

**ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
ARTEMISIA ANNUA SOBRE *Haemonchus contortus***

*(Ovicidal and larvicidal activity of Artemisia annua hydroalcoholic extract against
Haemonchus contortus)*

Lew Kan Sprenger¹, Juliana Bello Baron Maurer, Selma Faria Zawadzki Baggio,
Pedro Melillo de Magalhães, Marcelo Beltrão Molento

¹Correspondência: lew.sprenger@gmail.com

RESUMO: *Haemonchus contortus* é responsável por causar enorme prejuízo econômico na produção de pequenos ruminantes, retardando o crescimento e causando anemia em animais infectados. O objetivo deste trabalho foi determinar a eficácia *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* frente a estágios de vida livre deste parasito. O fitoterápico foi produzido com 7 dias de percolação a 4°C, sendo posteriormente liofilizado. Foram realizados o teste de eclodibilidade de ovos (TEO) e o teste de desenvolvimento larval (TDL), com concentrações crescentes (0,78 a 50 mg/mL) em seis repetições. Para analisar a composição química do fitoterápico, procedeu-se a marcha fitoquímica completa. O produto obtido a partir da *A. annua* apresentou eficácia de 93,22% ($\pm 1,87$) no TEO, já no TDL a eficácia foi de 90,33% ($\pm 0,27$), ambos na concentração de 50 mg/ml. Nas análises fitoquímicas, foram encontrados diversos compostos que podem ter contribuído com o efeito anti-helmíntico, tanto direta como indiretamente. Os dados da marcha fitoquímica, aliados aos resultados dose-dependentes obtidos nos testes *in vitro* evidenciam que o extrato produzido possui potencial para combater *H. contortus*. Novos estudos devem ser realizados buscando maximizar a eficácia deste extrato.

Palavras-chave: Controle alternativo; etnoveterinária; fitoterapia; infecção parasitária

ABSTRACT: *Haemonchus contortus* is responsible for significant economic losses in sheep and goat production, resulting in low growth and anaemia in infected animals. The aim of this study was to determine the *in vitro* efficacy of hydroalcoholic extract of *Artemisia annua* against free-living stages of this parasite. The herbal material was produced by leaving the solution for 7 days (extraction period) at 4°C and latter the material was lyophilized. After this, the product was used for the egg hatch test (EHT) and the larval development test (LDT) in different concentrations (0.78 to 50 mg/mL) with six replicates. A complete phytochemical screening was performed to analyze the materials' chemistry composition. *Artemisia annua* had an efficacy of 93.22% (± 1.87) using the EHT and of 90.33% ($\pm 0.27\%$) when using the LDT test, both in concentration 50 mg/ml. Phytochemical tests showed few chemical compounds that could exert anthelmintic properties. The results obtained with the biochemical tests together with the dose-dependent effect found in *in vitro* tests demonstrate that the *A. annua* extract used has the potential to be a good drug candidate against *H. contortus*. Further studies should be conducted to maximize the effectiveness of the extractions from *A. annua*.

Key Words: Alternative control; ethnoveterinary; herbal medicine; parasitic infection

INTRODUÇÃO

A produção de pequenos ruminantes no Brasil possui grande importância econômica, gerando renda a milhares de famílias, todavia possui alguns entraves para sua expansão, devido ao manejo sanitário insuficiente, o fator mais importante. A infecção por *Haemonchus contortus* consolida-se como a principal doença parasitária, causando prejuízos devido a anorexia, apatia, aumento da conversão alimentar, comprometimento da função reprodutiva, diminuição da produção e perda de peso em animais infectados (Nery *et al.*, 2010).

O controle dessa parasitose é realizado, geralmente, como o uso indiscriminado de anti-helmínticos, sem orientação técnica e sem considerar os fatores epidemiológicos (Andrade *et al.* 2014). Este modelo de utilização favoreceu a seleção e a propagação da população parasitária resistente, além da deposição de resíduos dos medicamentos no meio ambiente e aumento dos custos de produção, principalmente com a aquisição dos fármacos (Molento, 2005).

Devido aos problemas citados, diversas tecnologias estão sendo desenvolvidas, sendo o uso de fitoterápicos o que possui resultados mais promissores (Costa *et al.*, 2008). O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo e o uso desses medicamentos está amplamente difundido na população. Dentre as vantagens do seu uso, destaca-se a facilidade de aquisição, o baixo custo e pouco ou nenhum efeito tóxico ambiental.

Dentre as diversas plantas que estão sendo estudadas atualmente, a

Artemisia annua destaca-se em pesquisas relacionadas ao controle parasitário animal (Brisibe *et al.*, 2008). Popularmente conhecida como Artemísia ou Erva-de-São-João, é uma planta de origem chinesa, cultivada por determinados centros de pesquisas nacionais. Possui atividade frente a diversas enfermidades, sendo que em parasitologia, os extratos produzidos a partir da planta já apresentaram efeitos comprovados frente a diversos parasitas, como: *Schistosoma japonicum* e *S. mansoni*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica*, *Opisthorchis viverrini*, *Leishmania* sp., *Trypanosoma* sp. e *Eimeria* sp. (Keiser & Utzinger, 2007; Brisibe *et al.*, 2008).

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficácia do extrato hidroalcoólico de *A. annua* em fases de vida livre de *H. contortus*, utilizando testes *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico. Amostras de folhas de *A. annua* foram coletadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (UNICAMP), em Paulínia, SP. A espécie está depositada no herbário da instituição, sob o número 979. Após a colheita, as folhas foram secadas a sombra, em temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas, sendo posteriormente armazenadas ao abrigo da luz e umidade.

Obtenção do extrato. Para a produção do extrato hidroalcoólico de sete dias (H.7), utilizou-se um frasco de cor âmbar, no qual foram colocadas 64g de folhas junto com 640 mL de álcool 80% (v/v), o qual ficou armazenado em

refrigerador a 4°C por sete dias. Durante o período, houve agitação periódica do conteúdo. Em seguida foi realizada filtração, com auxílio de uma bomba de vácuo, em funil com papel filtro. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida e à temperatura de 28°C(±2), para posteriormente liofilização.

Análises fitoquímicas.

Posteriormente se realizou a marcha fitoquímica qualitativa descrita por Matos (1998) com o objetivo de verificar a presença de metabólitos secundários (fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, leucoantocianidinas, esteróides, triterpenos, saponinas, resinas e alcalóides). A dosagem de fenóis totais (FT) foi realizada pelo teste de Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia adaptada por McDonald *et al.* (2001). O teor de FT foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com padrões de ácido gálico. Os resultados, determinados a partir da equação de regressão da curva de calibração ($y = 0,02x - 0,0064$; $R^2 = 0,9911$), foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalentes por grama da amostra. A dosagem de artemisinina foi realizada no laboratório de fitoquímica do CPQBA-UNICAMP, pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo a metodologia descrita por Celeghini *et al.* (2009), com tempo de retenção para quantificação da artemisinina de 7,5 min. A atividade toxicidade do extrato foi avaliada através do teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach, seguindo a metodologia de Meyer *et al.* (1982). O critério de toxicidade dos extratos foi

estabelecido segundo o mesmo autor, sendo valores abaixo de 1000 µg/mL (tóxicos), entre 500 e 1000 µg/mL (fracamente tóxico) e acima de 1000 µg/mL (não tóxicos). O ensaio antioxidante foi realizado pelo método de redução do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), de acordo com o metodologia de Blois (1958), usando como padrão o ácido ascórbico.

Teste de eclodibilidade de ovos (TEO). Inicialmente se procede com a recuperação dos ovos. Para tal, foram colhidas fezes diretamente da ampola retal de caprinos, previamente selecionados, com contagem de OPG superior a 4000. Um pool de 60 gramas de fezes foi processado conforme o protocolo de Coles *et al.* (1992), adaptado por Bizimenyera *et al.* (2006). As fezes foram maceradas e homogeneizadas em água aquecida a 40°C e filtradas em uma sequência de peneiras com malhas contendo aberturas de 400, 250, 150, 75 e 25µm. Após esta lavagem, os ovos foram coletados da última peneira e distribuídos em tubos de 50 mL e centrifugados em 3000 rpm por 3 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e o volume total do tubo foi completado com solução salina saturada para a ressuspensão do sedimento. Novamente o material foi centrifugado e o sobrenadante foi lavado na peneira de 25µm com água destilada, até a retirada total da solução salina. O conteúdo foi transferido para um Becker e quantificado em alíquotas de 50 µL, com aproximadamente 200 ovos.

O protocolo utilizado para o TEO foi descrito por Coles *et al.* (1992),

modificado por Bizimenyera *et al.* (2006). Para seguir a adaptação, aproximadamente 50µL da suspensão contendo 200 ovos foram acondicionados em cada poço em placas de 24 poços. Calculado o volume final de 1mL para cada poço, os tratamentos fitoterápicos foram preparados nas concentrações de: 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.562 e 0.781 mg/mL. O extrato foi diluído com 3% de DMSO. O controle negativo foi feito com água destilada, já os controles positivos foram realizados com o emulsificante DMSO aquoso a 3% (v/v) e o outro com albendazol 0,63mg/mL. A contagem dos ovos e das larvas foi realizada em microscópio invertido. Seis réplicas foram realizadas para cada tratamento e também para os controles. No cálculo da eficácia, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de eclodibilidade (\%)} = \frac{L1}{(\text{ovos} + L1)} \times 100$$

Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL). Para a obtenção das larvas de primeiro estágio (L1), obteve-se uma alíquota de suspensão de ovos, conforme método descrito por Hubert e Kerboeuf, (1992), a qual posteriormente foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C. O TDL foi realizado seguindo a metodologia descrita por Roberts e O'Sullivan, (1950), modificado. Uma alíquota de 1mL, contendo aproximadamente 230 L1 de *H. contortus*, foi incubada por 6 dias com 2 g de fezes de um animal livre de infecção parasitária, juntamente com 1 mL do H.7 nas concentrações 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.562 e 0.781 mg/mL. O controle negativo foi feito com água destilada, já os controles positivos foram

realizados com o emulsificante DMSO aquoso a 3% (v/v) e o outro com ivermectina (0,63mg/mL). Seis réplicas foram realizadas para cada tratamento e também para os controles.

Análise estatística. A análise estatística foi realizada com a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, onde foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism® 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na marcha fitoquímica, foram detectadas a presença de alcalóides, catequinas, esteróides, fenóis, resinas, taninos e triterpenos. Antocianinas, antocianidinas e leucoantocianidinas não foram encontradas no teste utilizado. O teor de fenóis totais, em equivalentes de ácido gálico, foi de 203,0±0,569µg/L. A concentração de artemisinina foi de 59,41±1,47 µg/dl. O teste de toxicidade frente a *A. salina* apresentou DL50 de 3,827 µg/mL ($R^2 = 0,9478$). No ensaio antioxidante foi demonstrado que 640 µg/mL possui 98,76% da atividade antioxidante do padrão ácido ascórbico, o qual foi escolhido por ser um dos três compostos químicos com maior atividade conhecidos.

Os resultados do TEO e TDL estão apresentados no Quadro 1. No TEO, na concentração de 50 mg/mL foi encontrado 93,22% (±1,87) de eficácia, sendo este valor semelhante ao controle positivo (98,12±0,76%) ($P < 0,05$). No TDL, na concentração de 50 mg/mL foi

encontrado 90,33% ($\pm 0,27$) de eficácia, o qual foi semelhante ao controle positivo deste teste (97,84 \pm 0,54%) ($P < 0,05$). Os resultados, em ambos os testes, demonstraram um efeito dose-dependente, nos quais quanto maior a concentração dos extratos, maior o efeito sobre os ovos/TEO e larvas/TDL, respectivamente.

DISCUSSÃO

Na procura por antiparasitários naturais, os testes *in vitro* em fases não-parasitárias são fundamentais para fazer uma análise preliminar de princípios originários de material vegetal, dos seus compostos químicos e sua ação. Com a grande quantidade de vegetais e compostos sintéticos sendo investigados, os métodos *in vitro* destacam-se por seu baixo custo e tempo empregados, além de não serem utilizados animais experimentais (Fortes *et al.*, 2014).

Na marcha fitoquímica, os compostos encontrados nos testes qualitativos e a concentração de artemisinina e fenóis totais observados corroboram com os expostos na literatura científica (Brisibe *et al.* 2009). Dentre os principais responsáveis pela atividade anti-helmíntica da *A. annua*, destacam-se os flavonóides, taninos e artemisinina (O'Neill *et al.*, 2010). Todavia, as cumarinas, compostos esteróides, fenóis, purinas e triterpenóides são imunomoduladores, melhoram a absorção do fitoterápico e permitem prolongar a permanência no organismo (Brisibe *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação dos flavonóides frente aos parasitas ocorre indiretamente, devido ao fato deste composto ser o maior responsável pela

atividade antioxidante da planta, sendo assim, possui efeito direto sobre a redução do envelhecimento celular e melhora da imunidade (Lakshimi *et al.*, 2010). Enquanto os taninos possuem um efeito anti-helmíntico pronunciado, principalmente por reduzir a taxa metabólica do parasito, reduzindo a disponibilidade de nutrientes (Hoste *et al.*, 2006). Também ocorre aumento da biodisponibilidade de proteínas no organismo do animal, levando a uma maior resposta imune sobre parasitos intestinais. Especificamente para helmintos, há redução da fertilidade das fêmeas adultas e eclodibilidade dos ovos, além da diminuição da motilidade das larvas, o que pode diminuir a taxa de contaminação da pastagem (Molan *et al.*, 2003). A artemisinina, principal biocomposto com atividades farmacológicas da planta, também chamada de qinghaosu, interfere nas proteínas mitocondriais de transporte do parasito e modula beneficemente o sistema imune do hospedeiro (Hoste *et al.*, 2010).

A *A. annua* possui uma alta atividade antioxidante, principalmente devido ao elevado conteúdo fenólico presente na planta, sendo a maioria pertencente ao grupo dos flavonóides (Ferreira *et al.*, 2010). Para fitoterápicos testados *in vivo*, uma elevada atividade antioxidante é uma característica desejável, tanto pela defesa direta do organismo e os danos oxidativos, quanto pela melhoria do estado imunológico do animal (Yuan *et al.*, 2009).

Mesmo existindo diversos estudos evidenciando o efeito antiparasitário dos extratos produzidos a partir de *A. annua*, nunca houve

pesquisas visando elucidar a ação in vitro frente ao *H. contortus*. O extrato demonstrou desempenho promissor, mesmo quando comparado com os controles positivos, o que evidencia a potente atividade anti-helmíntica da planta.

O H.7 demonstrou atividade de inibição da eclodibilidade de ovos com característica dose-dependente e atingiu eficácia superior a 90% nas concentrações de 25 e 50 mg/mL. Diversos compostos fitoterápicos, produzidos a partir de diferentes plantas, já foram testados no TEO com ovos de *H. contortus*. O extrato aquoso de *Anacardium humile* demonstrou inibição da eclosão dos ovos de 90,9% em dosagem de 100 mg/mL. (Nery *et al.*, 2010). Extratos aquosos produzidos com as folhas de *Syzygium cumini*, *Genipa americana* e *Solanum lycocarpum* inibiram, respectivamente, 96,17; 18,27 e 14,2% a eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*, ao serem utilizados na concentração de 100 mg/mL (Oliveira, 2013). O extrato aquoso produzido com folhas e frutos de *Myrsine africana* na concentração de 24 mg/mL obteve eficácia de 77% (Gathuma *et al.*, 2004). Extrato hidroalcoólico de *Tarenaya spinosa* inibiu a eclosão de 81,53% dos ovos do referido parasito, quando utilizado na dosagem de 150 mg/mL. (Andrade *et al.*, 2014).

O H.7 inibiu mais de 90% o desenvolvimento larval, quando usado na concentração de 50 mg/mL, sendo seu efeito igualmente dose-dependente. É importante enfatizar, que os resultados encontrados no TEO são superiores ao TDL, em todas as concentrações testadas, o que também

foi observado em grande parte da literatura científica consultada. Em trabalho realizado utilizando óleo essencial de *Eucalyptus globulus* na concentração de 43,5mg/mL foi demonstrado 98,7% de inibição do desenvolvimento larval (Macedo *et al.*, 2009). Utilizando a concentração de 50mg/mL de extratos hexânico produzidos com folhas de *Melia azedarach*; obteve-se eficácia de 67,9% no TDL (Maciel *et al.*, 2006). O extrato acetato de etila de *Azadirachta indica* inibiu o desenvolvimento larvar em 68,10% na concentração de 50mg/mL (Costa *et al.*, 2008). Em estudo conduzido por Oliveira *et al.*, 2010, o extrato aquoso de folhas, pseudocaules e corações de *Musa spp.*, avaliado na concentração de 57,76 mg/mL apresentou eficácia de 90%.

Além da avaliação do potencial anti-helmíntico de um composto é imprescindível ponderar seus possíveis efeitos tóxicos quando usados in vivo. Para estabelecer a toxicidade de *A. annua* foi usado o ensaio de letalidade da *A. salina*, teste que possui alta confiabilidade para avaliar o efeito tóxico de fitoterápicos com propriedades antiparasitárias (Fernández-Calienes Valdés *et al.*, 2009). O resultado observado apontou que o H.7 possui baixa toxicidade (DL50 >1,000 µg/mL), sugerindo uma grande margem de biossegurança.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o extrato de *A. annua* obtido pela metodologia descrita no presente experimento, demonstramos ser candidato a fitoterápico antiparasitário para combater *H.*

contortus. Novos estudos devem ser realizados buscando maximizar a eficácia do produto e posteriormente aplicá-lo em testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F.D.; RIBEIRO, A.R.C.; MEDEIROS, M.C.; FONSECA, S.S.; ATHAYDE, A.C.R.; FERREIRA, A.F.; ONALDO, G.R.; SILVA, W.W. Anthelmintic action of the hydroalcoholic extract of the root of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, p. 942-946, 2014.
- BIZIMENYERA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v. 142, p. 336-343, 2006.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- BRISIBE, E.A.; UMOREN, U.E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P.M.; FERREIRA, J.F.; LUTHRIA, D.; WU, X.; PRIOR, R.L. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food Chemistry*, v. 115, p. 1240-1246, 2009.
- BRISIBE, E.A.; UMOREN, U.E.; OWAI, P.U.; BRISIBE, F. Dietary inclusion of dried *Artemisia annua* leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 4083-4092, 2008.
- CELEGHINI, R.M.D.S.; SOUSA, I.M.D.O.; SILVA, A.P.D.; RODRIGUES, R.A.F.; FOGGIO, M.A. Development and validation of analytical methodology by HPLC-IR for evaluation of artemisinin on *Artemisia annua* L. *Química Nova*, v. 32, p. 875-878, 2009.
- COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) - methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v. 44, p. 35-44, 1992.
- COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; CASTRO, C.M.S.; BRAGA, R.R.; OLIVEIRA, L.M.B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, v. 74, p.284-287, 2008.
- FERNÁNDEZ-CALIEÑES VALDÉS, A.; MENDIOLA MARTÍNEZ, J.; MONZOTE FIDALGO, L.; GARCÍA PARRA, M.; SARIEGO RAMOS, I.; ACUÑA RODRÍGUEZ, D.; LIZAMA, R.S.; GUTIÉRREZ GAITÉN, Y. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, v. 61, p. 254-258, 2009.
- FERREIRA, J.F.; LUTHRIA, D.L.; SASAKI, T.; HEYERICK, A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, v. 15, p. 3135-3170, 2010.
- FORTES, F.S.; KLOSTER, F.S.; SCHAFER, A.S.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U.Y.; MOLENTO, M.B. Avaliação da resistência em um isolado de campo selecionado de *Haemonchus contortus* à ivermectina e moxidectina usando o Teste de Migração de Larvas

- em *Ágar. Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p. 183-187, 2014.
- GATHUMA, J.M.; MBARIA, J.M.; WANYAMA, J.; KABURIA, H.F.A.; MPOKE, L.; MWANGI, J.N. Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 7-12, 2004.
- HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M.; HOSKIN, S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 253–261, 2006.
- HOSTE, H.; SOTIRAKI, S.; LANDAU, S.Y.; JACKSON, F.; BEVERIDGE, I. Goat– nematode interactions: think differently. *Trends in Parasitology*, v. 26, p. 376–381, 2010.
- HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, v. 130, p. 442-446, 1992.
- KEISER, J.; UTZINGER, J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 20, p.605-612, 2007.
- LAKSHMI, V.; JOSEPH, S.K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, S.K.; SAHOO, M.K.; DUBE, V.; MURTHY, P.K. Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoids tested against *Brugia malayi*. *Acta Tropical*, v. 116, p. 127-133, 2010.
- MACEDO, I.T.; BEVILAQUA, C.M.; OLIVEIRA, L.D.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.; VIEIRA, L.D.S.; OLIVEIRA, F.R.; BARROS, R.S.; CHAGAS, A.C. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, p. 62-66, 2009.
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C.; CASTRO, C.M.S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 140, p. 98-104, 2006.
- MATOS, F.J.A. *Farmácias vivas*. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1998. 220 p.
- MCDONALD, S.; PRENZLER, P.D.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, v. 73, p. 73-84, 2001.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MOLAN, A.L.; DUNCAN, A.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology*, v. 52, p. 209-218, 2003.
- MOLENTO, M. B. Resistência parasitaria em helmintos de equídeos e propostas de manejo. *Ciência Rural*, v. 35, p. 1469–1477, 2005.
- NERY, P.S.; NOGUEIRA, F.A.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal

nematode larvae of sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 171, p. 361-364, 2010.

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

OLIVEIRA, L.D.R. *Plantas medicinais como alternativa para o controle de Haemonchus contortus em ovinos: testes in vitro e in vivo*. Dissertação de Mestrado em Ciências Animais, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 59p, 2013.

OLIVEIRA, L.N.; DUARTE, E.R.; NOGUEIRA, F.A.; SILVA, R.B.; FILHO, D.E.F.; GERASEEV, L.C. Eficácia de resíduos da bananicultura sobre a inibição do desenvolvimento larval em *Haemonchus* spp. provenientes de ovinos. *Ciência Rural*, v. 40, p. 488-490, 2010.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Crop Past. Science*, v.1, p. 99-102, 1950.

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