação de cor ou formação de precipitado abundante escuro indica teste positivo. O controle utilizado foi somente água e solução alcoólica de cloreto férrico. O aparecimento de coloração variável entre o azul e vermelho é indicativa da presença de fenóis. Neste caso, houve positividade em todos os extratos testados.

Empregou-se testes como o de cloreto de alumínio que indica a presença de flavonoides através de intensificação da fluorescência e mudança da cor para verde-amarelado. Outro teste realizado foi o de Taubouk que também utiliza fluorescência e mudança de coloração quando houver presença de flavonoides. O teste de Shinoda indica flavonoides presentes quando ocorre mudança de cor

para rosa-avermelhado devido a formação de cianidina. O teste Pew produz coloração vermelho-violeta na presença dos flavonoides. No teste Pacheco mostra com a mudança de coloração para vermelho a presença de dihidroflavonois, já as flavonas, chalconas, auronas, flavonóis e flavonas não apresentam mudança de cor.

A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (hidrolisáveis) e de tonalidade verde, a presença de taninos flavofênicos (condensados ou catéquicos). Utilizou-se a Gelatina a 2% para observar se houve formação de precipitado floculoso indicando a presença de taninos. No teste com cloreto férrico a 1% foi possível observar a presença de taninos hidrolisáveis com a formação da cor azul e a de taninos condensados com a cor verde. No teste com acetato de chumbo a 10% foi possível observar a formação de um precipitado esbranquiçado na presença de taninos hidrolisáveis. Quando testado o acetato de cobre a 4% também houve formação de precipitado na presença de taninos.

Foi realizado o teste utilizando hidróxido de potássio a 10% que indica presença de cumarinas quando a amostra é exposta a luz ultravioleta e apresenta uma fluorescência azul-esverdeada.

O teste de Liebermann-Buchard identifica através do aparecimento da coloração azul ou verde quando há núcleo esteroidal, enquanto a coloração rosa ou violeta indica núcleo. Neste teste, no béquer contendo a solução hidroalcoólica da amostra evaporada adiciona-se 1-2 mL de clorofórmio e 1 mL de anidrido acético, agitando suavemente, e cuidadosamente, acrescentam-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres. No teste de Pesez através do uso de ácido fosfórico sob luz UV observou-se a formação de precipitado amarelo-esverdeado fluorescente quando na presença de glicosídeos cardiotônicos. O teste de Keller-Kiliani utilizou FeCl_3 a 5% para observar se houve formação de cor castanho-avermelhada no anel e azul na fase acética o que indica presença de desoxioses livres nas extremidades.

Para observar a presença de saponinas, ao material contido no béquer contendo a solução da amostra evaporada foram adicionados 5-10 mL de água

destilada e filtrou-se para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente por 2-3 minutos e observou-se a possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos). O teste de atividade hemolítica observou a indicação de saponinas através da obtenção de halos de hemólise no ágar-sangue, quando comparados ao padrão de saponina.

Para a pesquisa de alcaloides, a amostra foi dissolvida em HCl 0,1 M e dividida em três tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcaloides: Dragendorff, Mayer, Bertrand, Wagner e Sonnenschein, observando a formação de precipitado característico. Precipitado floculoso, pesado em pelo menos um dos tubos é indicativo de alcaloides.

3.6 Análise estatística

Para a determinação da eficácia de cada extrato vegetal, foram realizados cálculos de eficácia, utilizando-se a seguinte fórmula: % eficácia = (média do grupo controle negativo - média do grupo tratado com extrato/ média do grupo controle negativo) x 100.

Os resultados das três repetições de cada extrato vegetal, nas horas 1, 2 e 3, foram comparados por meio de cálculo estatístico realizado por Delineamento inteiramente casualizado no esquema de parcelas subdivididas 4x3 (3 tratamentos + controle x 3 momentos). Os dados foram submetidos à análise de variância de $p < 0,05$, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo do Material Vegetal para realização dos testes *in vitro*

Para um tratamento anti-helmíntico ser eficiente nos testes de eclosão de ovos, o ideal é que se tenha um produto que impeça a continuidade da fase de blastomeração. Este produto deve alterar o desenvolvimento normal dos ovos, impedindo que os mesmos eclodam, liberando as larvas que irão se tornar infectantes (POWERS et al., 1982).

Neste experimento, os extratos vegetais na forma bruta que impossibilitaram a eclosão dos miracídios dos ovos de *Fasciola hepatica*, foram submetidos à partição onde estes foram testados quanto à sua eficácia. Segundo Powers et al. (1982), para parasitos adultos, um produto seria altamente efetivo se apresentasse mais de 90% de ação contra o parasito tratado, moderadamente efetivo quando atuasse entre 80 a 90%, pouco efetivo quando a ação fosse entre 60 e 80% e não efetivo em níveis abaixo de 60%.

Para a execução deste trabalho, foram selecionadas o total de 10 espécies vegetais. As espécies nativas foram originárias de coletas em diferentes localidades dos estados de São Paulo e Espírito Santo. Os extratos brutos testados nas concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5%, foram *Harpagohytum procumbens* (Garra-do-diabo), *Guapira graciliflora* (João Mole), *Guapira opposita* (Maria Mole), *Guapira noxia* (Guapira do Serrado), *Uncaria guianensis* (Unha de gato), *Psidium guajava* L. (Myrtaceae), *Momordica charantia* L. (Melão de São Caetano), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Eugenia uniflora* L. (pitanga). As espécies exóticas, que não dispõem de cultivo padronizado no Brasil tiveram procedência comercial junto à empresa especializada do setor (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição e procedência das espécies vegetais utilizadas no ensaio fasciolicida.

Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Sigla	Local de coleta	Registro
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro	Casca	CAO	Jerônimo Monteiro-ES	VIES30551
		Folha	FAO	Jerônimo Monteiro-ES	VIES30551
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitangueira	Folha	FEU	Jerônimo Monteiro-ES	VIES30550
<i>Guapira graciliflora</i>	João Mole	Folha	GG	Itirapina-SP	UEC1441
<i>Guapira noxia</i>	Guapira do Cerrado	Folha	GN	Botucatu-SP	UEC145.858
<i>Guapira opposita</i>	Maria Mole	Folha	GO	Itapetininga-SP	UEC1437
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Garra do diabo	Raiz	RHP	Centroflora-SP	-
<i>Momordica charantia</i>	Melão de São Caetano	Folha	MSC	Alegre-ES	-
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	Folha	FPG	Jerônimo Monteiro-ES	VIES30552
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão	Casca	CSA	Centroflora-SP	-
<i>Uncaria tomentosa</i>	Unha de gato	Casca	CUT	Centroflora-SP	-

Solventes polares são aqueles que as moléculas constituintes apresentam regiões eletronicamente densas e que desta forma possuem facilidade em solvatar (criar uma camada sobre o soluto) quaisquer substâncias de características também polares (VOGEL, 1983). Sendo assim, a melhor escolha, para o processo de extração utilizado neste trabalho, foi o uso de solventes polares como líquido extrator. Essa escolha potencializou o processo extrativo e garantiu a qualidade do extrato bruto final. Neste estudo foi utilizado como líquido extrator o álcool etílico PA.

Dentre os 10 extratos brutos nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5%, que foram significativamente diferentes do controle feito com água e albendazol 0,5%, cinco determinaram inibição de desenvolvimento larval ou inibição de eclosão de ovos, podendo ser citados RHP- Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*); FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.);

FEU- Folhas de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e MSC- Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.). Os demais extratos, foram dependentes da concentração, ou seja, não impediram a eclosão em todas as concentrações testadas no experimento, como CUT- Casca de Unha de gato (*Uncaria guianensis*); FSA- Folhas do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); GO- *Guapira opposita* (Maria Mole); GN- *Guapira noxia* (Guapira do Cerrado); GG- *Guapira graciliflora* (João Mole) (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da eclodibilidade de ovos de *Fasciola hepatica* após incubação com extratos vegetais brutos testados nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5%, em 3 horas de experimento.

Extrato vegetal bruto	HORA 1			HORA 2			HORA 3		
	am 1	am 2	am 3	am 1	am 2	am 3	am 1	am 2	am 3
RHP 0,1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,25%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,50%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CUT 0,1%	E	E	E	E	E	E	E	E	E
0,25%	NE	NE	NE	NE	NE	E	NE	E	E
0,50%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
FPG 0,1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,25%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,50%	NE	NE	NE	E	E	E	E	NE	E
FSA 0,1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,25%	NE	E	E	NE	E	E	NE	E	E
0,50%	NE	NE	NE	NE	E	E	E	E	E
GO 0,1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,25%	NE	NE	E	E	E	E	E	E	E
0,50%	NE	NE	E	E	E	E	E	E	E
GN 0,1%	NE	NE	NE	E	E	E	E	E	E
0,25%	NE	NE	NE	E	E	E	E	E	E
0,50%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
GG 0,1%	NE	NE	NE	E	NE	E	E	E	E
0,25%	NE	E	NE	E	NE	E	E	E	NE
0,50%	NE	NE	E	E	E	E	E	E	E
FEU 0,1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,25%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,50%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CSA 0,1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,25%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,50%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
MSC 0,1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,25%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
0,50%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
H2O	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Albendazol 0,5%	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

NE- Ovos não eclodidos. E- Ovos eclodidos. Am- Amostra. RHP- Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*); CUT- Casca de Unha de gato (*Uncaria guianensis*); FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.); FSA- Folhas do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); GO- *Guapira opposita* (Maria Mole); GN- Guapira do Cerrado (*Guapira noxia*); GG- João Mole (*Guapira graciliflora*); FEU- Folhas de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e MSC- Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.).

Os extratos vegetais submetidos à partição para obtenção das partes aquosa e orgânica, foram RHP- Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*), nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5%; CUT- Casca de Unha de gato (*Uncaria guianensis*) na concentração de 0,5%; FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.) nas concentrações de 0,1% e 0,25%; FSA- Folhas do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) na concentração de 0,1%; GO-Maria Mole (*Guapira opposita*) 0,1%; GN- *Guapira noxia* 0,5%; CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5% e MSC- Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) também nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5%. Esses extratos foram analisados, onde o número de eclosão foi contado para o teste de eficácia.

Os extratos vegetais que foram submetidos à partição, foram analisados por meio de cálculos de eficácia, e aqueles que demonstraram 90% ou mais de ação, foram considerados altamente efetivos, como é o caso do RHP 0,25% e 0,50%, CSA 0,1%, 0,25% e 0,5%, FEU 0,1%, FPG 0,10%, 0,25% e 0,5%, e FSA 0,1%, 0,25% e 0,5%. Os que atuaram entre 80 a 90% foram considerados moderadamente efetivos, como é o caso do RHP 0,10%. O número de eclosão em cada uma das três horas analisadas e a porcentagem da eficácia podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4: Avaliação quantitativa da eclodibilidade de ovos de *Fasciola hepatica* após incubação com extratos vegetais em 3 horas de experimento, e porcentagem da eficácia de cada um.

Extr. Bruto	HORA 1			HORA 2			HORA 3			Porcentagem da eficácia
	am 1	am 2	am 3	am 1	am 2	am 3	am 1	am 2	am 3	
RHP 0,1%	0	0	0	10	12	10	10	12	18	88,20%
0,25%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,5%	0	0	0	2	22	0	2	22	0	92,92%
CSA 0,1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
FEU 0,1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
FPG 0,1%	0	0	0	1	0	1	1	0	1	99,41%
0,25%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
FSA 0,1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	0	0	0	1	0	2	1	0	2	99,11%
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
H2O	57	48	30	116	102	121	116	102	121	-
Albendazol 0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

Am- amostra; RHP- Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*); FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.); FSA- Folhas do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); FEU- Folhas de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*).

Nos extratos vegetais RHP, CSA, FEU, FPG e FSA foi constatado que não houve diferença significativa entre as três concentrações testadas, diferindo significativamente apenas do grupo controle com água ($p < 0,05\%$). Isso mostra que estes foram eficazes contra a eclosão de miracídios de *Fasciola hepatica*, como mostra a tabela 5.

Tabela 5 - Média de eclosão para cada concentração avaliada da parte aquosa dos cinco extratos vegetais utilizados no ensaio fasciolicida.

Extratos Vegetais	Concentrações	Médias de eclosão em 3 horas
RHP	0,10%	8.88667 a
	0,25%	0.00000 a
	0,50%	5.33333 a
	Água	90.33334 b
	F _{interação}	13.649
	P	0.0016
CSA	0,10%	0.00000 a
	0,25%	0.00000 a
	0,50%	0.00000 a
	Água	90.33334 b
	F _{interação}	15.882
	P	0.0009
FPG	0,10%	0.44000 a
	0,25%	0.00000 a
	0,50%	0.00000 a
	Água	90.33334 b
	F _{interação}	15.829
	P	0.0009
FSA	0,10%	0.00000 a
	0,25%	0.66667 a
	0,50%	0.00000 a
	Água	90.33334 b
	F _{interação}	15.801
	p	0.0009
FEU	0,10%	0.00000 a
	Água	90.33334 b
	F _{interação}	15.882
	p	0.0163

Medias seguidas por mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); RHP- Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*); FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.); FSA- Folhas do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); FEU- Folhas de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)

4.2 Análise Microscópica dos ovos

Após serem incubados e submetidos à análise, os ovos contendo a parte aquosa dos extratos considerados altamente efetivos, utilizando-se os índices propostos pela World association for the advancement of veterinary parasitology

(W.A.A.V.P.) (POWERS et al., 1982), foram avaliados por microscopia óptica para que fossem determinadas as modificações externas e internas que pudessem ter sido causadas pelo uso dos diferentes extratos vegetais.

A água não impede a eclosão dos miracídeos dos ovos de *Fasciola hepatica*, fazendo desta forma que os opérculos ficassem abertos, como pode ser observado na figura 1A e B.

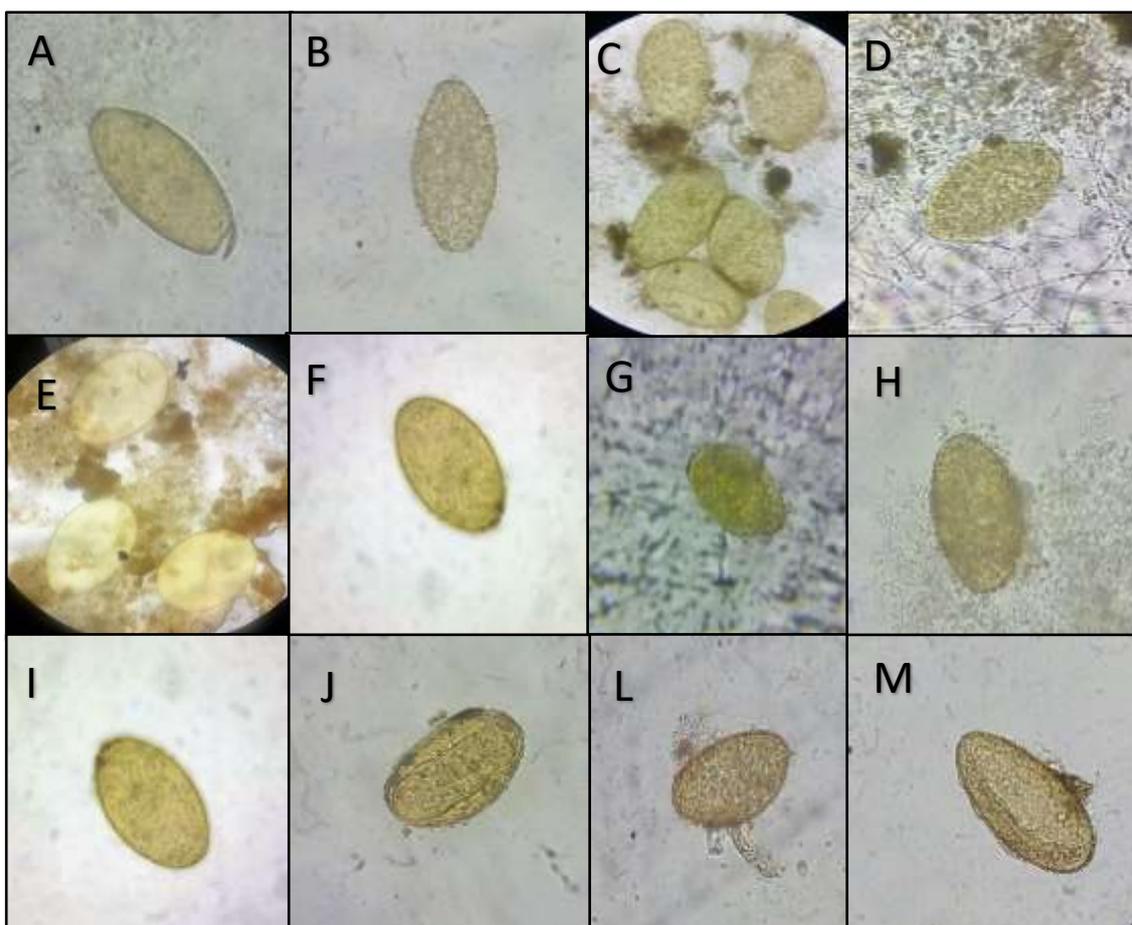


Figura 1: **A**, ovo sob o efeito da água; **B**, ovo submetido ao albendazol 0,5%; **C** e **D**, ovos de *Fasciola hepatica* sob a ação do extrato de folhas de *Psidium guajava* L, nas concentrações 0,25% e 0,5% respectivamente; **E**, **F** e **G**, ovos sob a ação das folhas *Stryphnodendron adstringens* nas concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5% respectivamente; **H**, ovo de *F. hepatica* sob a ação da parte aquosa do extrato da raiz de *Harpagophytum procumbens*; **I**, ovo de *F. hepatica* sob a ação da parte aquosa do extrato de folha de *Eugenia uniflora*; **J**, **L** e **M**, ovos sob a ação do extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens*, nas concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5% respectivamente.

O albendazol na concentração de 0,5%, usado como controle positivo, ao contrário da água, faz com que os ovos se tornem inviáveis à eclosão. O efeito de benzimidazóis em ovos de nematóides tem sido bem caracterizado. A ação ovicida de desse anti-helmintico está relacionada a sua capacidade de penetrar

na casca do ovo e se acumular em seu interior. A droga previne o embrionamento impedindo a divisão celular inicial. Como os miracídios se movem por cílios, qualquer anormalidade em sua formação induzida por drogas, impedem o processo de eclosão (RINAILD et al.,2009).

Segundo Coles e Stafford (2001) o albendazol apresentou excelente atividade ovicida contra ovos de *Fasciola hepatica* e concordam com alguns resultados de eficácia clínica que demonstraram que albendazol é ativo contra *F. hepatica* madura (Figura 1B).

O uso da parte aquosa do extrato das folhas *Psidium guajava* L. nas concentrações, 0,25% e 0,5% fizeram com que os ovos se tornassem inviáveis, sem as formações de miracídios em seu interior, porém sua superfície não foi modificada (Figura 1C e D).

A utilização da parte aquosa do extrato das folhas *Stryphnodendron adstringens* nas concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5%, também fizeram com que os ovos se tornassem inviáveis, não houve visualização de formações de miracídios em seu interior e sua superfície não foi modificada como pode ser visto na figura 1 E,F e G .

O uso da parte aquosa do extrato da raiz de *Harpagophytum procumbens* na concentração de 0,25% apresentou eficácia contra a eclosão dos ovos. Também não houve observação de formação de miracídios, a forma do ovo não foi danificada e ele apenas apresentou-se inviável à eclosão como observado na figura 1H.

O extrato de folhas de *Eugenia uniflora* na concentração de 0,1% apresentou eficácia contra a eclosão. Na figura 1I é possível ver como ficou o ovo de *Fasciola hepatica* quanto a sua estrutura, depois de ser submetido á parte aquosa desse extrato vegetal. Neste caso, não houve observação de formação de miracídios, a forma do ovo não foi danificada e ele apenas apresentou-se inviável à eclosão.

A parte aquosa do extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens* nas concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5%, foram eficazes no impedimento das eclosões, sendo que na concentração de 0,1% houve a formação do miracídio, porém este não foi eclodido, e nas concentrações 0,25% e 0,5% os ovos se tornaram inviáveis para eclosão (Figura 1J, L e M).

De uma forma geral, no presente estudo, a utilização de extrato vegetal *in vitro* sobre os ovos de *Fasciola hepatica* em diferentes concentrações demonstraram que nem todas as superfícies dos ovos foram modificadas, assim como seu interior. Isso foi percebido no trabalho de Taha et al. (2014) que realizaram a análise da morfologia de ovos de *Fasciola hepatica* sob ação de hipoclorito de sódio, e no estudo feito por Fairweather et al. (2012), que realizaram uma comparação da eclodibilidade dos ovos com o uso de benzimidazóis.

Os ovos foram claramente alterados, sendo observado a não formação de miracídios no interior dos ovos, invaginações em sua superfície, redução do tamanho do ovo, fragmentações e em alguns casos, mesmo com miracídios formados, estes ficaram inviáveis e permaneciam no interior dos ovos, impedindo desta forma a eclosão (Figura 1).

4.3 Análise Fitoquímica

Os extratos vegetais na forma bruta foram submetidos aos testes fitoquímicos. Nos testes realizados na avaliação fitoquímica foi possível identificar a presença de compostos ativos nos extratos estudados. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos com as reações de identificação positiva para cada classe dos compostos testados com todos os extratos em sua forma bruta.

Classe de composto	Ensaio realizado	Resultado positivo observado
Alcalóides	Dragendorff Bertrand Sonnenschein	CUT
Compostos fenólicos	FeCl ₃ 5%	RHP, CUT, FPG, CSA, FSA, GG, GN, GO, MSC
Flavonoides	AlCl ₃ 5% Pacheco Shinoda Pew Taubouk	CUT, RHP, FPG, CSA, FSA GO, GN, GG
Heterosídeos cardioativos	Pesez Keller-killiani	Negativo
Saponinas	Formação de espuma estável Atividade hemolítica	GG, GN, GO, MSC
Taninos	Gelatina 2% Pb(AcO) ₂ FeCl ₃ 1% Cu(AcO) ₂	FPG ¹ , CSA ² , FSA ²
Terpenóides	Liebermann-B.	RHP, CUT, FPG, CSA, FSA, GG, GN, GO, MSC

RHP- Raiz de Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*); CUT- Casca de Unha de gato (*Uncaria guianensis*); FPG- Folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.); FSA- Folhas do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); GO- *Guapira opposita*; GG- *Guapira graciliflora*; GN- *Guapira noxia*; CSA- casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e MSC- Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.). ¹ T.hidrolisáveis, ² T. condensados, ³ Núcleo esteroidal, * Núcleo terpênico.

Na avaliação de compostos fenólicos todos os extratos estudados apresentaram indicativo de presença no teste com cloreto férrico a 5%. A atividade antioxidante apresentada por vários vegetais, incluindo frutos, folhas, sementes e plantas medicinais, está correlacionada ao seu teor de compostos fenólicos totais (VELIOGLU et al., 1998).

A análise fitoquímica do extrato das raízes de *Harpagophytum procumbens* (Garra do diabo) demonstrou a presença de compostos fenólicos e terpenóides. A literatura mostra que os principais constituintes encontrados nas raízes são os iridóides. Tais constituintes são metabólitos secundários derivados da via do mevalonato (monoterpênicos) e são denominados iridóides por derivarem do iridodial, composto isolado nas formigas da Austrália (*Iridomyrmex*). Dentre os iridóides, o principal princípio ativo é o harpagosideo,

isolado em 1962, sendo o composto responsável pelas propriedades terapêuticas da planta, cujo conteúdo na droga vegetal é de 0,5-1,6% (ROSA, 2007). Posteriormente, em 1964 foi isolada a procumbina e em 1983 foram isolados mais três heterosídeos iridóides da garra do diabo, diferenciados entre si pelo tipo de açúcar em que estão ligados (CARVALHO, 2004).

Já os compostos fenólicos relatados na espécie pertencem ao grupo dos fenilpropanóides derivados do ácido cafeico. Também foram encontrados dois flavonoides (luteolina e o kaempferol), a quinona harpagoquinona, dois fitosteróis (estigmasterol e β -sistosterol), alguns triterpenos, sendo os principais os ácidos ursólico, 3- β -acetiloleanólico e o oleanólico, e também alguns minerais, principalmente zinco, silício, selênio, fósforo, potássio, manganês, magnésio, ferro, cromo e cálcio. Os carboidratos estão presentes na planta em cerca de 50%, sendo o principal o tetrasacarídeo estachiose em 46%, e outros em pequenas quantidades como rafinose e sacarose (CARVALHO, 2004).

A pesquisa com o extrato das cascas *Uncaria tomentosa* (Unha de gato) revelou a presença de compostos fenólicos, dentre eles flavonóides. Também apresentou resultado positivo na pesquisa de terpenóides e alcalóides. Estes dados estão de acordo com a revisão de Potawale et al. (2008), que mostra que a planta é composta principalmente por alcaloides do tipo oxindólicos tetra e pentacíclicos (mitrafilina, isomitrafilina, riconfilina, isopteropodina, uncarina, hisrutinam, dentre outros), acompanhados de flavonoides, ácidos fenólicos, diterpenos e esteroides. Estes compostos têm um vasto leque de propriedades biológicas, incluindo efeitos tão diversos como atividades quimioprotetoras, em situações antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, antihiperlipidêmicas, anti-inflamatórias e antiparasitárias.

A análise fitoquímica do extrato das folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.) mostraram que estas possuem compostos fenólicos, dentre eles flavonoides e taninos, além de terpenóides. Wang et al. (2014) mostram que as folhas são constituídas por grandes quantidades de compostos fenólicos, incluindo ácido gálico, catequina, epicatequina, rutina, quercetina e derivados monoheterosídicos. Apresenta ainda óleo essencial constituído por sesquiterpenos (54,9%) e compostos orgânicos voláteis de baixo peso molecular, sendo o maior teor do aldeído hexenal (65,9%). Outros quatro novos triterpenóides, junto com 13 outros derivados do ácido ursólico e oleanólico já

conhecidos foram caracterizados nas folhas. Martins et al. (1995) mostraram que há presença de taninos na *Psidium guajava* L. e que isso pode impedir a penetração de tecidos e mucosas danificadas por agentes nocivos, explicando as suas propriedades anti-diarreicas. Além disso, eles funcionam como antídotos para certos tipos de alcalóides.

De acordo com a análise fitoquímica dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) verificou-se a presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos nas cascas, além de terpenóides nas folhas. Ainda existem poucos estudos químicos na literatura com esta planta, mas já se sabe que se trata de uma espécie essencialmente tanífera. Foram caracterizados proantocianidinas de alto peso molecular e outros taninos condensados (flavan-3-ols and prodelfinidinas e prorobinetinidinas) (De Mello et al., 1996a, 1996b, 1999). Em um estudo feito por Macedo, et al. (2008) os valores encontrados demonstram que as folhas de *S. adstringens* podem ser utilizadas como matéria prima para extração de compostos fenólicos principalmente, no que se refere aos flavonóides e taninos. A presença desses compostos para folha, condiz com a suposta tendência da planta na defesa vegetal de porções mais acometidas por herbivoria e patogenicidade. O *Stryphnodendron adstringens* é rico em taninos e ainda outros constituintes químicos, como flavonoides, terpenos, estilbenos, esteroides, inibidores de proteases (como a tripsina) que podem ser responsáveis pela sua atividade anti-inflamatória e supostamente antimicrobiana (VASCONCELOS et al., 2004).

A pesquisa com os extratos das três plantas pertencentes ao gênero *Guapira* demonstrou a presença de flavonoides, saponinas e terpenóides. Os estudos de caracterização química realizados por Severi (2007, 2010) mostraram que a composição química entre elas é bem semelhante. Foram identificados nos extratos das folhas de *G. opposita* 11 flavonoides derivados da quercetina, kaempferol com diferentes tipos de heterosídeos; dois monoacilgliceróis, um ureídeo e um ciclitol. Em *G. graciliflora* foram identificadas cinco saponinas, dois flavonoides e outros dois monoacilgliceróis. Por último, em *G. noxia* foram identificados oito flavonóides e dois compostos nitrogenados. A mesma autora aponta o potencial bioativo de tais compostos, uma vez que se observou o efeito gastroprotetor, antiinflamatório, antioxidante, antioxidante, dentre outros.

O Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) demonstrou através dos testes fitoquímicos realizados a presença principalmente de terpenóides e saponinas, junto com traços de fenólicos. A maior parte dos estudos químicos foi realizado com os frutos. Verificou-se a ocorrência de saponinas (charantina, goyaglicosídeos, mormodicosídeos etc), de triterpenos do tipo curcubitano, alcaloides, ácidos graxos de cadeia longa (ácido linoleico, ácido linolênico, ácido láurico, etc), dentro outros (SHARMA et al., 2011).

Segundo Mercado et al. (2015) metabólitos secundários, tais como alcalóides, terpenos, taninos ou flavonóides contidos nos extratos vegetais brutos têm sido relacionados com a atividade parasiticida. No entanto, uma vez que estes não são os únicos compostos que estas e outras espécies de plantas possuem, seria equivocado descartar o efeito de outros compostos bioativos. Por isso, é necessário determinar a composição química dos extratos que mostram a eficácia antihelmíntica. Neste estudo, todos os extratos apresentaram uma reação positiva para taninos, podendo ser esses os responsáveis pela atividade biológica contra a eclosão dos miracídios.

Um fato que pode explicar a possibilidade de os taninos estarem agindo na inibição da eclosão é a habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, por sua adstringência, os taninos também apresentam atividades tóxicas. Outro mecanismo de toxicidade é o fato desses, complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo micro-organismos, necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos, um exemplo dessa toxicidade são ratos quando tratados com bebidas ricas em compostos fenólicos tiveram redução da absorção de ferro (SCALBERT, 1991).

5 CONCLUSÃO

Os ensaios realizados com ovos de *Fasciola hepatica* permitiram avaliar que os extratos *Harpagophytum procumbens* (Garra-do-diabo), *Psidium guajava* L. (goiabeira) e *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), apresentaram eficácia relacionado à presença de compostos bioativos neles presentes como flavonoides, taninos, alcaloides, compostos fenólicos, saponinas e terpenos. A presença desses compostos fez com que não houvesse eclosão de miracídios e em alguns casos, impossibilitando sua formação no interior do ovo, sendo que, o tanino foi o composto que predominou em todos os extratos vegetais utilizados podendo ser este o responsável pela atividade biológica contra a eclosão dos miracídios.

6 REFERÊNCIAS

ABDELRAHIM, S.I.; ALMAGBOUL, A.Z.; OMER, M.; ELEGAMI, A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. **Fitoterapia**, n.73, p. 713-715, 2002.

ADEWUMNI, C.O.; AGBEDAHUNSI, J.M.; ADEBAJO, A.C.; ALADESANMI, A.J.; MURPHY, N.; WANDO, J. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. **Journal Ethnopharmacologic**, v.77, n. 1, p. 19-24, 2001.

ALVAREZ, L.; MORENO, G.; MORENO, L.; CEBALLOS, L.; SHAW, L.; FAIRWEATHER, I.; LANUSSE, C. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on **Fasciola hepatica** eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 211–216, 2009.

ALVES, D. P.; CARNEIRO, M. B.; MARTINS, I. V. F.; BERNARDO, C. C.; DONATELE D. M.; PEREIRA JÚNIOR, O. S.; ALMEIDA, B. R.; AVELAR, B. R.; LEÃO, A. G. C. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 271-276, 2011.

AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; REIS, A.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; MACEDO, R.O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 696-720, 2006.

ANDERSON, N.; LUONG, T.T.; VON, N.G. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.83, n. 1, p. 15-24, 1999.

ARAÚJO-LIMA, R.C.A. Difusão do uso de plantas medicinais com ação antiparasitária: uma alternativa para o controle da verminose de caprinos e ovinos na região semi-árida da Paraíba. In: 1 Encontro Nacional Institucional de Extensão Universitária, 2 Feira Universidade e Sociedade, 2002, João Pessoa.

Resumos... COPREX/UFPB, v.I, p. 378, 2002.

ARONSTEIN, W. S.; LEWIS, S. A.; NORDEN, A. P.; DALTON, J. P.; STRAND, M. Molecular identity of a major antigen of *Schistosoma mansoni* which cross-reacts with *Trichinella spiralis* and *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, v.92, p.133-151, 2009.

BAPTISTA, A. T. Quantificações das condenações em vísceras de bovinos em 2007 nos matadouros-frigoríficos do estado do Espírito Santo registrados no serviço de inspeção estadual. 2008. 14 f. **Trabalho de conclusão de curso** (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco. Disponível em: <<<http://www.qualittas.com.br/documentos/Quantificacoes%20das%20Condenacoes%20%20Anderson%20Teixeira%20Baptista.pdf>>> Acesso em: 08 mai. 2016.

BERNARDO, C. C.; CARNEIRO, M. B.; AVELAR, B. R.; DONATEL.E, D. M.; MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, M. J. S. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 49-53, 2011.

BORAY, J.; CROWFOOT, P.; STRONG ,M.; ALLISON, J.; SCHELLENBAUM, M.; VON ORELLI, M.; SARASIN, G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. **Veterinary Record**, v.113, n.14, p.315–317, 1983.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. ; CAMPOS, A.K. ; ARAÚJO, J.M. ; CARVALHO, R.O. ; SILVA, A.R. ; TAVELA, A.O. . *In vitro* evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs, **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1559-1564, 2008.

BRENNAN, G.P.; FAIRWEATHER, I.; TRUDGETT, A. HOEY, E.; MCCONVILLE, M., MEANEY. Understanding triclabendazole resistance. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 82, p.104–109. 2007.

CARNEIRO, M. B.; ALVES, D. P.; DONATELE, D.D.; PEREIRA JUNIOR, O. S.; MARTINS, I. V. F. *Fasciola hepatica* em caprinos, ovinos e bubalinos em municípios do sul do Espírito Santo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.4, p. 442-446, 2013.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, 2004.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, n.18, p.314-319. 2008.

CHANTRE, P.; CAPPELAERE, A.; LEBLAN, D.; GUEDON, D., VANDERMANDER, J., FOURNIE, B. Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. **Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p. 177-183, 2000.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COLES, G. C.; STAFFORD, K. A. Activity of oxycloznanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole resistant *Fasciola hepatica*. **Veterinary Record**, v. 148, n. 23, p. 723-724, 2001.

CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO VÁZQUEZ, F. **Parasitología Veterinaria** (1ª ed). Madrid: McGraw-Hill. 1999.

CORRÊA, O. Doenças Parasitárias dos animais domésticos (3ª ed.). Porto Alegre: **Sulina**.1976.

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

CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T.; MATTOS, M.J.T. Prevalence of slaughter

and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. **Parasitología Latinoamericana**, v.62, n.4, p.188-191, 2007.

DALTON J.P. **Fasciolosis**. Londres. Cab International, 543p. 1999.

DE MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 1105-1107, 1999.

DE MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 41, p. 807-813, 1996a.

DE MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 42, p. 857-862, 1996b.

DENNIS, W.R.; STONE, W.M.; SWANSON, L.E. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. J. Am. **Veterinary Medical**. Assoc., v. 124, n. 922, p. 47-50, 1954.

DUMÉNIGO, B.E.; ESPINO, A.M.; FINLAY, C.M, MEZO,M. Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 153-161, 2000.

DUSCHER, R.; DUSCHER, G.; HOFER, J.; TICHY, A.; PROSL, H.; JOACHIM, A. *Fasciola hepatica* – Monitoring the milky way? The use of tank milk for liver fluke monitoring in dairy herds as base for treatment strategies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 3, p. 273-278, 2011.

ECHEVARRIA, F. A. M. Fasciolose: ocorrência, diagnóstico e controle. **Agroquímica Santo Amaro**, v. 27, 1985.

ESTEBAN, J.G.; GONZALEZ, C.; CURTALE, F.; MUNOZ-ANTOLI, C.; VALERO, M.A., BARGUES, M.D. Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages in the Nile Delta of Egypt. **American Journal of**

Tropical Medicine and Hygiene; v. 69, n. 4, p. 429-437, 2003.

FAIRWEATHER, I.; BORAY, J.C. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. **The Veterinary Journal**, Londres, v.158, n.2, p.81-112, 1999.

FAIRWEATHER I. Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. **Journal Helminthology**. V.79,p.227-234. 2005.

FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1, p.133-143, 2011.

FAIRWEATHER, I., MCSHANE, D. D., SHAW, L., ELLISON, S. E., O'HAGAN, N. T., YORK, E. A., BRENNAN, G. P. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3, p. 249-259, 2012.

FARIA R.N.; CURY M.C.; LIMA W.S. Concordância entre duas técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**., v.60, n.4, p.1023-1025, 2008.

FILGUEIRA, I.L.; PEREIRA, L.A.; RABELLO, R.S.; PITTIGLIANI, T.M.C.; GITTI, C.B. Prevalência das principais doenças relatadas em matadouros com inspeção estadual no Estado do Rio de Janeiro no período de 2002 a 2005. **Revista da Universidade Rural**, Ciências da Vida, v.26, n.1, p.177-178, 2006.

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

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. São Paulo: ícone,2004.

GIULIETTI, A.; FORERO, E. Workshop Diversidade taxonômica e padrões de distribuição das angiospermas brasileiras-Introdução. **Acta Botanica Brasileira**., v.4, n.1, p. 3-10, 1990.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES, C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.2, p.53-56, 2002.

GOMES, F.F.; PAES, R.B.; FIUZA, V.R.S.; OLIVEIRA, F.C.R. Fasciolose bovina diagnosticada em matadouros da Região Norte Fluminense. **Revista da Universidade Rural**, Ciências da Vida, v.26, n.1, p.509-510, 2006.

GONZALES, J. C.; SANCHEZ, V. M.; THOME, J. W.; GONÇALVES, P. C. e OLIVEIRA, C. M. B. *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS**, v.2,p.37-40, 1974.

GROCK, R.; MORALES, G.; VACA, J.L., MAS-COMA, S. Fascioliasis in sheep in the human high endemic region of the northern Bolivian Altiplano. **Revista Parasitologia**, v. 58, n. 2, p. 95-101, 1998.

GUIMARÃES MP. *Fasciola hepatica*. In: Neves DP, organizador. **Parasitologia humana**. 10a ed. São Paulo: Atheneu; p. 203–206.2003.

HANNA, R.E., MCMAHON, C., ELLISON, S., EDGAR, H.W., KAJUGU, P.E., GORDON, A., IRWIN, D., BARLEY, J.P., MALONE, F.E., BRENNAN, G.P., FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: a comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, nitroxylnil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1, p. 34-43, 2015.

HOLTEZ FB, PESSINI GL, SANCHES NR, CORTEZ DAG, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial I Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IBARRA, F.; MONTENEGRO, N.; VERA, Y.; BOULARD, C.; QUIROZ, H.; FLORES, J.; OCHOA, P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 77, n. 4, p. 229-236, 1998.

IBARRA-MORENO, S.; IBARRA-VELARDE, F.; ACEVEDO, J. G. A., *In Vitro* Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Methanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional

Medicine Based on Ethno Botanical Studies, **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 04, p. 506, 2012.

JOSHI, A.R.; JOSHI, K. Indigenous knowledge and uses of medicinal plants by local communities of the Kali Gandaki Watershed Area, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 175-183, 2000.

KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.; GIL, S.; WISNIVESKY-COLLI, C. Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis of fasciolosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.181-185, 2005.

KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.; PREPELITCHI, L.; CARBAJO, A.E.; WISNIVESKY-COLLI, C. Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.3-4, p.274-286, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas, **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, p. 451-452. 2002.

MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. Triagem Fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 1166-1168, 2008.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BJORN, H. Target sites of anthelmintics. **Parasitology**, v. 114, n.5, p. 111-124. 1997.

MARTINS, I. V. F.; AVELAR, B. R.; BERNARDO, C. C.; LEÃO, A. C.; PEREIRA, M. J. S. Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 23-29, 2014.

MARTINS, I.V.F.; BERNARDO, C.C.; AVELAR, B.R.; ARAÚJO, I.B.B.A.; DONATELE, D.M.; NUNES, L.C., Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (Foreyt,2005) para diagnóstico de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. V. 17, n.1,p.110-112, 2008.

MARTINS, I.V.F.; AVELAR, B.R.; PEREIRA, M.J.S.; FONSECA, A.H. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. **Geospatial Health**, v.6, n.3, p.87-93, 2012.

MARTINS, E, R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. Plantas Medicinais. **Imprensa Universitária**, Viçosa, MG, Brasil, pp 220, 1995.

MAS-COMA, S.; AGRAMUNT, V. H.; VALERO, M. A. Neurological and ocular fascioliasis in humans. **Advances in Parasitology**, v. 84, n. 84, p. 27-149, 2014.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3. Ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 148, 2009.

MATTOS, M.J.T.; CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T. Comparação de duas técnicas parasitológicas na identificação de ovos de *Fasciola hepatica*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.16, n.1, p.105-112, 2009.

MCKELLAR, Q.; SCOTT, E. The benzimidazole anthelmintic agents—a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.13, n.3, p.223–247, 1990.

MERCADO, J. M. A.; VELARDE, F. I.; DÍAZ, M. A. A.; MONETENEGRO, Y. V.; ACEVEDO, J. G. A.; BORES, A. M. G. In vitro antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 45, 2015.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; CARRO, C.; UBEIRA, F.M. Kinetics of anti-Fasciola IgG antibodies in serum and milk from dairy cows during lactation, and in serum from calves after feeding colostrum from infected dams. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.168, n1, p.36-44, 2010a.

MOLLOY, J.B.; ANDERSON, G.R. The distribution of *Fasciola hepatica* in Queensland, Australia, and the potential impact of introduced snail intermediate hosts. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.1-2, p.62-66, 2005.

MORENO, P. R. H.; AGRIPINO, B. D. G.; LIMA, M. E. L.; SILVA, M. R.; MEDA,

C. I.; BOLZANI, V. S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA- damaging activities. I. Atlantic rain forest - ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotrópica**, v. 4, n 2, p. 1-15, 2004.

NOVAES, M.,T.; BITENCOURT, G.,F.; MARQUES, L.,T., MARTINS, I. V. F. Epidemiologia da fasciolose bovina no Sul do Espírito Santo. **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 2016.

OLIVEIRA, R.A.G. ; SILVA, M.S.H. **Plantas medicinais na atenção primária à saúde**. João Pessoa: UFPB. 64p. 1994.

OLIVEIRA, A.; NASCIMENTO, A.; SANTOS, T. A. M.; CARMO, G. M. I; DIMECH, C. P.; ALVES, R. S.; MALASPINA, F.; GARCIA, M.; SANTOS, D. A.; AGUIAR, G. P.; ALBUQUERQUE, B. C.; CARMO E. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 16, n. 4, p. 251-259, 2007.

OLIVEIRA, S. M., FILHA, E. S. Divulgação Técnica: Fasciolose hepática. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v, 71, n. 1, p. 5-7, 2009.

ORGANIZACIÓN DE LÑS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 55p. Enfermedades de los animales domésticos causadas por distomas, Roma, 1994.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea rupestris* sp. N. From Southern Brazil (Pulmonata: Lymnaeidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 4, p. 437-443, 1982.

PARR, S.L.; GRAY, J.S. A strategic dosing scheme for the control of fasciolosis in cattle and sheep in Ireland. **Veterinary Parasitology**, v.88, n 3, p.187-197, 2000.

PEREIRA, C. A.; OLIVEIRA, L. L.; COAGLIO, A. L.; SANTOS, F. S.; CEZAR, R. S.; MENDES, T.; LIMA, W. S. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v.228, p. 160-166, 2016.

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M.. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p.42- 43, 2001a.

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; SÃO LUIZ, J. B.; VASCONCELLOS, M. C. Fasciolose bovina: controle com látex da “coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens* var.*hislopii*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 288-289, 2001b.

POTAWALE, S. E.; MEHTA, U. K.; WASEEM, S.; DHALAWAT, H. J.; LUNIYA, K. P., MANTRI, R. A.; VETAL, Y. D. Phytopharmacology of *Uncaria tomentosa*: A Review. **Pharmacologyonline 2**: 197-214, Newsletter, 2008.

POWERS, K. G.;WOOD, I. B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 10, n 4, p. 265-284, 1982.

RATES, S.M.K. **Plants as source of drugs**. *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REICHEL, M.P. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n.1-2, p. 65-72, 2002.

RESENDE, H. E. B.; ARAUJO, J. L. B.; GOMES, P. A. C.; NUERNBERG, S.; NETO, M. P.; OLIVEIRA, G. P.; MELLO, R. P. Notas Sobre Duas Espécies de *Lymnaea Lamark*, 1799, Hospedeiros Intermediários de *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.3, p.21- 23. 1973.

REY, L. *Fasciola hepatica* no gado do Rio Grande do Sul, Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos. **Revista Brasileira Malariologia**, v.9, p.475- 483, 1957.

ROSA, C. R.; MACHADO, C. A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**. Porto Alegre, v. 88, n. 1, p. 26-32. 2007.

RINALDI, G.; MORALES, M. E.; ALREFAEI, Y. N.; CANCELA, M.; CASTILLO, E.; DALTON, J. P.; BRINDLEY, P. J. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. **Molecular and biochemical parasitology**, v.167, n 2, p.118-126, 2009.

SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v.98, n.13, p.89–109, 2001.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry, Great Britain**, v.30, n 12,p. 3875-3883, 1991.

SEVERI, J. A. Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico Farmacológica Em Plantas Superiores: *Guapira noxia*. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.

SEVERI, J. A. Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Guapira sp., Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 144 f, 2010.

SETTY AR, SIGAL LH. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of actions, efficacy and side effects. **Sem in Arth and Rheum**, v 34, n 6, p. 773-84, 2005.

SHARMA, S.; TANDON, S.; SEMWAL, B .;SINGH,K. *Momordica charantia* Linn.: a comprehensive review on bitter remedy. **Journal of pharmaceutical research and opinion**, v. 1,n 2, 2011.

SHI, F.H.; LIN, B.F.; QIAN, C.G.; LI, M.; FANG, M.B.; MA, J.L.; SHEN, W.; WANG, S.W.; JIAN, X.L. The efficacy of triclabendazole (Fasinex) against immature and adult *Fasciola hepatica* in experimentally infected cattle.

Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.33, n 2, p.117–124, 1989.

SUNITA, K.; KUMAR, P.; SINGH, V. K.; SINGH, D. K. Phytotherapy of vector snails by binary combinations of larvicidal active components in effective control of fascioliasis **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.55, n.5, p.303-308, 2013.

TAHA, HODA A.; EL-SHAIKH, KAMAL A.; AL-SADI, MANAL M. Effect of sodium hypochlorite on *Fasciola gigantica* eggs and the intermediate host, *Lymnaea natalensis*: A scanning electron microscopy study. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, n. 2, p. 75-83, 2014.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGINBI, N.; CIMANGA, K.; VLIETINCK, A.J. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. **Journal Ethnopharmacol**, v.6,n 1,p. 57-65, 1998.

TORGERSON P., CLAXTON J. Epidemiology and Control, p.113-139. In: DALTON J.P. Fasciolosis. Londres. **Cabine international**, 543p, 1999.

VALERO, M.A.; UBEIRA, F.M.; KHOUBBANE, M.; ARTIGAS, P.; MUIÑO, L.; MEZO, M.; PÉREZ-CRESPO, I.; PERIAGO, M.V.; MAS-COMA, S. MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and sérum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* e *F. gigantica*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.159, n 1, p.77-81, 2009.

VASCONCELOS, M. C.; RODOVALHO, N. C.; POTT, A., POTT, V. J.; FERREIRA, A. T.; ARRUDA, A. L.; BUENO, N. R. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum Benth.*(Leguminosae). **Revista brasileira farmacognosia**, v. 14, n 2, p. 121-127, 2004.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n 10, p.4113-4117, 1998.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R.; PEREIRA, M.F; DANTAS, L.B.; XIMENES, L.J.F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North – East Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Medicine**

Veterinary, v.150, n.5, p.447-452, 1999.

VOGEL, A. I. **Química Orgânica: análise orgânica qualitativa**. 1ª ed., Ao Livro Técnico: Rio de Janeiro, 1983.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis: a thin lamasyer chromatography atlas**. Berlim: Springer Verlag, p. 320, 1984.

WANG H.; W.M. CAI; W.X. WANG; J.M. YANG, Molluscicidal activity of *Nerium indicum* Mill, *Pterocarya stenoptera* DC, and *Rumex japonicum* Houtt on *Oncomelania hupensis*, **Biomedicine Environmental Science**. v.19, n 4, p. 245–248, 2006.

WANG, F.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; DENG, G.; ZOU, Z.; LI, A. Chemical Components and Bioactivities of *Psidium guajava*. **International Journal of Food Nutrition and Safety**, v. 5,n 2, p. 98-114, 2014.

XIMENES, T.; RONDELAUD, D.; MAGE, C.; CHERMETTE, R. A eliminação da *Lymnaea truncatula* das pastagens: controle biológico e controle integrado contra a fasciolose. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre: edição extra, v. 1, p. 40-46, 1995.

ZAIDEN, M.F.; SANTOS, B. M. O.; CANO, M. A. T.; NASCIF, J.R.; L. A. N. Epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de Rio Verde - GO. **Medicina**. Ribeirão Preto, v. 41, n.2, p. 182-187, 2008.

ZUKOWSKI, S.H.; WAYNE WILKERSON, G.; MALONE, J.B. Fasciolosis in cattle in Louisiana. II. Development of a system to use soil maps in a geographic information system to estimate disease risk on Louisiana coastal marsh rangeland. **Veterinary Parasitology**, v.47,n p.51-65, 1993.