

METODOLOGIAS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE FITOTERÁPICOS SOBRE PARASITAS E RESULTADOS DE TESTES A CAMPO

ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS⁴

ABSTRACT:- CHAGAS, A.C.S. [*In vitro* methods for evaluation of phytotherapics on parasites and results of field tests]. Rod. Washington Luiz, km 234 - Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: carolina@cnpse.embrapa.br

The adoption of adequate and standardized methods in experiments is of great importance in order to obtain reliable and comparable results. A potential plant extract can be underestimated or discarded if the available methods are not used in correctly. The objective of this work is to report *in vitro* methods for evaluation of phytotherapics against parasites, including *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haematobia irritans*, *Cochliomyia hominivorax* and gastrointestinal nematodes. Due to the variety of *in vitro* tests for gastrointestinal nematodes, some recommendations have been given. In the field tests, *Azadirachta indica* leaves were not effective in the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. Research into formulations that avoid problems involving absorption and solubility must be carried out seeking to achieve good bioavailability and antiparasite effectiveness.

Key-words: parasites, methods, phytotherapy, control.

RESUMO

A adoção de metodologias adequadas e padronizadas nos experimentos é de grande importância, a fim de se obter resultados confiáveis e passíveis de comparação. Um extrato vegetal de potencial pode ser subestimado ou descartado se as metodologias disponíveis não são utilizadas de forma correta. O objetivo desse trabalho é divulgar metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos contra parasitas, incluindo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haematobia irritans*, *Cochliomyia hominivorax* e nematóides gastrintestinais. Em função da variedade de testes *in vitro* para nematóides gastrintestinais, algumas orientações foram fornecidas. Nos testes a campo, o fornecimento de folhas de *Azadirachta indica* se mostrou ineficaz no controle de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes. Pesquisas de formulações que evitem problemas com a absorção e com a solubilidade devem ser realizadas buscando-se boa disponibilidade e eficácia antiparasitária.

Palavras-chave: parasitas, metodologias, fitoterapia, controle.

INTRODUÇÃO

As pesquisas de extratos vegetais para o controle parasitário cresceram de forma intensa na última década, tanto no Brasil quanto em outros países. Isto ocorre principalmente em função das poucas alternativas de produtos comerciais disponíveis, especialmente quando a resistência parasitária já é uma realidade nas propriedades. O resgate do conhecimento popular tem indicado resultados positivos em testes *in vitro*, adicionalmente, o conhecimento científico e o desenvolvimento de novos equipamentos e metodologias são instrumentos aliados nessa linha de pesquisa emergente. Desta forma, pode-se considerar que a fitoterapia ainda é uma área experimental muito recente e a diversidade de plantas existentes no país indica um campo amplo para levantamentos, isolamentos, semi-sínteses e sínteses de bioativos de origem vegetal.

A análise de artigos científicos com fitoterápicos em parasitologia veterinária tem demonstrado a dificuldade de realização dos testes *in vitro* de forma padronizada. Muitos autores adaptam metodologias usadas para testes com produtos antiparasitários comerciais e desconsideram algumas características que podem influenciar de forma decisiva na avaliação de um fitoterápico sobre o parasita alvo, como por exemplo, a solubilidade ou um efeito indireto sobre o mesmo. Os estudos fitoquímicos têm sido recentemente incorporados a essa área de pesquisa, possibilitando o entendimento da variabilidade da ação antiparasitária mediante conhecimento da concentração dos bioativos nos extratos vegetais. Da mesma forma, a adoção de metodologias adequadas e padronizadas é de grande importância, a fim de se obter resultados confiáveis e passíveis de comparação. Tais avanços poderão conduzir estudos futuros focados em grupos de plantas e/ou grupos de bioativos potenciais.

METODOLOGIAS

1) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os testes realizados com o carrapato dos bovinos já estão relativamente padronizados. Além disto, conforme demonstrado por Chagas et al. (2003), esse parasita é bastante resistente a muitos solventes utilizados na produção e solubilização de fitoterápicos. Mesmo assim, deve-se estar atento ao número de repetições, tempo de imersão, uso de controle com o solvente adotado e análise estatística adequada.

1.1) Teste larvar com papéis impregnados

As fêmeas ingurgitadas são acondicionadas em B.O.D. ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e UR > 80%) para a produção de ovos e larvas. Para os testes são utilizadas larvas com 14 a 21 dias de idade após a eclosão. Os extratos podem ser testados conforme descrito em Chagas et al. (2002), onde aproximadamente 100 larvas são colocadas entre papéis de filtro de 2 x 2 cm recém impregnados pelos extratos, os quais são colocados em um envelope de papel de filtro (adaptado de FAO PLANT PROTECTION BULLETIN, 1971). Os envelopes são colocados em B.O.D. e as leituras realizadas após 24 h ou 48 h, contando-se as larvas vivas com uma bomba à vácuo. Os extratos podem ser testados em 5 concentrações diferentes e os solventes a serem utilizados podem ter como referência Chagas et al. (2003), sendo o controle constituído por água destilada e o solvente na mesma concentração. Todos os testes devem ser realizados em 3 repetições.

Cálculo da mortalidade:

⁴Pesquisadora Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234 - Caixa Postal 339 13560-970, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: carolina@cnpse.embrapa.br

$$\text{Mortalidade} = \frac{\% \text{ mortalidade controle} - \% \text{ mortalidade tratado}}{\% \text{ mortalidade controle}} \times 100$$

$$\text{Mort. média (\%)} = \frac{\text{mort. da repetição 1} + \text{mort. da repetição 2} + \text{mort. da repetição 3}}{3}$$

Não são analisados os resultados dos testes com mortalidade no grupo controle superior a 10%. Nos testes com mortalidade no grupo controle entre 5% e 10%, cada mortalidade média poderá ser corrigida aplicando-se a fórmula de Abbott (1925). Não é necessário fazer correções quando a mortalidade do controle estiver entre 0% e 5% e a mortalidade do teste for de 0% ou 100%.

1.2) Teste de imersão de fêmeas ingurgitadas

As fêmeas ingurgitadas são pesadas em grupos homogêneos de 10 e cada grupo é submetido à imersão por 5 min. nos extratos vegetais, preferencialmente em 5 concentrações diferentes, podendo-se usar como emulsificante o Tween e o grupo controle formado por esta substância e água. As fêmeas são colocadas em placas de Petri para oviposição em B.O.D. ($\pm 27^\circ\text{C}$ e UR > 80%), os ovos são pesados e a eclodibilidade verificada visualmente. Podem ser realizadas 3 repetições. A eficiência reprodutiva (ER) e o índice de eficácia do produto ou do extrato vegetal (EP) são calculados segundo Drummond et al. (1973).

$$\text{ER} = \frac{\text{peso dos ovos} \times \% \text{ eclosão} \times 20.000^*}{\text{peso das teleóginas}}$$

$$\text{EP} = \frac{(\text{ER controle} - \text{ER tratado}) \times 100}{\text{ER controle}}$$

* Constante que indica o número de ovos presentes em 1g de postura.

2) *Haematobia irritans*

É recomendada a técnica com o papel de filtro impregnado, padronizada para *H. irritans* por Shepard; Hinkle (1987). Os bioensaios com *H. irritans* são realizados a partir de moscas coletadas em bovinos infestados. Vinte e cinco moscas são colocadas em placas de Petri com papel impregnado com os extratos vegetais em 3 repetições. A leitura da mortalidade é realizada após 2 h. O controle negativo é o papel impregnado com água destilada e o solvente (normalmente acetona) e o controle positivo é composto por inseticida eficaz (BARROS et al., 2002). Não são analisados testes que produzam resultados com mortalidade no grupo controle superior a 10%. Moscas sem capacidade de se deslocar são consideradas mortas. Nos testes com mortalidade no controle entre 5% e 10%, cada mortalidade média é corrigida aplicando-se a fórmula de Abbott (1925). Não são feitas correções quando a mortalidade do controle for entre 0% e 5% e a mortalidade do teste for de 0% ou 100%.

3) *Cochliomyia hominivorax*

3.1) Cultura

Larvas de diferentes estádios de desenvolvimento são colhidas de animais infestados e transferidas para placas de Petri, contendo meio de cultura composto por carne moída e sangue citratado. Na Embrapa Pecuária Sudeste, as placas de Petri são colocadas em bandejas contendo terra peneirada e esterilizada e são incubadas a 37°C . As L₃, ao final de seu período de alimentação, se transferem para a terra onde pupam. Após a emergência, as moscas são mantidas por 5 dias em B.O.D. ($\pm 27^\circ\text{C}$ e UR > 70%) e recebem alimentação a base de mel e carne para maturação dos ovários. Na segunda semana, as moscas são removidas para bancada com luz onde permanecem por 7 dias para ocorrência da cópula. As fêmeas são separadas e submetidas a stress térmico para forçar a postura. Os ovos obtidos são incubados no mesmo meio de cultura. O estágio larvar é determinado verificando-se as aberturas dos espiráculos respiratórios: 1, 2 e 3 aberturas, para L1, L2 e L3, respectivamente (metodologia adaptada de SMITH, 1960).

3.2) Metodologia

Segundo Oliveira et al. (2008) o fitoterápico pode ser emulsificado com Tween 80 a 1,66% com auxílio de agitador, para o volume final de 1 mL de sangue citratado. O extrato já misturado ao sangue é incorporado a 1 g de carne moída em placa de Petri. Os meios de cultura usados para os controles contêm sangue citratado emulsificado com Tween 80 na mesma concentração e a mesma quantidade de carne moída, além do controle negativo (sem Tween) e do positivo com um inseticida eficaz. Podem ser preparadas 3 repetições para cada tratamento. Doze L₃ são colocadas sobre o meio de cultura nas placas e mantidas em estufa a 37°C . A leitura da mortalidade é feita com 2, 6, 12 e 24 h após a incubação. A metodologia é prática e pretende-se conduzir estudos *in vitro* e a campo para se estabelecer um parâmetro comparativo.

4) Nematóides gastrintestinais

4.1) Recuperação de ovos

As fezes são coletadas diretamente do reto dos animais e procede-se à separação dos ovos quando se obtém ovos por grama de fezes (OPG) superior a 2.000 em uma das amostras. Os ovos são recuperados segundo metodologia descrita por Bizimenyera et al. (2006), que é uma adaptação de Coles et al. (1992). As fezes são homogeneizadas em água e filtradas em um conjunto de peneiras. Na peneira de 25 μm os ovos são retidos, lavados com água destilada e centrifugados a 1.100 x g/5 min. em tubos de 50 mL completados com água. O sobrenadante é descartado e solução salina saturada é adicionada para a ressuspensão do sedimento. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante é lavado na peneira de 25 μm e os ovos coletados são colocados em cálice para sedimentação por 2 h. Os ovos são sifonados e realiza-se contagem dos ovos em 5 alíquotas de 50 μl . São preparados aproximadamente 100 ovos/vol. para serem utilizados em até 1 h.

4.2) Teste da eclodibilidade larvar (Egg Hatch Test - EHT)

Esta metodologia tem passado por algumas adaptações a partir da técnica original (COLES et al., 1992). Aproximadamente 100 ovos/vol. são colocados em cada poço (placa c/ 24 poços): tratamentos, controle positivo e controle negativo. O extrato vegetal é adicionado em 5 concentrações diferentes. Pode-se utilizar como controle positivo

o tiabendazole. O controle negativo é composto por água destilada e Tween 80 na mesma concentração utilizada nos extratos e observou-se que os nematóides gastrintestinais são bem mais sensíveis aos solventes e emulsificantes (MIGLIATO et al., 2007) que *R. microplus*. São preparadas 3 repetições em cada tratamento e controles. As placas são homogeneizadas manualmente e acondicionadas em B.O.D. (25°C e UR >80%) por 48 h. Uma gota de lugol é adicionada em cada poço e os ovos e L₁ eclodidas são quantificados para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larvar. Na Embrapa Pecuária Sudeste obteve-se taxa de eclodibilidade superior a 90% no grupo controle adicionando-se meio de cultura específico (CHAGAS et al., 2008a).

4.3) Teste de desenvolvimento larvar (Larval Development Test – LDT)

Aproximadamente 100 ovos obtidos segundo a técnica já descrita são colocados em cada poço. São adicionados em cada poço 50 µl de suspensão de *Escherichia coli* liofilizada (ATCC 9637 Sigma), 10 µl de anfotericina B (Sigma) e 20 µl de meio nutritivo (HUBERT; KERBOUEF, 1992, modificada por BIZIMENYERA et al., 2006). O material é homogeneizado manualmente e incubado em B.O.D. (22°C e UR >80%) por 48 h. Após este período, são adicionados 250 µl dos extratos. Como controle positivo pode-se utilizar tiabendazole ou ivermectina. O controle negativo é constituído segundo já descrito. Todos os testes são feitos em 3 repetições. As placas são incubadas por 5 dias e após a adição de lugol, é realizada a contagem de L₁ e L₃ vivas para cálculo da porcentagem de inibição do desenvolvimento larvar.

4.4) Teste de inibição da alimentação larvar (Larval Feeding Inhibition Assay - LFIA)

Fezes contaminadas por ovos de nematóides gastrintestinais são obtidas diretamente da ampola retal dos animais e são lavadas com o uso seqüencial de peneiras. Os ovos são recuperados conforme já descrito e então incubados em B.O.D. a 22°C. Após 18 a 24 h, as L₁ já podem ser utilizadas no teste. Para isto, elas são coletadas pela técnica de Baermann modificada e utilizam-se somente as larvas que migraram para a água morna após 30 min.. Cada tratamento é feito em tubos eppendorf adicionando-se 1.400 µL do extrato vegetal e 100 µL de água contendo cerca de 100 L₁. Os tratamentos são realizados em 2 repetições. Após 2 h em temperatura ambiente, cada tubo recebe 7,5 µL de *E. coli* liofilizada associada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o conteúdo é agitado em vórtex. Os tubos são então acondicionados horizontalmente em B.O.D. a 22°C por 18 h no mínimo. Os tubos são centrifugados por 20 sec. a 6.000 x g e o sobrenadante é descartado. Retira-se 8 µL do fundo de cada tubo e coloca-se em lâmina para leitura das larvas que se alimentaram (intestino fluorescente). O processo se repete até a leitura aproximada de 100 larvas por tubo. É necessária a preparação do controle usando-se o solvente na mesma concentração dos tratamentos (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005; MRI Proc. 121).

4.5) Teste de eliminação da cutícula larvar (Larval Exsheathment Assay - LEA)

L₃ são obtidas por meio de coprocultura e realizam-se 3 contagens de amostras de 20 µL. É necessário preparar 1.500 larvas em 1.500 µL de água. Este volume é inserido em tubo contendo 10 mL do extrato vegetal preparado com PBS (7,2 pH). O tubo é colocado em B.O.D. a 22°C por 3 h.

A solução de hipoclorito de sódio (2% v/v) deve ser então preparada em concentração na qual se obtém um resultado linear de eliminação da cutícula do isolado, ao longo de 1 h. Uma concentração de referência pode ser 1 mL de solução de hipoclorito em 125 mL de água. Adiciona-se 1.400 µL desta solução em cada poço de placas de 24 poços. O tubo contendo as larvas é centrifugado 3 vezes por 2 min. a 203 x g, o sobrenadante é descartado e o volume sempre completado com PBS. Após a última centrifugação, retirar o sobrenadante deixando no tubo 1.500 µL (com cerca de 1.500 L₃). Retirar 100 µL e colocar em cada poço que já contém 1.400 µL da solução de hipoclorito. Programar o alarme do timer a cada 10 min. até 60 min.. A cada 10 min. 2 repetições recebem uma gota de lugol. Ao final de 60 min. procede-se à contagem das larvas com e sem cutícula. O controle deve ter número crescente de larvas sem cutícula, chegando ao número total de larvas aos 60 min.. Espera-se perda lenta da cutícula nas larvas submetidas aos tratamentos com os extratos vegetais (BAHUAUD et al., 2006).

4.6) Teste de inibição da migração larvar (Larval Migration Inhibition assay – LMIA, desenvolvido recentemente no Moredun Research Institute)

Normalmente este teste é realizado com L₃ sem cutícula. Para isto, coloca-se 10 mL da suspensão larvar obtida por coprocultura em tubo de centrifugação e adiciona-se entre 700 µl a 1mL (deve ser ajustado) de solução de hipoclorito de sódio (2% v/v). Em aproximadamente 3,5 min. as larvas perdem a cutícula, mas o processo deve ser monitorado por meio de amostras ao microscópio. O tubo é então centrifugado a 203 x g por 2 min., o sobrenadante é descartado, adiciona-se água ou PBS, mistura-se e centrifuga-se novamente, repetindo-se todo o processo 3 vezes.

Utiliza-se a técnica de Baermann em placas de 6 poços para coleta das larvas com capacidade de migração. As placas são colocadas por 2 h em B.O.D. a 27°C e as larvas que migraram são coletadas. Aproximadamente 100 a 150 larvas são colocadas em tubos eppendorf contendo 1 mL do extrato vegetal preparado em água destilada ou PBS. Os tubos são agitados em vórtex. O DMSO pode ser utilizado como emulsificante e a concentração ajustada para cada isolado. São feitas 2 repetições e os controles. Pode-se usar o levamisol no controle positivo. Após 2 h de incubação a 27°C, os tubos são centrifugados a 15.000 x g por 2 min., o sobrenadante é descartado deixando-se 200 µl. Coloca-se 1.800 µl de cada extrato vegetal em cada poço e adiciona-se os 200 µl de suspensão larvar para coleta das larvas por meio da técnica de Baermann. A placa é coberta e colocada em B.O.D. por mais 2 h a 27°C. Então se procede à contagem das larvas que migraram e das larvas retidas na malha de 20 µm. A porcentagem de migração é calculada com a fórmula abaixo e pode-se usar a análise Probit para calcular a LM₅₀ (concentração na qual 50% das larvas não migraram).

$$\% \text{ migração} = \frac{n \text{ de larvas que migraram}}{n \text{ de larvas que migraram} + n \text{ de larvas que não migraram}} \times 100$$

(n de larvas que migraram + n de larvas que não migraram)

4.7) Método do desafio direto *in vitro* (In vitro Direct Challenge Method – IVDC)

Inicialmente procede-se à retirada da cutícula das L₃ conforme descrito no item 4.6. As larvas são então incubadas no extrato vegetal por 3 h a 20°C e então centrifugadas e lavadas 3 vezes em PBS. Brunet et al. (2008) sugerem o uso de 6 repetições por tratamento, inclusive para os controles, e o PBS é utilizado para evitar alterações no pH do meio. Para a preparação dos explants, retira-se um pedaço de aproximadamente 4 cm² do abomaso que é

colocado em cada poço de uma placa de 6 poços. Um cilindro é colocado no centro de cada explant formando uma câmara isolada onde as larvas são colocadas em contato com a mucosa. Em volta do cilindro adiciona-se 1 mL de solução a 37°C composta conforme Jackson et al. (2004). Insere-se no centro do cilindro cerca de 1.500 L₃ sem cutícula, preparadas em 0,5 mL de PBS a 37°C. A placa é tampada com certa pressão de forma a isolar as câmaras e então incubada em câmara escura a 37°C por 3 h. O tempo de sacrifício do animal até a incubação da placa não deve exceder a 40 min.

Após a incubação, os cilindros são removidos e lavados dentro de tubos tipo Falcon usando-se 35 mL de solução salina fisiológica a 0,9%. O mesmo ocorre com cada poço da placa e com os explants. Por último, os explants são colocados em tubos contendo 35 mL de solução de pepsina a 1%/solução de HCl a 1% para que ocorra a digestão do tecido, que fica incubado na solução overnight a 37°C. O conteúdo do tubo é fixado com 0,5 mL de lugol. Para a realização da contagem das larvas, o volume de cada tubo é ajustado para 40 mL adicionando-se solução salina fisiológica. O número de larvas presentes em uma alíquota de 4% é determinado em microscópio (BRUNET et al., 2008). Cálculo da porcentagem de larvas associadas com a mucosa:

$$\% \text{ L associadas} = \frac{\text{n de larvas obtidas do tecido digerido}}{\text{n de larvas não associadas} + \text{n de larvas obtidas do tecido digerido}} \times 100$$

4.8) Teste de motilidade em vermes adultos (Adult Motility Assay – AMA)

Na Embrapa Pecuária Sudeste utiliza-se a metodologia de Hounzangbe-Adote et al. (2005). Uma ovelha com elevado OPG é sacrificada e, imediatamente após a morte, o abomaso é coletado, aberto com uma incisão longitudinal e lavado com solução salina. O abomaso é imerso em funil contendo solução salina a 37°C. Uma a duas horas depois, os espécimes de *Haemonchus contortus* que sedimentaram são retirados e incubados por 1 h a 37°C em PBS, com penicilina e estreptomicina a 4%. Adiciona-se 1 mL dos extratos vegetais em 5 concentrações diferentes. Como opção as diluições dos extratos podem ser produzidas adicionando-se PBS com penicilina e estreptomicina a 4%. Logo em seguida, os parasitas em movimento são transferidos na proporção de 3 parasitas/poço (placas de 24 poços). Também são preparados o controle contendo somente PBS com antibiótico e outro contendo também o solvente. No controle positivo pode-se utilizar anti-helmínticos que causam paralisia (ivermectina ou levamisol). Para cada tratamento são feitas de 3 a 8 repetições. As placas são incubadas em estufa a 37°C, 100% de umidade relativa e em estufa com CO₂ a 5%. Os parasitas são observados nos seguintes intervalos de tempo: 2, 4, 6, 20, 24 e 48 h. O meio é mudado a cada 24 h e o cálculo da motilidade é feito para cada observação dividindo-se o número de parasitas imóveis pelo total de parasitas nos poços das repetições.

TESTES A CAMPO

O fornecimento oral de partes de plantas para pequenos ruminantes foi realizado com o objetivo de se verificar ação antiparasitária sobre nematóides gastrintestinais. Não foi observado efeito do Neem (*Azadirachta indica*, Meliaceae) na dose de 30g de folhas secas/animal/dia, fornecido por 5 dias consecutivos. O OPG foi monitorado diariamente por 28 dias nos grupos tratado e controle contendo 12 cabras cada (CHAGAS; VIEIRA, 2007). Também realizou-se experimento com 40 ovelhas da raça Morada Nova divididas em 5 tratamentos de 8 animais: no tratamento 1 ou controle, os animais receberam milho moído (100 g/animal/dia). No tratamento 2 forneceu-se diariamente 1.6 g/animal/dia de produto homeopático (segundo recomendações do fabricante), misturado ao milho por 18 meses. Nos tratamentos 3, 4 e 5, forneceu-se respectivamente 12.5, 25.0 e 37.5 g/animal de folhas de *A. indica*, fenadas, trituradas e incorporadas ao milho, administradas 15 dias sim e 15 dias não. Os animais permaneceram durante o experimento em piquetes separados de pastagem nativa raleada, onde também pastejavam. Foram feitas 39 coletas quinzenais para realização de OPG e coprocultura. As porcentagens médias dos gêneros identificados durante o experimento foram: *Haemonchus*: 65.58 ± 3.27, *Trichostrongylus*: 15.92 ± 7.38 e *Oesophagostomum*: 18.50 ± 6.22. Os tratamentos avaliados não foram eficientes no controle dos nematóides gastrintestinais (P>0.05). As médias de OPG (Log₁₀) para os tratamentos de 1 a 5 foram, respectivamente, 3,55 ± 0,28; 3,48 ± 0,31; 3,90 ± 0,29; 2,78 ± 0,29 e 3,48 ± 0,30. Observou-se efeito altamente significativo (P<0,0001) entre os períodos de coleta (início, meados e final da estação seca, início e meados da estação chuvosa), cujas médias foram, respectivamente, 2,74c ± 0,19; 3,75b ± 0,19; 4,34a ± 0,21; 3,47b ± 0,25 e 2,56c ± 0,25 (CHAGAS et al., 2008b).

Deve-se considerar que a azadiractina-A, substância que se acredita ser ativa sobre os parasitas, está presente na semente a uma concentração aproximada de 24,85 mg/ 100g, enquanto nas folhas de 0,59 mg/100 g (SUNDARAM, 1996).

Na tentativa de se desenvolver produtos fitoterápicos com características comerciais, tais como, eficácia comprovada *in vivo*, matéria-prima padronizada disponível e viabilidade econômica, alguns experimentos estão sendo conduzidos nos rebanhos ovino e bovino da Embrapa Pecuária Sudeste e os resultados serão apresentados. Formulações, que têm como base extratos vegetais, estão sendo trabalhadas no sentido de se evitar a destruição das substâncias ativas pela flora ruminal e pH ruminal, no caso de nematóides gastrintestinais de ovinos, bem como aumentar o período residual, no caso de ectoparasitas de bovinos.

CONCLUSÃO

Em função da grande variedade de testes *in vitro* para nematóides gastrintestinais, pode-se afirmar que o LDT tem demonstrado problemas com relação à contaminação do meio ou obtenção de baixas taxas de desenvolvimento de L₁ para L₃. O LFIA tem sido utilizado para a realização de screenings de extratos vegetais ativos, visto que esse é um teste mais sensível por utilizar L₁. O LEA é simples, prático e de uso mais freqüente, ao contrário do IVDC, que é um teste bastante laborioso. Avaliações de resistência às lactonas macrocíclicas têm ajudado a padronizar o LMIA. Um extrato vegetal de grande potencial pode ter seu uso subestimado ou simplesmente descartado se as metodologias disponíveis não forem utilizadas de forma correta.

Em experimentos realizados com *A. indica*, o fornecimento de folhas para consumo direto pelos animais não é recomendado em função da ineficácia comprovada no controle de nematóides gastrintestinais. Além disto, a folha possui gosto amargo e a ingestão é evitada pelos animais. Pesquisas de formulações que contornem problemas com a absorção e com a solubilidade devem ser realizadas buscando-se boa biodisponibilidade e eficácia antiparasitária. A

formação de grupos de pesquisa multidisciplinares e parcerias com a indústria de medicamentos veterinários poderão viabilizar o desenvolvimento de novas alternativas de controle parasitário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M.A.; GARCÍA, J.P.; BARTLEY, D.; JACKSON, F.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 56-61, 2005.
- BAHUAUD, D.; MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO, C.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 132, p. 545-554, 2006.
- BARROS, A.T.M.; GOMES, A.; ISMAEL, A.P.K.; KOLLER, W.W. Susceptibility to Diazinon in populations of the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 905-907, 2002.
- BIZIMENYERA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 336-343, 2006.
- BRUNET, S.; JACKSON, F.; HOSTE, H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 783-790, 2008.
- CHAGAS, A.C.S.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; PRATES, H.T.; PASSOS, W.M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v. 33, p. 109-114, 2003.
- CHAGAS, A.C.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; CARVALHO, C.O.; GEORGETTI, C.S.; SCHIAVONE, D.C.; FERREZINI, J.; FREITAS, A.R. Otimização da eclodibilidade larvar no Egg Hatch Test. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais...Curitiba: CBPV, 2008a. CD ROM.**
- CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de *Eucalyptus* em *Boophilus microplus*: óleos essenciais e concentrados emulsionáveis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
- CHAGAS, A. C. S., VIEIRA, L.S. Ação ovicida in vitro e in vivo de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 49-55, 2007.
- CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L.S.; FREITAS, A.R.; ARAÚJO, M.R.A.; ARAÚJO-FILHO, J.A.; ARAGUÃO, W.R.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* a. juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 68-73, 2008b.
- COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.
- DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- FAO PLANT PROTECTION BULLETIN. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides: tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp. **FAO method n.º7**, v. 19, p. 15-18, 1971.
- HOUNZANGBE-ADOTE, M.S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; MOUTAIROU, K.; HOSTE, H. In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 155-160, 2005.
- 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.
- JACKSON, F.; GREER, A.W.; HUNTLEY, J.; McANULTY, R.W.; BARTLEY, D.J.; STANLEY, A.; STENHOUSE, L.; STANKIEWICZ, M.; SYKES, A.R. Studies using *Teledorsagia circumcincta* in an *in vitro* direct challenge method using abomasal tissue explant. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 73-89, 2004.
- MIGLIATO, M.A.T. **Avaliação da toxicidade de solventes e emulsificantes utilizados em experimentos com fitoterápicos sobre ovos de nematóides gastrintestinais de ovinos**. Monografia de conclusão de curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da UNICEP, 2007. 33p.
- MRI. **Larval feeding inhibition assay (LFIA)**. Standard Operating Procedures of Moredum Research Institute. PROC 121, 2008. 3p.
- OLIVEIRA, M.C.S.; CHAGAS, A. C. S.; FERREZINI, J.; CARVALHO, C.O. Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* sobre larvas de terceiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais...Curitiba: CBPV, 2008. CD ROM.**
- SHEPPARD, D.C.; HINKLE, N. C. A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **Journal of Agricultural Entomology**, v.4, p.87-89, 1987.
- SMITH, C.L. **Mass Production of Screw-Worms (*Callitroga hominivorax*) for the Eradication Program in Southeastern States**. **Journal of Economic Entomology**, v.53, n.6, p.1110-1116, 1960.
- SUNDARAM, K.M.S. Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environment behavior and biological effects. **Journal of Environmental Science and Health**, v. B13, p. 913-948, 1996.