



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
SISTEMAS AGROSILVIPASTORIS NO SEMIÁRIDO**

**FITOQUÍMICA PRELIMINAR, TOXICIDADE E AÇÃO
ANTI-HELMÍNTICA DO EXTRATO HIDROACÓOLICO
DA *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. EM *Haemonchus contortus*
DE OVINOS NO SEMIÁRIDO PARAÍBANO**

FABIO DUARTE DE ANDRADE

PATOS-PB

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
SISTEMAS AGROSILVIPASTORIS NO SEMIÁRIDO**

**FITOQUÍMICA PRELIMINAR, TOXICIDADE E AÇÃO
ANTI-HELMÍNTICA DO EXTRATO HIDROACÓOLICO
DA *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. EM *Haemonchus contortus*
DE OVINOS NO SEMIÁRIDO PARAÍBANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia, Área de Concentração em Sistemas Agrosilvipastoris no Semiárido.

Fabio Duarte de Andrade

ORIENTADOR: Prof. Dra. ANA CÉLIA RODRIGUES ATHAYDE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. WILSON WOUFLAN SILVA

**Patos-PB
2014**

A553f Andrade, Fabio Duarte de.

Fitoquímica preliminar, toxicidade e ação anti-helmíntica do extrato hidroalcólico da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. em *Haemonchus contortus* de ovinos no Semiárido Paraibano. / Fabio Duarte de Andrade. - Patos - PB: [s.n], 2014.

33 f.

Orientadora: Professora Dr^a. Ana Célia Rodrigues Athayde.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

1. Fitoterapia - ovinos. 2. Metabolitos secundários. 3. Perfil fitoquímico - *Tarenaya spinosa*. 4. *Tarenaya spinosa* - extratos etanólicos. 5. *Artemia salina* Leach - náuplios. 6. Mussambê. Helmintoses gastrintestinais - ovinos 7. Plantas medicinais - tratamento de ovinos. I. Athayde, Ana Célia Rodrigues. II. Título.

CDU:636.(043)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
SISTEMAS AGROSILVIPASTORIS NO SEMIÁRIDO**

FICHA DE AVALIAÇÃO

TÍTULO: Fitoquímica preliminar, toxicidade e ação anti-helmíntica do extrato hidroalcolólico da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. em *Haemonchus contortus* de ovinos no semiárido Paraibano

AUTOR: Fabio Duarte de Andrade

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Ana Célia Rodrigues Athayde

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Wilson Wouflan Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Célia Rodrigues Athayde
UFCG-Orientador

Prof. Dr. Adriano Fernandes Ferreira
UFCG

Prof. Dr. Maria das Graças Veloso Marinho
UFCG

Dedico:

A ***Deus***, a quem eu amo incondicionalmente, a quem alimenta em Espírito, a quem é meu fiel amigo, a quem amanhece comigo e sabe das forças e fraquezas, quem me dá o dom da vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao senhor Deus que mim deu força e coragem mim proporcionando saúde e proteção para que eu nunca parasse de lutar e nunca desistir dos meus sonhos, um desses estou acabando de concretizar.

Aos meus valiosos pais, João Raimundo Duarte e Maria Alves Duarte, que sempre estiveram do meu lado em quaisquer circunstâncias, dando-me carinho, atenção e incentivo para vencer os obstáculos da vida.

Aos meus irmãos Adjelson, Biri, Raimundo, por todo apoio carinho e incentivo nessa faze de minha vida, as minhas irmãs Risomar, Risoneide, Rosilda, Neidinha, Aldeni, Aldenora e Rosilene a todos esses que de forma direta e indireta sempre mim apoiaram em minhas escolhas, pelos momentos compartilhados, sempre com amor, paciência e dedicação os meus agradecimentos.

Aos meus tios, primos e familiares, que contribuíram com palavras amigas, quando sempre precisei.

Aos meus cunhados Domingos Moreira, Edivan Miguel, Manoel Soares, Marcondes, Chico de Santana, Chico de Alexandre, Ricardo, as minhas cunhadas Margarida a qual tenho como segunda mãe, Genilma e Adriana que além de serem amigos verdadeiros, são praticamente meus irmãos e irmãs.

Aos meus queridos primos, sobrinhos e sobrinhas, a quem aprecio com amor, carinho e felicidade e a minha namorada Thais Andrade pelos momentos felizes, que com muita paciência soube compreender a minha ausência e ainda me incentivar nessa batalha.

Aos companheiros de mestrado em especial a Ana Raquel e “Du Carmo” com quem compartilhei dias de trabalhos cansativos para que hoje esteja pronta essa dissertação.

A Professora Ana Célia Rodrigues Athayde, meu obrigado por ter me aceitado como orientado e ter acreditado em mim. Pelas oportunidades oferecidas e dedicação.

Ao Professor Wilson Wolflan Silva, um co-orientador dedicado que disponibilizou horas de trabalho para essa defesa.

A banca examinadora Maria das Graças Veloso Marinho e Adriano Fernandes Ferreira pela disponibilidade, interesse e contribuição nas sugestões oferecidas a este.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES,
pela concessão da bolsa.

Ao funcionário Ari Cruz (secretário amigo, competente, dedicado e muito
eficiente), pela amizade e suporte prestado nesta caminhada.

Aos professores da Pós-Graduação em Zootecnia deste centro, que contribuíram
para minha formação.

Obrigada por tudo!

EU CONSEGUI!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
INTRODUÇÃO.....	9
CAPÍTULO 1.....	10
INTRODUÇION.....	Erro! Indicador não definido.3
MATERIAL AND METHODS.....	Erro! Indicador não definido.4
Botanic Material Collecting.....	14
Botanic Extracts Obtainment.....	14
Chemical Prospecting.....	14
LC50 Determination.....	15
Data Analysis.....	15
RESULTS AND DISCUSSION.....	16
Chemical Constituents.....	16
LC50 Acute Toxicity.....	18
CONCLUSION.....	19
REFERENCES.....	19
CAPÍTULO 2.....	24
INTRODUÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.6
MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.6
Coleta do Material Botânico.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.6
Obtenção dos Extratos Botânicos.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.6
Teste <i>in vitro</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.6
Teste <i>in vivo</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.7
Análise Estatística.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.8
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.8
CONCLUSÃO.....	Erro! Indicador não definido.9
REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.9
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	3333
ANEXOS.....	34

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Preliminary phytochemical analysis of secondary metabolites of ethanol extracts of *Tarenaya spinosa*.....16

Table 2. LC50 values calculated for different extracts of *Tarenaya spinosa* and respective 95% confidence interval.....18

CAPÍTULO 2

Quadro 1. Número de óbitos de *A.salina* frente às frações testadas e suas respectivas concentrações com o resultado da CL50% no intervalo de confiança de 95%.....32

Quadro 2. Percentuais de eclodibilidade e eficiência do extrato etanólico do caule de *T. spinosa* sobre *Haemonchus contortus* de ovinos.....32

Quadro 3. Média aritmética, re-transformada $[(\log (x+1))]$, desvio padrão e percentual de redução do OPG de ovinos artificialmente infectados com *H. contortus*, submetidos a diversos tratamentos.....32

Quadro 4. Valores percentuais médios do hematócrito de ovinos artificialmente infectados com *Haemonchus contortus* nos diversos tratamentos.....32

INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma atividade bastante explorada, a ovinocaprinocultura no Nordeste Brasileiro, antes era considerada uma atividade marginal ou de subsistência, normalmente com baixa produtividade, adotando pouca tecnologia e apresentando baixos níveis de rentabilidade. Atualmente, a produção destes pequenos ruminantes vem se caracterizando como uma atividade de grande importância cultural, social e econômica para a região, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento do Nordeste.

A ovinocultura representa uma boa alternativa de trabalho e renda, visto a produção de alimentos de alto valor biológico (leite, carne e vísceras), bem como de pele de excelente qualidade, além da adaptabilidade dos animais aos ecossistemas locais.

Entretanto o maior entrave na produção são as helmintoses gastrintestinais que representam a maior parcela de prejuízos para o setor produtivo. Dentre elas se destaca o *Haemonchus contortus* que apresentam maior prevalência e maior intensidade de infecção, sendo considerado o nematódeo de maior importância econômica para exploração desses animais. O controle dessas parasitoses é feito principalmente empregando-se anti-helmínticos sintéticos, sem estudo prévio das reais causas de infecções, essas drogas são administradas de maneira indiscriminada, podendo selecionar linhagens resistentes, poluir o meio ambiente, aumentar os riscos de intoxicação e os custos de produção.

Diante do exposto, a fitoterapia surge como uma alternativa, devido ao largo uso de plantas na medicina popular e à diversidade de espécies vegetais encontradas no Brasil. Dentre estas, destaca-se o mussambê *Tarenaya spinosa* (JACQ.) RAF, planta encontrada em todas as regiões do Brasil usada empiricamente no combate a diversos tipos de infecções. A maior parte das plantas medicinais nativas permanece sendo usada de forma tradicional, sem conhecimento dos seus princípios ativos e efeitos colaterais, em muitas espécies esse estudo ainda não foi realizado. Portanto, são necessários estudos de prospecção desta espécie, como fonte de princípios ativos para novas drogas, assim como testes *in vitro* e *in vivo* para se avaliar cientificamente a eficácia e a viabilidade dessa planta perante o controle de *Haemonchus contortus* de ovinos.

CAPÍTULO 1

**Fitoquímica preliminar e determinação da toxicidade do extrato botânico de
Tarenaya spinosa (Jacq.) Raf. em *Artemia salina* Leach**

(Manuscrito enviado ao periódico Revista Brasileira de Plantas Mediciniais)

Preliminary phytochemistry and toxicity determination of botanical hydroalcoholic extract of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. on *Artemia salina* Leach

ANDRADE, F.D.¹, RIBEIRO, A.R.C.^{1*}, MEDEIROS, M.C.¹; BENVENUTTI, M.E.M²; RODRIGUES, O.G.¹; MAGALHÃES, F.E.A.³; SILVA, W.W.²; ATHAYDE, A.C.R.¹

¹*Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG* ²*Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Cx.P.: 64 - CEP: 58708-110;* ³*Laboratório de Bioprospecção de produtos Naturais e Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará – UECE. Rua Solon Medeiros, S/N - BR 020 Tauá - CE - Cep: 63.660-000. *a.raquel.ribeiro@hotmail.com*

ABSTRACT: In this study, we evaluated the phytochemical profile and toxicity of hydroalcoholic extracts of *Tarenaya spinosa* on nauplii of *Artemia salina*. The hydroalcoholic extracts of leaves, stem and roots were submitted to phytochemical prospecting to identify their main classes of secondary metabolites. Besides, they were tested on *A. salina* to obtain the average lethal concentration (LC50). Phytochemicals tests showed the presence of triterpenoids, coumarins, saponins, flavonoids, phenols and xanthones. The

used concentrations showed to be toxic on *A. salina* with LC50 values less than 1000 µg/ml. The root extract showed a higher degree of toxicity, followed by the leaf and the stem, with LC50 values of 150, 178.82 and 438.04 respectively. The results corroborate the importance of plants as sources of secondary metabolites with possible pharmacological action. Moreover, they are relevant to the assessment of toxicity in monitoring the correct dosage of herbal products.

Keywords: Lethal concentration; secondary metabolites; herbal.

RESUMO: Fitoquímica preliminar e determinação da toxicidade o extrato hidroalcoólico da planta of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf em *Artemia salina* Leach. No presente trabalho avaliou-se o perfil fitoquímico e a toxicidade dos extratos etanólicos da *Tarenaya spinosa* frente aos náuplios de *Artemia salina*. Os extratos etanólicos das folhas, caule e raiz foram submetidos à prospecção fitoquímica para identificação de suas principais classes de metabolitos secundários e testados em *A. salina* para obtenção das concentrações letais médias (CL50). Os testes fitoquímicos demonstraram a presença de triterpenóides, cumarinas, saponinas, flavonóides, xantonas e fenóis. As concentrações utilizadas mostraram-se tóxicos frente a *A. salina* com valores de CL50 menores que 1000 µg/mL, o extrato da raiz revelou maior grau de toxicidade, seguida da folha e caule, com valores de CL50 respectivamente 150; 178,82 e 438,04. Os resultados apresentados nesse trabalho corroboram com a importância das plantas como fontes de metabólitos secundários com

possível ação farmacológica mostrando-se relevante a avaliação da toxicidade no monitoramento da dosagem correta de produtos fitoterápicos.

Palavras chave: Toxicidade; metabolitos secundários; fitoterápicos.

INTRODUCTION

The use of medicinal plants for therapeutic purposes is known since antiquity (Nguta et al., 2012). However, due to the advancement of synthetic drugs, the use of plants as medicine got a little forgotten (Oga et al., 2008). Anyhow, induced mutations in the microorganism with a consequent increase in the number of strains resistant to allopathic drugs caused the need of searching for new unconventional alternative therapies (Ribeiro et al., 2013).

Tarenaya spinosa, popularly known as “mussambê” is a shrubby species of family Capparaceae, which may reach the height of 1 to 1.8 meters tall and grows in shallows, banks of rivers and dams found in the Midwest, Northeast, North and South Brazil (Lima et al., 2013).

Species of the genus *Tarenaya* are rich in flavonoids (Bose et al., 2007). Reports have shown that *T. spinosa* produces cytotoxic, antioxidants, antimicrobials and insecticides effects (Mcneil et al., 2010). Despite presenting numerous therapeutic activities, the indiscriminate use of medicinal plants becomes a risk because they may show signs of toxicity (Garcez et al., 2013).

Artemia salina is a microcrustacean of phylum Arthropoda found in all parts of the world (Arcanjo et al., 2012). It is widely known as an indicator of toxicity in bioassays that use LC50 as parameter for assessing toxic biological activity (Nardo et al., 1997; Araújo et al., 2010). It fits in various environments due to the relative resistance to environmental stress factors and it is

considered as a source of cheap bioassays and easy implementation for testing botanical extracts (Mayorga et al., 2010).

In this context, we aimed at assessing in a preliminary way the chemical constitution and the determination of the toxicity of ethanol extracts of *Tarenaya spinosa* in biological model on *Artemia salina*.

MATERIAL AND METHODS

Botanic Material Collecting

The procedures for collecting and herborization of the plant species were performed based on the methodologies described by Cartaxo et al. (2010). Samples of *Tarenaya spinosa* were collected in the morning in the microregion of Inhamuns (Tauá-Ceará), (S 06°00.215' W 040°16.953'). A plant voucher specimen is stored at Herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) of UFCG Campus – Patos - PB, under register number 4021.

Botanic Extracts Obtainment

The leaves, stem and root of *T. spinosa* were crushed and packed in glass containers. Ethanol at 96% was used as organic solvent for the extracts during a period of 96h. After this period, simple filtrations were performed and the organic extracts were kept at room temperature ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) for complete evaporation of the solvent according to the methodology proposed by Pereira et al. (2009) with some adaptations.

Chemical Prospecting

The preliminary exploration of chemical extracts was based on the methodology proposed by Matos (2009). Qualitative tests were performed to verify the presence of triterpenoids, coumarins, saponins, flavonoids, xanthones and phenols. The assays were performed in triplicate for each sample and, as negative control, test tubes containing distilled water under the same conditions for each test were used.

LC50 Determination

Assays were performed in triplicate based on the methodology described by Araújo et al. (2010). Ten nauplii of *A. salina* per well in plate of Eliza containing saline and alcoholic extracts of parts of *T. spinosa* were dissolved in a solution of dimethylsulfoxide (DMSO) at 1% in the concentrations of 100, 500 e 1000µg/ml, resulting in a final volume of 5 ml per well. As negative controls, saline solution and DMSO at 1% were used. After 24h in contact with the solutions, the number of surviving nauplii was counted and the larvae that remained immobile for more than 10 seconds were considered dead. Concerning to the degree of toxicity, we adopted the LC50 classification < 80µg/ml as very toxic, LC50 between 80µg/ml and 250µg/ml as moderate and LC50 > 250µg/ml as little toxic or non-toxic (Mayer et al., 1982; Vinatea et al., 1994).

Data Analysis

To evaluate the results of chemical prospecting, the descriptive analysis of the changes of color and formation of the precipitate was performed and the

chemical constituents of the extracts were classified as strong (+++), medium (++), weak (+), suspicious (S), absent (0) and not determined (-).

When checking the toxicity evolution of the extract of *T. spinosa* on *A. salina*, the values obtained with the average of dead nauplii were subjected to statistical analysis, estimating the lethal concentration to kill 50% (LC50) of the larvae through the analysis of Probits, according to TRIMMED SPEARMAN-KARBBER mathematical method (Hamilton et al., 1977) with 95% of confidence interval.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Constituents

Through preliminary phytochemical analysis, it was possible to identify classes of secondary metabolites of pharmacological interest found in ethanol extracts of different parts of *T. spinosa* (Table 1). The root showed higher amount of metabolites, followed by the stem and the leaves.

TABLE 01. Preliminary phytochemical analysis of secondary metabolites of ethanol extracts of *Tarenaya spinosa*.

Classes of Metabolites	<i>Tarenaya spinosa</i>		
	Leaf	Stem	Root
Triterpenoids	-	++	+++
Coumarins	+++	++	-
Saponins	++	-	-
Flavonoids	-	+++	+++
Xanthones	-	-	+++
Phenols	-	+++	+++

(+++) strong; (++) medium; (+) weak; (S) suspicious; (-) absent.

The class of flavonoids secondary metabolite found in the root of *T. spinosa* is one of the most important one among the natural products (Nijveldt et al., 2001). More than 5000 different flavonoids found in the root of *T. spinosa* have been described and they may present antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities (López-Posadas, 2008), giving them great pharmacological importance (Formica & Regelson, 1995). Phenols have shown to be effective as antioxidants in food and biological systems (Pereira, 2010).

The saponins found with medium intensity only in the leaves of *T. spinosa* is a natural surfactant that has important actions in the control of parasites in animals (Francis et al., 2002) with antiprotozoal activity and anti-inflammatory action (Cheek & Otero, 2005).

The triterpenoids found in the stem and more intensively in the roots are described in the literature with pharmacological activities, highlighting the anti-inflammatory, antitumor, antimalarial and cytotoxic actions (Patocka, 2003). Many of the isolated of triterpenoids from family Brassicaceae are of lupanos and damaranos types (Abel-Mogib, 1999).

The leaves of *T. spinosa* present higher concentrations of coumarins class metabolites, which have odoriferous characteristics that allows it to be used as natural repellants and that presents antimicrobial, bronchodilator and fungicide activities (Rodrigues et al., 2008).

Despite the large number of genera of family Capparaceae, it is evidenced a low percentage of phytochemicals work reported in the literature, mainly related to the species *T. spinosa*.

LC50 Acute Toxicity

Checking the toxicity of ethanol extracts of parts of *T. spinosa* on *A. salina*, it was found that the root showed lower LC50 (150µg/mL), followed by the leaf and the stem (Table 2). According to the classification of Mayer et al. (1982) and Vinatea et al. (1994) leaves, stem and roots showed toxicity because they presented LC50 values lower than 1000µg/ml. The root and leaves were classified as moderate toxicity because presented LC50 between 80µg/ml and 250µg/ml. The root, however, was classified as low or without toxicity with LC50 >250µg/ml.

TABLE 02. LC50 values calculated for different extracts of *Tarenaya spinosa* and respective 95% confidence interval.

<i>Tarenaya spinosa</i>	LC50 (µg/mL)
Leave	178,82
Stem	438,04
Root	150

LC50 (lethal concentration for 50% of naupli of *A.salina*)

The presence of several metabolites, mainly in the roots, can justify their higher toxicity. Different results were observed by Silva et al. (2012), who found greater toxicity in the aqueous extract (tea) of the leaf and less cytotoxicity in the root on *A. salina*. This can be explained by the way in which the active principles were extracted once the roots passed only by the boiling process. Despite presenting the greatest amount of metabolites, it was the part that produced the lowest amount of extract.

Studies by Santos and Menezes (2005) demonstrates that the cytotoxic activity of the ethanol extract of the roots of *T. spinosa* on larvae of *Aedes*

aegypti and its antimicrobial action on *Staphylococcus aureus* and *Echerichia coli*. These results corroborate the results obtained in this study and confirm the toxicity of the root on different organisms, suggesting a possible natural larvicidal activity.

CONCLUSION

The preliminary phytochemical study of hydroalcoholic extracts of different parts of *Tarenaya spinosa*, associated with toxicity bioassay on *A. salina* becomes important in guiding the isolation and identification of compounds present in these fractions and characterization of the biological activity of this medicinal plant.

REFERENCES

- ABEL-MOGIB, M.A. Lupine triterpenoid from *Maerua oblongifolia*. **Photochemistry**, v. 51, n. 3, p. 445-448, 1999.
- ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S. Preliminary phytochemical studies and toxicological bioassay against larvae of *Artemia salina* Leach. extract obtained from fruits of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.
- ARCANJO, D.D.R.; ALBUQUERQUE, A.C.M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L.C.L.R.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian

Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v.72, n. 3, p. 505-509, 2012.

BOSE A.; GUPTA J.K.; DASH G.K.; GHOSH, T.; SI, S.; PANDA, D.S. Diuretic and antibacterial activity of aqueous extract of *Cleome rutidosperma*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69: n. 2, p. 292-294, 2007.

CARTAXO S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CHEEKE, P.R.; OTERO, R. Yucca, Quillaja may have role in animal nutrition. **Feedstuffs**, v. 77, 2005.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587-605, 2002.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; SARMENTO, U.C. Substances of Plant Origin with Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R. Trimmed Sperm-Karber: Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714 – 719, 1977.
- LIMA, E.A.; MACHADO-FILHO, H.O.; MELO, J.I.M. Aquatic angiosperms in the Environmental Protection Area (EPA) of Cariri, Paraíba state, Brazil. **Rodriguésia**, v. 64, n. 4, p. 667-683, 2013.
- LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A.C. , SUÁREZ, M.D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F.S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.
- MATOS, F.J. (3.ed.) **Introduction to experimental phytochemical**. Fortaleza: Editions UFC, 2009. 150p.
- MAYORGA, P.; PÉREZ, K.R.; CRUZ, S.M.; CÁCERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.
- MCNEIL, M.J.; PORTER, R.B.; WILLIAMS, L.A.; RAINFORD, L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 8, p. 1301-1306, 2010.
- 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

activ plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

NARDO, E.A.; COSTA, A.S.; LOURENÇÃO, A.L. *Melia azadirach* extract as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologist**, v. 80, n. 1, p. 92-94, 1997.

NGUTA, J.M.; MBARIA, J.M.; GAKUYA, D.W.; GATHUMBI, P.K.; KABASA, J.D.; KIAMA, S.G. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, n. 1, p. 30-34, 2012.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. 677p.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 7-12, 2003.

PEREIRA, E.C.; LUCETTI, D.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BRITO, E.M.; MONTEIRO, V.S.; PATROCÍNIO, M.C.; MOURA, R.R.; LEAL, L.K.; MACEDO, D.S.; SOUSA, F.C.; VIANA G.S.B.; VASCONCELOS, S.M.

Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 454, n. 2, p. 139-142, 2009.

PEREIRA, M.O.S. **Comparative Study of Methods for Assessment of Antioxidant Capacity of Bioactive Compounds**. Dissertation (Master's degree) Institute of Agronomy, Technical University of Lisbon, Portugal, 2010.

RIBEIRO, K.S.; GUIMARÃES, A.L.A. The use of medicines based on medicinal plants for medical SUS in the municipality of Teresopolis/RJ. **Revista Agrogeoambiental**. Ed. Especial, n. 1, p. 61-65, 2013.

RODRIGUES, R. F.; TASHIMA, A.K.; PEREIRA, R.M.S.; MOHAMED, R.S.; CABRAL, F. A. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 3, p. 375-382, 2008.

SANTOS, D.A.; MENEZES, J.E.S. A. Study of cytotoxic and antimicrobial activities *Cleoma spinosa* species native city of Itapipoca. In: ANNUAL MEETING SBPC, 57^a, 2005. Fortaleza-CE, Brasil. **Annais 57^a Annual Meeting SBPC**, Fortaleza-CE, Brasil, 2005.

VINATEA, J. E. Artemia exceptional living being. **Revista Panorama da Aqüicultura**, v. 4, n. 25, p: 8-9.

CAPÍTULO 2

Ação do extrato hidroalcolico de *Tarenaya spinosa* (JACQ.) RAF sobre ovos, larvas e adultos de *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano.

(Manuscrito enviado ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcolólico da raiz da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no controle de *Haemonchus contortus* em ovinos¹

Fabio D. Andrade², Ana Raquel C. Ribeiro^{2*}, Maria C. Medeiros², Saul S. Fonseca³, Ana Célia R. Athayde², Adriano F. Ferreira³, Onaldo G. Rodrigues² e Wilson W. Silva²

ABSTRACT.- Andrade F.D., Ribeiro A.R.C., Medeiros M.C., Fonseca S.S., Ferreira A.F., Rodrigues O.G., Silva W.W. & Athayde A.C.R. 2014. [Anthelmintic action of the hydroalcoholic extract of the root of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. for *Haemonchus contortus* control in sheep.] Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcolólico da raiz de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande, Rodovia Patos-Teixeira Km Zero, Jatobá, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: a.raquel.ribeiro@hotmail.com

To investigate the anthelmintic potential of hydroalcoholic extract of the root of *Tarenaya spinosa*, as an alternative in the control of gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep, *in vitro* tests were performed with *Artemia salina* then on stool cultures containing helminth eggs, assessing ovicidal and larvicidal action of the extract. After preliminary tests, the *in vivo* test was performed in 20 male sheep were divided into four treatments: Group 1 Ivermectin 1 %, Group 2: untreated; Group 3: hydroalcoholic extract of *T. spinosa* 150µg/mL; Group 4: hydroalcoholic extract *T. spinosa* 300µg/mL, stool samples and blood were collected for parasitological and haematological tests. In *in vitro* tests, toxicity against *A. salina* was 150µg/mL, there was obtained 81.53% efficiency against eggs and larvae of *H. contortus*. *In vivo* test, evaluating the effectiveness of treatments was performed by reduction test in faecal egg count (RCOF), the groups treated with Ivermectin and *T. spinosa* the 150µg/mL and 300µg/mL obtained the best results, reducing OPG after 28 days in 40.6, 41 and 42.6% respectively, thus revealing its herbal potential for control of gastrointestinal nematodes in sheep.

INDEX TERMS: *Tarenaya spinosa*, *Haemonchus contortus*, ovicidal and/or larvicidal action.

RESUMO.- Para investigar o potencial anti-helmíntico do extrato hidroalcolólico da raiz de *Tarenaya spinosa*, como alternativa no controle do nematóide gastrintestinal *Haemonchus contortus* de ovinos, foram realizados testes *in vitro* com *Artemia salina*, em seguida, sobre coproculturas contendo ovos do helminto, avaliando a ação ovicida e larvicida do extrato. Após os testes preliminares, foi realizado o teste *in vivo* em 20 ovinos machos os quais foram divididos em quatro tratamentos Grupo 1: ivermectina 1%; Grupo 2: sem tratamento; Grupo 3: extrato hidroalcolólico de *T. spinosa* 150µg/mL; Grupo 4: extrato hidroalcolólico de *T. spinosa* 300µg/mL, amostras de fezes e de sangue foram coletadas para exames parasitológicos e hematológicos. No teste *in vitro*, a toxicidade frente a *A. salina* foi de 150µg/mL, obteve-se eficiência de 81,53% sobre ovos e larvas do *H. contortus*. No teste *in vivo*, a avaliação da eficácia dos tratamentos foi realizada pelo teste de redução na contagem de ovos fecais (RCOF), os grupos tratados com Ivermectina e *T. spinosa* a 150µg/mL e 300µg/mL obtiveram os melhores resultados, reduzindo o OPG após 28 dias em 40,6, 41 e 40,2% respectivamente, revelando assim seu potencial fitoterápico para fins de controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Tarenaya spinosa*, *Haemonchus contortus*, ação ovicida e larvicida.

¹ Recebido em 1 de julho de 2014.

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Rodovia Patos-Teixeira Km Zero, Jatobá, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mails: medvetfabio@hotmail.com, ducamedeiros@hotmail.com, avelar.junior@hotmail.com, wouflan@hotmail.com, athayde@cstr@hotmail.com; *Autor para correspondência: a.raquel.ribeiro@hotmail.com

³ Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Veterinário, UFCG, Rodovia Patos-Teixeira Km Zero, Jatobá, Patos, PB 58700-970. E-mail: saul_123ssf@hotmail.com; adriano@cstr.ufcg.edu.br.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma importante fonte de renda no Brasil, pela sua alta produção de leite e de carne, com um rebanho aproximado de 17,3 milhões de animais (IBGE 2012). No entanto, a produção é limitada principalmente por práticas de manejo inadequadas no tocante à higiene sanitária, em especial, más condições de higiene que favorecem o aumento na população de parasitos gastrintestinais, dentre eles, *Haemonchus contortus* que é considerado o parasito de maior importância epidemiológica pela sua alta prolificidade e resistência a anti-helmínticos (Idris et al. 2012).

Tradicionalmente, o controle dos parasitos gastrintestinais em ovinos no Brasil é realizado por anti-helmínticos sintéticos e, seu uso indiscriminado, tem induzido à seleção de linhagens de parasitos resistentes, além de gerar resíduos contaminantes ao meio ambiente e aumentar custos na produção (Sutherland et al. 2008, Zaros et al. 2014)

Vários estudos têm apontado para novas alternativas de controle parasitário. Uma delas, de baixo custo e não poluente, é o uso de fitoterápicos (Egualde et al. 2007), que surge como uma opção devido ao largo uso de plantas na medicina popular, já que o Brasil apresenta a maior diversidade genética vegetal do mundo (Santos et al. 2013)

Dentre várias espécies com potencial anti-helmíntico, destaca-se o mussambê (*Tarenaya spinosa*), planta objeto desse estudo, muito utilizada empiricamente no combate a diversos tipos de enfermidades (Mcneil et al. 2010). É uma espécie herbácea da família *Capparaceae* que possui porte arbustivo, chegando à altura de 1 a 1,8 metros e está associada a áreas úmidas de ampla distribuição no Brasil (Lima et al. 2013), citada em outros trabalhos com o nome de *Cleome spinosa* (Moreira 2011).

Como triagem inicial de extratos vegetais, o teste de toxicidade sobre o microcrustáceo marinho *Artemia salina* tem sido bastante utilizado (Albuquerque et al. 2014), por ser de baixo custo, fácil execução, não requerer maiores cuidados com assepsia (Reis et al. 2013). Os resultados desse teste relacionam-se a testes de biológicos específicos, como o anti-helmíntico (Silva et al. 2014).

Objetivou-se com o presente trabalho investigar o potencial anti-helmíntico do extrato hidroalcoólico da raiz da *T. spinosa*, como alternativa no controle do nematódeo gastrintestinal *Haemonchus contortus* de ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico

Amostras das raízes de *Tarenaya spinosa* foram coletadas em março de 2013, no município de Patos, localizado no Centro-Oeste do Estado da Paraíba/Brasil, na intersecção das coordenadas geográficas de 6° 56' 13" Latitude S e 37° 23' 14" de Longitude W. A exsicata foi depositada no Herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) sob o protocolo de número 4021. Os procedimentos de coleta e herborização basearam-se nas metodologias de Cartaxo et al. (2010).

Obtenção do extrato hidroalcoólico

Raízes de *T. spinosa* foram trituradas e acondicionadas em recipientes de vidro, submetidas à extração por solvente orgânico utilizando etanol absoluto (100%) dissolvido em água destilada, para se obter 70% de concentração. Após 96h de percolação, foram realizadas filtrações simples onde os extratos orgânicos ficaram mantidos à temperatura ambiente (30±2°C) para evaporação total do solvente, segundo metodologia proposta por Pereira et al. (2009).

Teste *in vitro*

A ação tóxica do extrato hidroalcoólico de *T. spinosa* sobre *A. salina* e o efeito ovicida e larvicida de *H. contortus* foram testados *in vitro*.

A determinação da toxicidade da raiz do extrato de *T. spinosa*, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al. (2010). O extrato bruto foi diluído em solução de dimetil sulfoxido (DMSO) a 1%, nas concentrações 100, 500 e 1000µg/mL. Utilizaram-se três grupos controle: GC1 (Grupo Controle 1: DMSO a 1%); GC2 (Grupo Controle 2: Solução salina isotônica); GC3 (Grupo controle 3: NaClO a 1%).

A seguir, os valores obtidos com as médias dos náuplios mortos foram submetidos à análise estatística, estimando-se a concentração letal para matar 50% (CL50) das larvas através da análise

de Probits, pelo método matemático TRIMMED SPEARMAN-KARBER (Hamilton et al. 1977) com 95% de intervalo de confiança.

Para testar a ação ovicida e larvicida do extrato, foram feitas coproculturas utilizando a metodologia adaptada de Roberts & O'Sullivan (1950) com fezes contendo apenas ovos do nematóide *H. contortus*. A contagem média de ovos por grama de fezes (OPG) das amostras utilizadas no experimento foi de 6500.

As coproculturas foram confeccionadas em triplicata, em seguida, adicionados 2,5mL do extrato hidroalcoólico bruto diluído em água destilada na concentração da CL50 obtida a partir do teste sobre *A. salina*. Para o grupo controle, foi utilizada água destilada segundo metodologia proposta por Chagas & Vieira (2007). As amostras ficaram em repouso por sete dias, em temperatura ambiente e, em seguida, as larvas de terceiro estágio (L3) foram identificadas e contadas em microscópio óptico para determinação da eficácia do tratamento (ET), de acordo com a fórmula descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007):

$$\text{ET: } \frac{\text{L3 inicial} - \text{L3 do grupo tratado}}{\text{L3 inicial}}$$

Onde:

L3 inicial corresponde à estimativa do número de larvas em cada coprocultura;

L3 do grupo tratado corresponde à quantidade de larvas recuperadas após oito dias de incubação com os diferentes tratamentos.

Teste *in vivo*

O efeito do extrato hidroalcoólico de *T. spinosa* sobre *H. contortus* foi testado *in vivo*, em ovinos no semiárido paraibano. Para tanto, foram selecionados 20 animais sem padrão de raça definida (SRD), machos, com idade entre 6 e 12 meses e peso médio de 15 kg/PV.

Os animais passaram por um período de adaptação, onde foram mantidos em baias individuais (1,5m²), com piso ripado suspenso, distribuídas em um galpão medindo 15,0 x 8,0m com cobertura em telha de amianto, onde permaneceram durante toda a fase experimental. A alimentação consistia de capim *Brachiaria* sp. e milho misturado com sabugo e folhas (rolão) e recebiam água *ad libitum*. Todos os animais foram tratados durante três dias consecutivos com levamisol (10mg/kg PV) sendo que, no último dia também receberam albendazol (10mg/kg PV).

Sete dias após a vermifugação, foi realizada a contagem do OPG para certificar que os animais estavam desparasitados, o que foi verificado com uma contagem de OPG negativa,

Certificados de que os animais estavam isentos de parasitos gastrointestinais, procedeu-se uma monoinfecção através da ingestão oral de aproximadamente 3.000 larvas (L3) do nematódeo *Haemonchus contortus*, durante três dias consecutivos. Sendo confirmada a presença dos ovos dos parasitos numa nova coleta de fezes realizada 21 dias após a monoinfecção, esta coleta foi considerada a do dia 0 (zero). A seguir, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de cinco animais, sendo cada grupo submetido a tratamentos distintos com cinco repetições, conforme descrito abaixo:

- Grupo 1 (G1): Controle positivo, cujos animais receberam Ivermectina 1%, na dose única de 200µg/kgPV por via subcutânea;
- Grupo 2 (G2): Controle negativo, cujos animais não receberam nenhum vermífugo sintético ou natural;
- Grupo 3 (G3): Animais receberam semanalmente, durante cinco semanas, 10mL do extrato bruto da raiz de *T. spinosa*, dissolvido em água, na concentração de 150µg/mL, por via oral;
- Grupo 4 (G4): Animais receberam semanalmente, durante cinco semanas, 10mL do extrato bruto da raiz de *T. spinosa*, dissolvido em água, na concentração de 300µg/mL, por via oral.

Iniciados os tratamentos, foram realizadas coletas de fezes nos dias 7, 14, 21 e 28, com o objetivo de avaliar a ação dos tratamentos durante todo o ciclo interno de *Haemonchus contortus*.

Para determinação da eficiência dos tratamentos, foi utilizado o teste de Redução da Contagem de Ovos Fecais (RCOF) segundo Coles et al. (1992), pela seguinte fórmula:

$$\text{RCOF} = [1 - (\text{OPG}_f / \text{OPG}_i)] \times 100$$

Onde:

OPG_f = média do número de ovos por grama de fezes no final do tratamento;

OPG_i = média do número de ovos por grama de fezes no início do tratamento.

Também foram realizadas coletas de sangue nos dias 0, 14 e 28 com o intuito de verificar a ação dos tratamentos sobre o comportamento do volume globular (VG). A coleta de sangue foi realizada diretamente através de punção da veia jugular, sendo a amostra depositada em tubos contendo o anticoagulante ácido Etileno Diamino Tetra-Acético a 10% (EDTA), nas primeiras horas da manhã.

Após a coleta, os tubos foram enviados ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande para a determinação do Volume Globular (VG) através da técnica do micro hematócrito (Coles, 1984).

Analise estatística

Os valores da contagem de OPG após a transformação logarítmica em $\log(x+1)$, os percentuais de RCOF e os valores do VG foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via e teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o software BIOESTAT 5.0 (Ayres et al. 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação *in vitro* da evolução da toxicidade do extrato hidroalcoólico da *T. spinosa* em *A. salina*, constatou-se que a concentração de 150µg/mL foi capaz de causar mortalidade de 50% dos náuplios, conforme demonstrado no Quadro 1, evidenciando que o extrato da raiz é moderadamente tóxico, pois sua CL50 está compreendida entre 80µg/ml e 250µg/ml, conforme classificação de Meyer et al. (1982) e Vinatea (1994).

Albarelo et al (2013) estudando extratos metanólicos das folhas de *Tarenaya spinosa* em bioensaio com *A. salina*, não observaram toxicidade nos extratos, nas concentrações testadas: 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, e 3,0mg/ml. Rocha (2012) realizou estudos de toxicidade com *Cleome rosea* Vahl ex DC., também da família Capparaceae, nos quais não foi verificada toxicidade do extrato a XXX de concentração. Estes resultados poderiam ser atribuídos as partes da planta testada, às diferenças entre as espécies e ao fato de terem sido coletadas em locais diferentes (fatores ambientais).

Quanto ao efeito do extrato sobre *Haemonchus contortus*, o percentual de eclodibilidade foi de 18,46%; isto demonstra a capacidade da planta em inibir o desenvolvimento dos ovos. Quando se analisa a sua eficiência, observa-se que o percentual foi de 81,53 % (Quadro 02). Segundo Powers et al. (1982), um anti-helmíntico é considerado satisfatório quando sua eficiência está entre 80 a 90%. Na literatura consultada não há relatos do efeito anti-helmíntico de *T. spinosa*, porém vários trabalhos são observados sobre as ações farmacológicas dessa espécie, comprovando efeitos antinociceptivo, antiinflamatório, antimicrobiano (Santos 2005, Mcneil et al. 2010, Liporacci & Simão 2013). Avaliando o potencial anti-helmíntico Chandak et al. (2010) realizaram teste *in vitro* comprovando o potencial anti-helmíntico do extrato alcoólico das folhas da *Cleome viscosa* Linn. (Capparidaceae) contra o nematódeo *Ascardia galli* na concentração mais elevada de 150mg/mL, planta esta pertencente à mesma família da *T. spinosa*.

Vários estudos apontam fitoterápicos com atividades antihelmínticas sobre *H. contortus*. Ferreira (2013), avaliando os efeitos *in vitro* do extrato aquoso da *Annona muricata* sobre ovos, larvas infectantes e formas adultas de *H. contortus* mostrou 84,91% e 89,08% de eficácia em testes de eclodibilidade de ovos e teste de motilidade larval, respectivamente, resultados semelhantes aos do presente estudo; já Kamaraj et al. (2010) encontraram resultados superiores, avaliando a atividade dos extratos hidroalcoólicos das folhas e sementes de *Melia azedarach* L. (Meliaceae), onde as folhas inibiram 100% da eclosão dos ovos e 100% de desenvolvimento de larvas na concentração de 12,5mg/ml, concentração muito elevada comparada com o teste realizado neste experimento, onde a concentração foi de 150µg/mL, com eficiência sobre ovos e larvas de 81,53%.

Na avaliação do teste *in vivo*, o percentual de redução da contagem de OPG foi constatado em todos os grupos tratados. Os grupos de animais que receberam o extrato da *T. spinosa* nas dosagens de 10mL nas concentrações de 150µg/ml e 300µg/ml, tiveram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05\%$), quando comparadas ao controle negativo, obtendo percentuais de redução de 41 e 40,2% respectivamente (Tabela 03). Os grupos tratados com o fitoterápico foram estatisticamente iguais ao tratamento com Ivermectina 1%, que apresentou percentual de redução de 40,6%. Quando se comparam os dois grupos que receberam o extrato, não se observou diferença

significativa, onde o G4 recebeu uma dosagem duas vezes maior, e o seu resultado não atingiu o esperado na redução do OPG, confirmando que a super dosagem não é caminho correto para controle de nematoides gastrintestinais (Molento 2004). O aumento da biodisponibilidade de fármacos esta correlacionado com a solubilização de substâncias pouco solúveis bem como com a diminuição da dose administrada, garantindo além de vantagens econômicas, a diminuição de efeitos adversos (Kawakami et al. 2002). Apesar dos resultados estarem abaixo dos padrões recomendados pela WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology), ressalta-se que muitos anti-helmínticos químicos não reduzem os níveis de infecção parasitária, devido à resistência desenvolvida por populações de parasitas (Coles et al. 1992).

Na avaliação do VG nos grupos tratados, o modelo estatístico não detectou diferenças significativas ($P > 0,05$) na variável, o qual permaneceu dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie ovina (Quadro 04), segundo os valores descritos por Kramer (2006). Egual et al (2007) avaliando o extrato hidroalcoólico de *Hedera helix* contra o *H. contortus*, demonstraram que o extrato contribuiu para a manutenção do hematócrito dos animais avaliados, ao contrário do grupo controle sem tratamento, comprovando atividade *in vivo* contra o parasito, havendo redução significativa da contagem de ovos nas fezes no 7º dia após tratamento.

Os tratamentos realizados com a Ivermectina 1% e *T. spinosa* mantiveram os percentuais do VG dentro da normalidade. Mesmo parasitados, os cordeiros não apresentaram anemia e ao exame clínico os animais apresentavam mucosas normocoradas, sugerindo que a dose de larvas infectantes provocou uma infecção subclínica e os tratamentos também não influenciaram na queda ou elevação do VG. Beriajaya (2006) afirma que o efeito patogênico de *H. contortus* resulta da incapacidade do hospedeiro de compensar a perda de sangue, se a perda exceder a capacidade hematopoiética, a anemia progressiva leva o animal rapidamente à morte.

CONCLUSÃO

Os testes *in vitro* sobre *Artemia salina* e *Haemonchus contortus* foram fundamentais na determinação da dosagem para administração nos ovinos, a fim de detectar a aplicabilidade desses extratos no controle de parasitos internos de ovinos.

Mais estudos *in vivo*, em diferentes desafios epidemiológicos devem ser realizados para detectar a aplicabilidade do extrato, demonstrando seu potencial fitoterápico para fins de controle da população de nematódeos gastrintestinais a nível economicamente sustentável, visto que produtos químicos com eficácia aproximada de 100% promovem rápida seleção de parasitos resistentes.

Agradecimentos - Às amigas, Ana Raquel e Maria do Carmo pela valiosa ajuda neste trabalho e ao co-orientador Prof. Dr. Wilson Wouflan Silva assim como a orientadora Profª. Drª. Ana Célia Rodrigues Athayde. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Albarello N., Simões-Gurgel C., Castro T.C., Gayer C.R.M., Coelho M.G.P., Moura R.S. & Mansur E. 2013. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of fieldgrowth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *J. Med. Plants Res.* 7(16):1043-1049.
- Albuquerque L.P., Pontual E.V., Santana G.M.S., Silva L.R.S., Aguiar J.S., Coelho L.C.B.B., Rêgo M.J.B.M., Pitta M.G.R., Silva T.G., Melo A.M.M.A., Napoleão T.H., Paiva P.M.G. 2014. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta Trop.* 138: 23-27.
- Araújo M.G.F., Cunha W.R. & Veneziani R.C.S. 2010. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hill. (Solanaceae). *Revta Ciênc. Farm. Básica Apl.* 31:205-209.
- Ayres M.A.J., Ayres M.D.L. & Santos A.A. 2007. BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong. Mamiraua, Belém, PA.
- Beriajaya C.D.B. 2006. *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in pen-trials with Javanese thin tail sheep and Kacang cross Etawah goats. *Vet. Parasitol.* 135(3/4):315-323.

- Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Maciel M.V., Costa, C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Braga R.R., Silva R.A. & Vieira L.S. 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet. Parasitol.* 148:288-294.
- Cartaxo S.L., Souza M.M.A. & Albuquerque U.P. 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 131:326-342.
- Chagas A.S. & Vieira L.S. 2007. Ação da *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 44(1):49-55.
- Chandak R.R., Bhairat N.K., Devdhe S.J. & Majmudar H.F. 2010. In vitro evaluation of anthelmintic potential of leaves of *Cleome viscosa* Linn. *Int. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res.* 5(3), Art.13.
- Coles E.H. 1984. *Patologia Clínica Veterinária*. Manole, São Paulo.
- Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A. & Waller P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44:35-44.
- Egualé T., Tilahun G., Debella A., Feleke A. & Makonnen E. 2007. In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *J. Ethnopharmacol.* 110(3):428-433.
- Ferreira L.E., Castro P.M., Chagas A.C., França S.C. & Belebóni R.O. 2013. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Exp Parasitol.* 134(3):327-32.
- Hamilton M.A., Russo R.C. & Thurston R.V. 1977. Trimmed Sperm-Karber: method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11:714-719.
- IBGE 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acessado em 10 jan. 2014.
- Idris A., Moors E., Sohnrey B. & Gauly M. 2012. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. *Parasitol. Res.* 110:1453-1459.
- Kamaraj C., Rahuman A.A., Bagavan A., Mohamed M.J., Elango G., Rajakumar G., Zahir A.A., Santhoshkumar T. & Marimuthu S. 2010. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Parasitol. Res.* 106:1071-1077.
- Kawakami K., Yoshikawa T., Moroto Y., Kanaoka E., Takahashi K., Nishihara Y. & Masuda K. 2002. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I. Prescription design. *Journal of Controlled Release* 81(1/2):65-74.
- Kramer J.W. 2000. Normal hematology of cattle, sheep and goats, p.1075-1084. In: Feldman B.F., Zink J.G. & Jain N.C. (Eds), *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Williams and Wilkins, Philadelphia. 1176p.
- Liporacci H.S.N. & Simão D.G. 2013. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. *Revta Bras. Plant. Med.* 15(4):529-540.
- Machado-Filho H.O. & Melo J.I.M. 2013. Aquatic angiosperms in the Environmental Protection Area (EPA) of Cariri, Paraíba state, Brazil. *Rodriguesia* 64(4):667-683.
- Mcneil M.J., Porter R.B., Williams L. A. & Rainford L. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. *Nat. Prod. Commun.* 5 (8):1301-1306.
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., & McLaughlin J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plants. Res.* 45(5):31-34.
- Molento M.B. 2004. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13:82-87.
- Moreira H.J.C. & Bragança H.B.N. 2011. *Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti*. FMC Agricultural Products, São Paulo. 1017p.
- Pereira E.C., Lucetti D.L., Barbosa-Filho J.M., Brito E.M., Monteiro V.S., Patrocínio M.C.A., Moura R.R., Leal L.K.A.M., Macedo D.S., Sousa F.C.F., Viana G.S.B. & Vasconcelos S.M.M. 2009. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.* 454(2):139-142.
- Powers K.G., Wood I.B., Eckert J., Gibson T. & Smith H.J. 1982. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Vet. Parasitol.* 10(4):265-284.
- Reis J.M.; Costa, W.F.; Minguzzi, S.; Silva, R.C.L. 2013. Avaliação da composição química e da toxicidade do óleo essencial de folhas e frutos da *Jatropha gossypifolia* L. *Semina: Tech. Ex.* 34(2): 185-192.

- Roberts F.H.S. & O'Sullivan J.P. 1950. Methods for egg counts and larval cultures for *strongyles* infesting the gastrointestinal tract of cattle. Aust. J. Agric. Res. 1(1):99-102.
- Rocha A.S. 2012. Produção de carotenóides em culturas *in vitro* de *Cleome rosea* Vahl ex DC (Capparaceae) e avaliação de sua toxicidade e potencial antioxidante. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Rio de Janeiro, RJ. 94p.
- Santos A.C.B., Silva M.A.P., Santos M.A.F. & Leite T.R. 2013. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. Revta Bras. Plant. Med. 15(3):442-458.
- Santos D.A. & Menezes J.E.S.A. 2005. Estudo das atividades citotóxica e antimicrobiana de *Cleoma spinosa* espécie nativa do município de Itapipoca. Anais 57^a Reunião Anual da SBPC, Fortaleza, CE. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra>> Acesso em 3 jul. 2014. (Resumo)
- Silva J.C.C., Teodoro J.A.R., Afonso R.J.C.F., Aquino S.F., Augusti R. 2014. Photolysis and photocatalysis of ibuprofen in aqueous medium: characterization of by-products via liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry and assessment of their toxicities against *Artemia Salina*. J. Mass Spectrom. 49(2): 145–153.
- Sutherland I.A., Damsteegt A., Miller C.M. & Leathwick D.M. 2008. Multiple species of nematodes resistant to ivermectin and a benzimidazole-levamisole combination on a sheep farm in New Zealand. N. Z. Vet. J. 56(2):67–70
- Vinatea J.E. 1994. *Artemia* um ser vivo excepcional. Panorama da Aqüicultura 4(25):8-9.
- Zaros L.G., Neves M.R.M., Benvenuti C.L., Navarro A.M.C., Sider L.H., Coutinho L.L. & Vieira L.S. 2014. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. Parasitol. Res. 113(3):1155-1161.

Quadro 1. Número de mortes de *Artemia salina* frente às frações testadas e suas respectivas concentrações com o resultado da CL50% no intervalo de confiança de 95%

Concentração do Extrato ($\mu\text{g/mL}$)	Número de Óbitos de <i>A. salina</i>				CL50 ($\mu\text{g/mL}$)
	EERTS	GC1	GC2	GC3	
100	15	1	3	19	150
500	14	4	3	19	
1000	15	7	3	19	

EERTS – (Extrato hidroalcolico da raiz da *T. spinosa*); GC1 (Grupo Controle 1: DMSO a 1%); GC2 (Solução salina isotônica); GC3 (Grupo controle 3: NaClO a 1%); CL50 = Concentração letal 50% dos náuplios de *Artemia salina*.

Quadro 2. Percentuais de eclodibilidade e eficiência do extrato etanólico da raiz de *Tarenaya spinosa* sobre *Haemonchus contortus* de ovinos

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Média de L3 recuperadas	Eclodibilidade (%)	Eficiência (%)
Extrato	150	1200 \pm 320	18,46	81,53 ^a
Controle	Água destilada	5824 \pm 450	89,6	10,4 ^b

Valores seguidos por letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 3. Média aritmética, re-transformada [(log. (x+1))], desvio padrão e percentual de redução do OPG de ovinos artificialmente infectados com *Haemonchus contortus*, submetidos a diversos tratamentos

Trat.	OPG Dia zero	OPG Dia 07	OPG Dia 14	OPG Dia 21	OPG Dia 28	RCOF (%)
G1	1500 ^a \pm 320	1433 ^a \pm 350	1180 ^a \pm 420	1280 ^a \pm 250	890 ^b \pm 410	40,6 ¹
G2	1460 ^a \pm 250	1550 ^a \pm 300	1900 ^a \pm 300	1620 ^a \pm 300	1350 ^a \pm 200	7,5 ²
G3	1560 ^a \pm 180	1340 ^a \pm 400	1140 ^a \pm 200	1030 ^a \pm 300	920 ^b \pm 250	41 ¹
G4	1640 ^a \pm 300	1150 ^a \pm 250	1100 ^a \pm 350	1000 ^a \pm 300	980 ^b \pm 300	40,2 ¹

Valores seguidos por letras diferentes nas linhas diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey para amostras independentes e valores seguidos de número diferentes nas colunas diferem estatisticamente ($p>0,05$). G1: Controle positivo, Ivermectina 1%; G2: Controle negativo, água. G3: Mussambê 150 $\mu\text{g/ml}$; G4: Mussambê 300 $\mu\text{g/ml}$.

Quadro 4. Valores percentuais médios do hematócrito de ovinos artificialmente infectados com *Haemonchus contortus* nos diversos tratamentos

Tratamentos				
Dia	G1	G2	G3	G4
0	33,2 \pm 2,39 ^a	34,6 \pm 1,94 ^a	34,8 \pm 2,17 ^a	35 \pm 2,74 ^a
14	34,8 \pm 2,59 ^a	35,4 \pm 2,30 ^a	34,4 \pm 3,51 ^a	33,4 \pm 3,85 ^a
28	34,2 \pm 1,92 ^a	34,2 \pm 1,30 ^a	34,8 \pm 2,20 ^a	34,6 \pm 2,11 ^a
Médias	34,07	34,73	34,66	34,33

Valores seguidos por letras diferentes em linhas diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey para amostras independentes G1: Controle positivo, Ivermectina 1%; G2: Controle negativo, água. G3: Mussambê 150 $\mu\text{g/ml}$; G4: Mussambê 300 $\mu\text{g/ml}$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho pode servir como referência para outros trabalhos que visem obter alternativas anti-helmínticas sustentáveis, bem como para validação do efeito da *T. spinosa* planta aqui estudada, através de novas metodologias, além do estudo mais aprofundado dos compostos fitoquímicos presentes neste extrato e testes a campo simulando o manejo extensivo, visto que a *T. spinosa* mostra ser mais um fitoterápico que servira de alternativa para controle do nematódeos gastrintestinais.

ANEXOS



ISSN 1516-0572 versão
impressa ISSN 1983-084X
versão on-line

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Apresentação de manuscritos](#)

Escopo e política

A Revista Brasileira de Plantas Mediciniais [BJMP] é uma publicação trimestral dedicada à divulgação de artigos originais, resenhas e notas preliminares, que devem ser inéditos, abrangendo as grandes áreas de plantas medicinais. Manuscritos que envolvam ensaios clínicos devem ser acompanhados de uma autorização do Comitê de Ética da Instituição onde o trabalho foi realizado. Os artigos podem ser escritos em Português, Inglês ou Espanhol; no entanto, um resumo em Inglês e Português é obrigatória, independentemente da linguagem usada. Os trabalhos devem ser enviados por e-mail para rbpm.sbpm@gmail.com, digitados em fonte Arial 12, espaço duplo, margens 2cm, Word for Windows. Os números de telefone para qualquer contato urgente também devem ser incluídos na apresentação de e-mail. Os artigos não devem exceder 20 páginas.

Para a publicação de artigos submetidos ao RBPM depois de 1 de Abril de 2013, há um custo de US \$ 300 (trezentos reais) a ser pago pelos autores somente ao receber a carta de aceitação, quando receberá também a fatura e instruções de pagamento.

Forma e preparação de manuscritos

CRÍTICAS E NOTAS PRELIMINARES

Comentários e Notas preliminares devem ser basicamente estruturado em Título, Autores, Resumo, Palavras-chave, resumo, palavras-chave, texto, Agradecimento (se houver) e Referências.

Deve ser dada especial atenção aos artigos de revisão; Iphis Litteris-citação de outros textos publicados devem ser evitados, uma vez que significa plágio por lei.

ARTIGOS

Os artigos devem ser estruturados da seguinte forma: **TÍTULO:** O título deve ser claro e conciso, em negrito, com apenas a primeira letra em maiúscula e centralizado na parte superior da página. Um subtítulo, se houver, deve seguir o título, em letras minúsculas, e pode ser precedido por um numeral romano. Os nomes comuns das plantas medicinais devem ser seguidos pelo nome científico entre parênteses, disponíveis em www.tropicos.org e www.ipni.org

AUTORES: Cite primeiro o último nome dos autores na íntegra (use apenas as iniciais do primeiro e nomes intermediários, sem espaços e separados por vírgulas), em

letras maiúsculas e negrito, a partir de duas linhas abaixo do título. Após o nome de cada autor, um número sobrescrito deve indicar a respectiva Instituição e endereço (rua, CEP, cidade, país). O autor correspondente deve ser identificado com um endereço de e-mail. Os nomes dos autores devem ser separados por ponto-evírgula.

RESUMO: "Resumo" deve estar na página de título, a partir de duas linhas abaixo os nomes dos autores. Ele deve ser escrito em um único parágrafo, contendo objetivo, material resumido e métodos, resultados principais e conclusão. Não há citações bibliográficas devem ser incluídos. **Palavras-chave:** "Palavras-chave" deve iniciar uma linha abaixo de "Resumo" na margem esquerda, em negrito, e deve incluir até cinco palavras separadas por vírgulas.

RESUMO: Deve conter o título eo resumo em Inglês, com o mesmo formato do que em Português (parágrafo único), com exceção do título, que deve ser digitado em negrito com a primeira letra em maiúscula e após a palavra RESUMO.

Palavras-chave: As palavras-chave em Inglês deve ser digitado abaixo do **RESUMO** e deve incluir até cinco palavras separadas por vírgulas

INTRODUÇÃO: A introdução deve conter uma breve revisão de literatura e os objetivos do trabalho. Os autores devem ser citados no texto de acordo com os seguintes exemplos: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986), ou quando há mais de dois autores, Santos et al. (1996).

MATERIAL E MÉTODO: As técnicas originais utilizados devem ser totalmente descrito ou referências de trabalhos anteriores que esses métodos devem ser incluídos. As análises estatísticas deverão ser igualmente referenciadas. Nos métodos, os seguintes dados relativos às espécies estudadas devem ser apresentados: nome científico e autor, nome do Herbário, onde a espécie de voucher é armazenado e seu respectivo número número do voucher).

RESULTADO E DISCUSSÃO: Estes podem ser apresentados separadamente ou como uma única seção, incluindo uma conclusão resumida no final.

AVISO: Se for necessário, as confirmações devem ser escritos nesta seção.

REFERÊNCIA: As referências devem seguir os exemplos abaixo:

Revistas:

AUTOR (ES), separados por ponto e vírgula, sem espaços entre as iniciais. Título do trabalho. **título Jornal na íntegra**, volume, número, página inicial-página final, ano.

Kawagishi, H. et al. Actividade anti-tumoral e fraccionamento do resíduo insolúvel em água de corpos de frutificação blazei.

Carbohydrate Research, V.186, n.2, p.267-73, 1989.

Livros:

. AUTOR **Título do livro**. Edition. Publicação lugar: Editora, ano. Número total de páginas. Murria, RDH; Méndez, J .; BROWN, SA **As cumarinas naturais** : ocorrência, química e bioquímica. 3.ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982, 702P.

Capítulos de Livros:

Autor (es) do capítulo. Título do capítulo. In: AUTOR (S) do livro.

Título do livro:

subtítulo. Edition. Lugar de publicação: Editora, ano, página inicial-página último. Huffaker, metabolismo de proteínas RC. STEWARD, FC (Ed.): In. **fisiologia da planta: um tratado**. Orlando: Academic Press, 1983 p.267-33.

Tese ou Dissertação:

. AUTOR **Título:** subtítulo. Ano. Número total de páginas. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, Universidade, Place. OLIVEIRA, AFM **Caracterização de Acanthaceae Medicinais conhecidas Como Anador nenhuma Nordeste do Brasil**. 1.995. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Botânica) - Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Trabalho de Evento:

autor (es). Título do trabalho. In: Título do evento em letras maiúsculas, número, ano, local. **tipo de publicação** ... Local: Editora, ano. primeira página-última página. VIEIRA, RF; MARTINS, MVM Estudos etnobotânicos de Espécies Medicinais de OSU populares no Cerrado. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CERRADO, 3, 1996, Brasília. **Proceedings** Brasília: Embrapa, 1996 p.169-71.

Publicação Eletrônica:

autor (es). Título do trabalho. **título Journal**, volume, número, página inicial-página final, ano. Local: Editora, ano. Páginas. Disponível em: <<http://www.....>>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano. PEREIRA, RS et al. . ATIVIDADE antibacteriana de Óleos Essenciais los cepas isoladas de infecção urinaria **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004 Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 18 de abril de 2005 Não citar resumos ou relatórios de pesquisa, a menos que a informação é extremamente importante e não foi publicado como um formato diferente. As comunicações pessoais devem ser escritas como notas de rodapé na página são citadas, mas deve ser evitado, se possível. Citações como "Almeida (1994) citado por Souza (1997)" também devem ser evitados.

Tabelas: As tabelas devem ser inseridas no texto e digitado em fonte Arial 10, espaço simples. A palavra tabela deve ser escrita em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico; no texto, tabelas devem ser digitados em letras minúsculas (Tabela). O título da tabela deve ser digitado em fonte Arial 12, enquanto os dados dentro da tabela deve estar em Arial 10.

FIGURAS: As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos, mapas) devem ser digitados em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, Arial 12, inserido no texto. Quando citados no texto, letras minúsculas deve ser utilizado (Figura). Legendas e eixos devem ser digitados em fonte Arial 10. As fotografias devem ser enviadas em arquivos separados de 300 DPI de resolução, 800 x 600, extensão JPEG, para a impressão da publicação.

Processo de Revisão: Os manuscritos são analisados por pelo menos dois avaliadores, de acordo com um guia para a avaliação baseia-se principalmente sobre a abordagem científica. Os revisores recomendar a aceitação, com ou sem a necessidade de reavaliação, rejeição ou alterações; no último caso, o artigo reescrito retornará ao revisor para uma avaliação final. Quando

pelo menos dois revisores aprovar o manuscrito, sem a necessidade de uma reavaliação, ele estará pronto para a publicação e o autor receberá a carta de aceitação e as instruções para o pagamento de custos (R \$ 300 / manuscrito) *. Nomes revisores "estão escondidos, e os nomes dos autores também são ocultados colaboradores.

* Artigos apresentados após 01 de abril de 2013 deve pagar os custos de publicação só aprovado.

Direitos de autor: Ao submeter um artigo para a revista, os autores devem estar cientes de que, se for aceito para publicação, seu autor, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, será exclusivamente cedida à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus artigos.

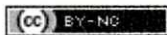
ATENÇÃO: Os artigos que não cumpram essas normas serão devolvidas aos autores.

Nota: As opiniões e conceitos apresentados nas exposições constituem exclusivo do autor responsabilidade. No entanto, o Conselho Editorial tem o direito de sugerir ou exigir que as modificações que considerem necessárias.

Apresentação de manuscritos

Os trabalhos devem ser enviados por e-mail para rbpm.sbpm@gmail.com.

[[Início](#)] [[Sobre a revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

CPQBA-UNICAMP
Divisão de Agrotecnologia - CPQBA
13,148-218-Paulínia-SP - Brasil
Tel .: (55 19) 2139-2891
Fax: (55 19) 2139-2852



rbpm.sbpm@gmail.com

Modelo

Deve ser seguido, em todos os pormenores, para a submissão de trabalhos à revista
Pesquisa Veterinária Brasileira

Trabalho

Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina¹

Pedro M.O. Pedrosa², Caroline A. Pescador², Paulo M. Bandarra², Djeison L. Raymundo², Mauro R. Borba², Fladimir Wouters³, Pedro S. Bezerra Júnior³ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Pedrosa P.M.O., Pescador C.A., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Borba M.R., Wouters F., Bezerra Jr P.S. & Driemeier D. 2009. [Standardization of immunohistochemistry technique for detection of rabies virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples from central nervous system of cattle.] Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

For standardization of the rabies immunohistochemistry technique, five samples of central nervous system (CNS) of cattle naturally infected with rabies virus were examined. One polyclonal antibody and two monoclonal antibodies were used. The following reagents were evaluated for antigen retrieval: XIV protease, proteinase K and citrate buffer (pH 6.0) boiling at 100°C during 15 minutes in *bain-marie*. Detection of rabic antigen was possible with the three antibodies tested. The polyclonal antibody was superior to the monoclonal antibodies, demonstrating good results with the three antigen retrieval protocols. The highest intensity staining was obtained with the citrate buffer and heat. The immunohistochemistry technique demonstrated the presence of viral antigens in the cytoplasm of neurons, in form of aggregates or with round or oval shape. The antigens were found as single or multiples inclusion bodies in the neurons. Immunohistochemistry is a fast method that can be used in routine procedures in cases where rabies is suspected, especially when the brain is submitted to the laboratory as formalin-fixed fragments or when samples could not be immediately shipped. The technique is also useful for retrospective studies.

INDEX TERMS: Diseases of cattle, infectious diseases, diseases of the central nervous system, rabies, immunohistochemistry standardization.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil.

(Observe que os endereços dos autores devem ser completos, para que eles possam receber o "Exemplar do Autor" de seu trabalho publicado)

RESUMO.- Para a padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foram utilizadas cinco amostras de SNC de bovinos infectados naturalmente com o vírus da raiva usando-se um anticorpo policlonal e dois monoclonais. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: protease XIV, proteinase K e tampão citrato pH 6,0 mantido a 100°C por 15 minutos. A detecção de antígeno rábico nas amostras foi possível com os três anticorpos utilizados. O anticorpo policlonal foi superior aos anticorpos monoclonais, demonstrando bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, obtendo uma maior intensidade de marcação quando utilizado o tampão citrato e calor. A técnica de imuno-histoquímica demonstrou a presença do antígeno viral no citoplasma de neurônios na forma de agregados de grânulos ou de forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios. A imuno-histoquímica é um método rápido, podendo ser usada na rotina em casos onde inicialmente há suspeita de raiva, especialmente em casos onde fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, onde as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente e para a realização de estudos retrospectivos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de bovinos, doenças infecciosas, doenças do sistema nervoso, raiva, padronização de imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

A raiva é causada por um vírus RNA, envelopado (Swanepoel 2004), da ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (Consales & Bolzan 2007) e é altamente neurotrópico (George 1993, Woldehiwet 2002). Embora todos os mamíferos sejam susceptíveis, canídeos e morcegos são considerados como os vetores mais eficientes da enfermidade (Woldehiwet 2002).

No Brasil, *Desmodus rotundus* é a principal espécie de morcego hematófago que transmite a raiva para bovinos, porém outras espécies (*Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*) podem ocasionalmente transmitir, a doença (Fernandes & Riet-Correa 2007). A raiva bovina ocorre em todo o Brasil e tem importância na maioria dos Estados, tanto pelo caráter de zoonose como por causar perdas econômicas na pecuária. Anualmente as perdas de bovinos por raiva são estimadas em aproximadamente 850.000 cabeças, que equivalem aproximadamente a 17 milhões de dólares (Lima et al. 2005). Em bovinos no Brasil, predomina a forma paralítica, caracterizada por paresia e paralisia ascendentes (Langohr et al. 2003). As lesões histológicas de raiva são geralmente limitadas ao sistema nervoso central (Jubb & Huxtable 1993, Jones et al. 2000), glânglios e nervos cranianos e espinhais (Swanepoel 2004) e caracterizam-se por meningoencefalomielite não-purulentas (Fernandes & Riet-Correa 2007) com ganglioneurite mononuclear (Swanepoel 2004).

O suporte laboratorial é imprescindível para o diagnóstico da doença e a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) em tecidos refrigerados ou congelados o teste padrão utilizado devido a sua rapidez e acurácia (Zimmer et al. 1990). Outro teste utilizado é a inoculação intracerebral em camundongos que apesar de ser mais específica, tem a desvantagem de ser demorada quando comparada a IFD (Germano et al. 1977).

A comparação entre métodos histoquímicos, de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em camundongos tem revelado maior concordância entre imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos, embora ocorram esporadicamente resultados falsos negativos ora em uma, ora em outra técnica (Côttes et al. 1979).

O objetivo da padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foi estabelecer um protocolo padrão de diagnóstico para fragmentos de sistema nervoso central que chegam previamente fixados em formol 10% ao Setor de Patologia Veterinária

da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Contribuindo assim para o diagnóstico de doenças do SNC de bovinos, como parte do programa DXSNC de vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) coordenada pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras encefalopatias (PNCRH) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sistema nervoso central (SNC) de 2 bovinos registrados no arquivo do programa DXSNC do MAPA do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) e três amostras enviadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA) de necropsias de casos de bovinos infectados naturalmente com raiva, os quais obtiveram resultados positivos nos testes de imunofluorescência direta (IFD) e na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC).

Uma amostra do tronco cerebral de cada bovino necropsiado foi fixada em formol 10%, processada rotineiramente para exame histopatológico, incluída em parafina, cortada a 5µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina (HE) (Prophet et al. 1992). Dados sobre os históricos, quadro clínico dos animais afetados foram obtidos com o veterinário requisitante ou pela própria equipe do SPV.

Para a padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foram feitos cortes histológicos de 5µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath), secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60°C por 3-4 horas. Após os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 15 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em água destilada três vezes por dois minutos. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: protease XIV (Sigma Chemical Company, Poole, UK), proteinase K (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e tampão Citrato (2,1g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%). As lâminas tratadas com protease XIV a 0,005% em PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,4) foram incubadas em câmara úmida por 15 minutos em temperatura ambiente. Os cortes tratados com proteinase K foram preparados com 40µl (uma gota) da solução diluída em 2ml 0,05M Tris-HCL pH 7,5 por 1 minuto em câmara úmida e temperatura ambiente. As lâminas tratadas com tampão citrato 10mM (pH 6,0), foram colocadas em jarras de coloração de polipropileno durante 15 minutos em banho-maria em panela de uso comercial de aço inox com dimensões de 24x20x20cm (altura x largura x comprimento) com capacidade para dois litros previamente aquecido atingindo uma temperatura de 100°C. Logo após as lâminas foram esfriadas por 5 minutos em temperatura ambiente.

Para a diminuição das ligações inespecíficas ("background"), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico®) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos. Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário. Foram utilizadas as diluições de 1:500 e 1:1000 em PBS para cada um dos anticorpos testados. Foram avaliados dois anticorpos monoclonais anti-raiva (GeneTex GTX21002 e Biodesign C86307M) e um anticorpo policlonal (anti-rabies polyclonal Chemicon #5199) recomendado para imunofluorescência direta adaptado de Rech (2007). Os cortes testados com os anticorpos monoclonais foram incubados em câmara úmida por 12-14 horas ("overnight") a 4°C e os testados com o anticorpo policlonal foram incubados em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada e tratados com anticorpo secundário biotinalado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 20 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Logo após foram lavados em água destilada e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA) por mais 20 minutos cada em câmara úmida e temperatura ambiente, sendo lavados novamente em água destilada e submetidos à revelação com o cromógeno vermelho (VECTOR®NovaRED) por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, posteriormente lavadas em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduações de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). Em seguida as lâminas foram avaliadas em microscópio

óptico e classificadas de acordo com a intensidade de marcação em 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (acentuado). Foi inserido em cada imuno-histoquímica um controle de SNC de bovino previamente negativo nas provas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos.

RESULTADOS

Os bovinos deste estudo apresentaram um quadro clínico caracterizado por incoordenação, paresia e paralisia dos membros posteriores, decúbito e morte. Todas as cinco amostras analisadas caracterizaram-se na histologia por meningoencefalomielite não-supurativa, com presença de manguitos perivascularares, microgliose e presença de corpúsculos de inclusão viral intracitoplasmáticos em neurônios. O teste de imunofluorescência direta para raiva e inoculação intracerebral em camundongos foi positivo em todos os casos analisados e serviu de padrão para avaliação do método imuno-histoquímico.

A detecção de antígeno rábico nas amostras analisadas foi possível com os três anticorpos utilizados. Em geral, os resultados usando o anticorpo policlonal foram superiores aos anticorpos monoclonais. O anticorpo policlonal (Chemicon #5199) demonstrou bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, porém teve maior intensidade de marcação quando utilizado calor com solução de tampão citrato, obtendo-se grau de marcação acentuado nos casos testados (Fig.1). Podem-se identificar marcação no pericário, axônios (Fig.2) e algumas vezes em dendritos dos neurônios. Recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K obtiveram intensidade de marcação semelhantes, prevalecendo uma marcação moderada em ambos tratamentos enzimáticos. No Quadro 1 estão representados os graus de intensidade de marcação imuno-histoquímica com o anticorpo policlonal nos cinco casos analisados no presente estudo.

A digestão com protease XIV e proteinase K apresentou baixa intensidade de marcação com os anticorpos monoclonais. O anticorpo GeneTex apresentou marcação leve nas recuperações antigênicas com protease XIV e proteinase K e o anticorpo Biodesign obteve melhor marcação quando utilizado proteinase K, ambos na diluição de 1:500. A intensidade de marcação com o anticorpo GeneTex (GTX 21002) e Biodesign (C86307M) estão representados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Na recuperação antigênica com calor e tampão citrato os dois anticorpos monoclonais apresentaram ausência de marcação. Todos os casos que foram positivos na técnica de imuno-histoquímica demonstraram a presença do antígeno viral no citoplasma de neurônios na forma de agregados de grânulos (Fig.3) também na forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios (Fig.4).

Na determinação da diluição do anticorpo policlonal anti-raiva, foram obtidos resultados positivos nas diluições de 1:500 e 1:1000. Perda na qualidade da identificação do antígeno de raiva foi visualizado quando os anticorpos foram diluídos a 1:1500. O bloqueio das reações inespecíficas mostrou-se bastante eficaz quando os cortes foram incubados com leite em pó desnatado (Molico®) 5% diluídos em água destilada durante 15 minutos.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de raiva nas cinco amostras analisadas foi baseado no quadro clínico e nas lesões histopatológicas, sendo confirmados pelo teste de imunofluorescência direta para raiva e inoculação intracerebral em camundongo. A imuno-histoquímica se mostrou satisfatória para o diagnóstico de raiva a partir de fragmentos de sistema nervoso central destes casos. As cinco amostras de SNC utilizadas na padronização da técnica de imuno-histoquímica foram fixadas em formol 10% por um período que variou de 24 horas a uma semana. Trabalhos prévios sugerem que a fixação prolongada prejudica a detecção de antígenos virais (Ramos-Vara 2005).

Foi possível observar que o anticorpo policlonal empregado apresentou marcação mais intensa que os anticorpos monoclonais. Este resultado difere do que já foi relatado por outros autores (Hamir & Moser 1994, Hamir et al. 1995). Os anticorpos policlonais em geral apresentam alta afinidade e ampla reatividade (Ramos-Vara 2005). A utilização de anticorpos policlonais possibilita que uma maior quantidade de epítomos seja marcada, uma vez que há uma grande variação na fonte de animais utilizados na produção de antígenos (Van Maanen et al. 2004). Estes são geralmente empregados nos testes de rotina de imunofluorescência direta pra raiva (Terra 2007).

A recuperação antigênica utilizando-se solução tampão citrato previamente aquecida em banho-maria a 100°C possibilitou intensa marcação com o anticorpo policlonal. Diversos métodos de recuperação antigênica usando calor têm sido utilizados em IHQ como autoclave (Bankfalvi et al. 1994), panela de pressão (Norton et al. 1994, Miller & Estran 1995), forno de microondas (Gown et al. 1993, Cattoretti & Suurmeijer 1995, Imam et al. 1995) e banho-maria (Kawai et al. 1994), com o objetivo de quebrar as ligações cruzadas e expor os epítomos para o reconhecimento do anticorpo primário (Puchtler & Meloan 1985, Anthony et al. 1989, Shi et al. 1997). No presente estudo só foi usado banho-maria com a utilização de panela doméstica com água aquecida a 100°C, apresentando excelente resultado. Machado et al. (2004) obteve bons resultados com a técnica de imuno-histoquímica para raiva utilizando tampão citrato com calor, porém usando forno de microondas seguido de digestão enzimática com tripsina 0,1%.

As lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath) atraem eletrostaticamente as secções de tecido incluídas em parafina, aderindo-os melhor a lâmina e assim demonstraram ser melhores que lâminas preparadas com gelatina. Os cortes nestas últimas com frequência se descolavam quando aquecidos para recuperação antigênica em microondas e banho-maria.

A imuno-histoquímica é um método rápido, podendo ser usado na rotina em casos onde inicialmente há suspeita de raiva (Machado et al. 2004), especialmente em casos onde fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, impossibilitando a realização da imunofluorescência direta ou a inoculação intracerebral em camundongos. Por vezes a detecção de antígenos do vírus da raiva por imuno-histoquímica tem sido relatada mesmo em tecido nervoso em processo de autólise (Arslan et al. 2004). Estudos feitos com materiais deteriorados comprovaram que o primeiro exame que resulta em falso negativo é a detecção dos corpúsculos de Negri, seguido pela inoculação em camundongos e, por último, a imunofluorescência direta (Fernandes & Riet-Correa 2007). A imuno-histoquímica permite o uso de tecidos fixados em formol, o que possibilita o envio das amostras ao laboratório quando condições de refrigeração e transporte são inadequadas (Hamir & Moser 1994). A imuno-histoquímica pode ser também usada, particularmente em estudos retrospectivos, quando tecidos frescos ou congelados não podem ser avaliados ou quando as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente. (Arslan et al. 2004).

Os resultados do presente trabalho demonstram que a técnica de imuno-histoquímica para raiva utilizando-se anticorpo primário policlonal Chemicon #5199 apresentou excelentes resultados quando tratados com calor e solução de tampão citrato na recuperação antigênica. A utilização deste anticorpo policlonal associado à recuperação antigênica com tampão citrato em banho-maria demonstrou também vantagem econômica visto que os materiais empregados foram de menor custo quando comparados com outros protocolos. Proporcionou também economia de tempo, pois com os dois anticorpos monoclonais e recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K necessitou-se deixar "overnight", aumentando o tempo para finalizar o diagnóstico. A imuno-histoquímica é uma ferramenta importante de diagnóstico de rotina laboratorial, especialmente quando o SNC é submetido fixado em formol 10%, impossibilitando a realização de provas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em

camundongos, além de, solucionar casos de meningoencefalite não-específica sem a presença de corpúsculos de inclusão.

Agradecimentos.- À Professora Mary Suzan Varaschin, Universidade Federal de Lavras, pelas amostras de SNC de bovinos com raiva. Às técnicas de Laboratório, Ângela Belmonte de Souza e Marília de Oliveira Belmonte, pela confecção do material de estudo. Aos colegas do Setor de Patologia Veterinária, UFRGS, pela valiosa ajuda deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Anthony S., Leong Y. & Gilham P.N. 1989. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathol.* 21:266-268.
- Arslan A., Saglam Y.S. & Temur A. 2004. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. *Vet. Rec.* 155:550-552.
- Bankfalvi A., Navabi H., Bier B., Böcker W., Jasani B. & Schmid K.W. 1994. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J. Pathol.* 174:223-228.
- Cattoretti G. & Suurmeijer A.J.H. 1995. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: A review. *Adv. Anat. Pathol.* 2:2-9.
- Consales C.A. & Bolzan V.L. 2007. Rabies review: Immunopathology, clinical aspects and treatment. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 13:5-38.
- Côrtes V.A., Paim G.V. & Oliveira M.C.G. 1979. Diagnóstico da raiva canina. *Revta Saúde Pública* 13:353-356.
- Fernandes C.G. & Riet-Correa F. 2007. Raiva, p.184-198. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Eqüídeos*. Vol.1. Pallotti, Santa Maria. 719p.
- George L.W. 1993. Moléstias do sistema nervoso, p.901-1039. In: Smith B.P. (Ed.), *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. Vol.2. Manole, São Paulo. 1738p.
- Germano P.M.L., Miguel O. & Chamelet E.L.B. 1977. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. *Revta Fac. Med. Vet. Univ. São Paulo* 14:133-141.
- Gown A.M., Wever N. & Battifora H. 1993. Microwave-based antigenic unmasking. *Appl. Immunohistochem.* 1:256-266.
- Hamir A.N. & Moser G. 1994. Immunoperoxidase test for rabies: Utility as a diagnostic test. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:148-152.
- Hamir A.N., Moser G., Fu Z.F., Dietzschold B. & Rupprecht C.E. 1995. Immunohistochemical test for rabies: Identification of a diagnostically superior monoclonal antibody. *Vet. Rec.* 136:295-296.
- Imam S.A., Young L., Chaiwun B. & Taylor C.R. 1995. Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. *Anticancer Res.* 15:1153-1158.
- Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. 2000. *Patologia Veterinária*. 6ª ed. Manole, São Paulo. 1415p.
- Jubb K.V.F. & Huxtable C.R. 1993. The nervous system, p.267-437. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. Vol.1. 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Kawai A., Serizawa A. & Tsutsumi Y. 1994. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol. Int.* 44:759-764.
- Langohr I.M., Irigoyen L.F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2003. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural* 33:25-131.
- Lima E.F., Riet-Correa F., Castro R.S., Gomes A.A.B. & Lima F.S. 2005. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25:250-264.

- Machado G.F., Silva L.H.Q. & Nunes C.M. 2004. Detecção de antígenos do vírus da raiva em encéfalos de cão mantido em formol durante longo período. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 99:89-92.
- Miller R.T. & Estran C. 1995. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker: Suggestions for optimal use. *Appl. Immunohistochem.* 3:190-193.
- Norton A.J., Jordan S. & Yeomans P. 1994. Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J. Pathol.* 173:371-379.
- Puchtler H. & Meloan S.N. 1985. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochem.* 82:201-204.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology.* American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p.
- Ramos-Vara J.A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42:405-426.
- Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 228p.
- Shi S., Cote R.J. & Taylor C.R. 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J. Histochem. Cytochem.* 45:327-343.
- Swanepoel R. 2004. Rabies, p.1123-1182. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock.* Vol. 2. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town. 795p.
- Terra S.A. 2007. Características das encefalites em autópsias - aspectos epidemiológicos e morfológicos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba. 106p.
- Van Maanen C., Wouda W., Schares G., Von Blumröder D., Conraths F.J., Norton R., Williams D.J.L., Esteban-Redondo I., Innes E.A., Mattsson J.G., Björkman C., Fernández-García A., Ortega-Mora L.M., Müller N., Sager H. & Hemphill A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.* 126:351-364.
- Woldehiwet Z. 2002. Rabies: Recent developments. *Res. Vet. Sci.* 73:17-25.
- Zimmer K., Wiegand D., Manz D., Frost J.W., Reinacher M. & Frese K. 1990. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *Zentralbl. Veterinärmed B* 37:392-400.

Exemplos adicionais para apresentação de Referências

Livro de um ou mais autores, os quais são também os Editores

- Summers B.A., Cummings J.F. & De Lahunta A. 1995. *Veterinary Neuropathology.* Mosby, St Louis, p.95-188.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. 2000. Plantas hepatotóxicas, p.80-110. In: *Ibid.* (Eds), *Plantas Tóxicas do Brasil.* Editora Helianthus, Rio de Janeiro.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis.* 4th ed. Prentice Hall, New Jersey. 663p.

[Observe que os títulos de capítulos são escritos em letras minúsculas e os títulos de livros, com as primeiras letras maiúsculas. Sempre mencionar as páginas consultadas; mas, quando se refere a múltiplos grupos de páginas num livro, somente colocar o número total de páginas]

Quando os autores de capítulos do livro não são os Editores

- George L.W. 2002. Listeriosis, p.946-949. In: Smith B.P. (Ed.), *Large Animal Internal Medicine.* 3rd ed. Mosby, St Louis.

López A. 2007. Respiratory system, p.463-542. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.

Maxie M.G. & Robinson W.S.F. 2007. Cardiovascular system, p.1-105. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.3. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Dissertação de Mestrado (ou Tese, em caso de Doutorado)

Oliveira T.M.F.S. 2004. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, em soros de cães do Município de Jaboticabal, área não-endêmica para a doença. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 45p.

Resumo em Congresso

Bianchi S.P., Correa R.K.R., Villa-Lobos W.O.R., Ferreira R.R. & Machado M.L.S. 2008. Atendimentos realizados no ano de 2007 no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. Anais 35º Conbravet, Gramado, RS, p.50. (Resumo)

Citação indireta

Dost G. 1980. Salinomycinein neues Polyäther-antibiotikum als Wachstumförderer bei Schweinen. Landwirtsch. Forsch. Sonderheft 37, Kongressband, Braunschweig. (Apud Ganter et al. 1995)

Ganter M., Kieckhofer H. M. & Kucza A. 1995. Intoxicação aguda por salinomicina/tiamulin em suínos. Hora Vet. 15(85):12-16.

[Observe que o trabalho onde o autor recolheu a informação secundária (Ganter et al. 1995), deve ser citado, como acima, por completo na lista das Referências]

Comunicação pessoal

Peixoto P.V. 2009. Comunicação pessoal (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

[Observe que, quando Peixoto não for um dos autores do trabalho, ele deve ser citado no próprio texto, como: "... (Peixoto 2009)" e referenciado, como acima, na lista das Referências; mas quando Peixoto for um dos autores do trabalho, o nome dele deve-ser colocado somente no texto, como: "... (Peixoto, comunicação pessoal)".]

Legendas das Figuras

Fig.1. Marcação positiva acentuada vermelha em neurônios da medula espinhal. Recuperação antigênica com calor e tampão citrato. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.20x.

Fig.2. Marcação positiva vermelha em corpúsculos de inclusão viral no pericário (seta maior) e axônio (seta menor) de célula de Purkinje do cerebelo. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000.

Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.

Fig. 3. Marcação acentuada de antígeno viral na forma de agregado de grânulos vermelhos em neurônios na medula espinhal. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.

Fig.4. Identificação positiva de corpúsculo de inclusão viral única em neurônio fortemente marcado na medula espinhal. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.

Os Quadros

(O termo Quadro é usado, pois é mais abrangente do que o termo Tabela)

Quadro 1. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo policlonal (Chemicon #5199) usando três recuperações antigênicas

Caso no.	Recuperação antigênica					
	Protease XIV		Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	2 ^a	2	2	2	3	3
2	2	2	2	2	3	1 ^b
3	2	2	2	2	3 ^c	3
4	1	1	1	1	3	3
5	3	1	2	1	3	3
6 ^d	0 ^e	0	0	0	0	0

^a Marcação moderada, ^b marcação leve, ^c marcação acentuada, ^d controle negativo, ^e ausência de marcação.

(Note que os títulos dos Quadros não têm ponto no final, como aliás nenhum título)

Quadro 2. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal GeneTex (GTX 21002) usando três recuperações antigênicas

Caso	Recuperação antigênica					
	Protease XIV		Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	1 ^a	1	1	1	0 ^b	0
2	1	1	1	1	0	0
3	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	0	0
6 ^c	0	0	0	0	0	0

^a Marcação leve, ^b ausência de marcação, ^c controle negativo.

Quadro 3. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal Biodesign (C86307M) usando três recuperações antigênicas

Caso no.	Recuperação antigênica					
	Protease XIV		Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1 ^b	1	1	1	1	0 ^a	0
2	0	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6 ^c	0	0	0	0	0	0

^a Ausência de marcação, ^b marcação leve, ^c controle negativo.

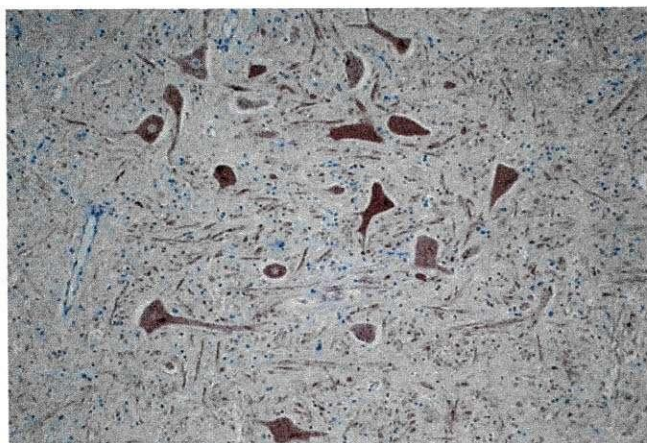


Figura 1

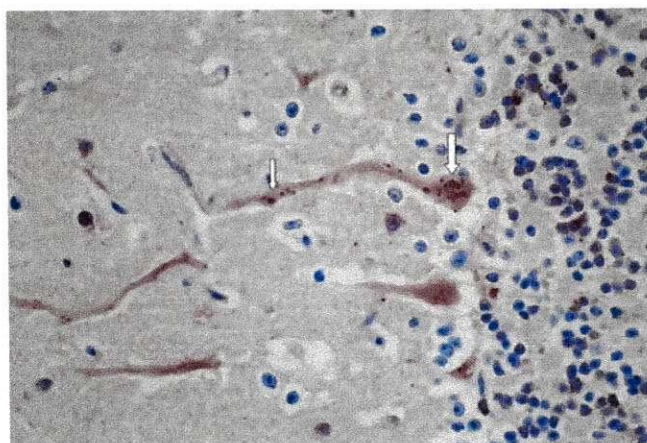


Figura 2

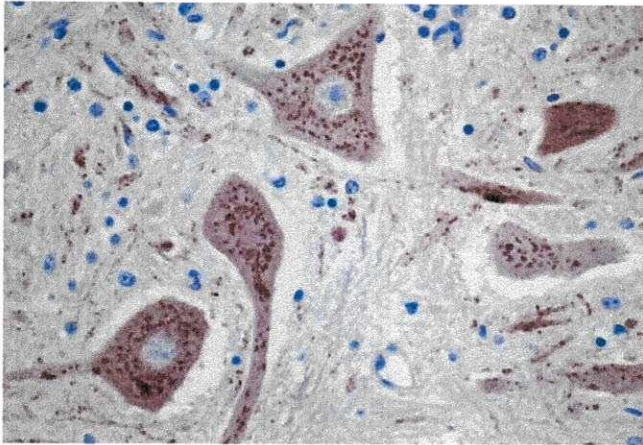


Figura 3

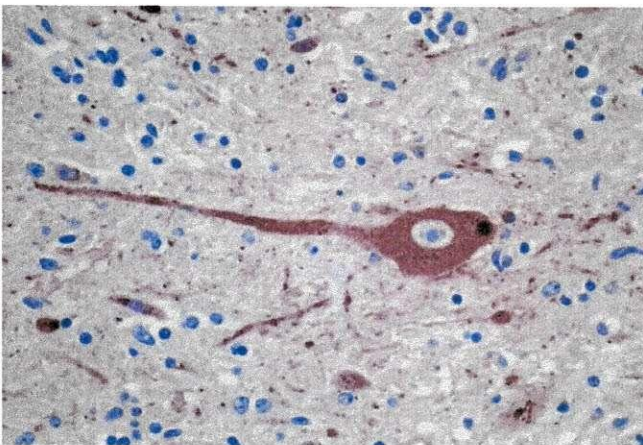


Figura 4



ISSN 1516-0572
ISSN on line 1983-084X

REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Brazilian Journal of Medicinal Plants

Fundação do Instituto de Biociências - FUNDIBIO

Homepage: <http://www.sbpmed.org.br/>

Campinas, 22 de maio de 2014.

Ilma. Sra.

Ana Raquel Carneiro Ribeiro,

Prezada Senhora,

Temos a grata satisfação de acusar o recebimento, em 22/05/2014, do manuscrito "*Preliminary phytochemistry and toxicity determination of botanical hydroalcoholic extract of Tarenaya spinosa (Jacq.) Raf. on Artemia salina Leach*", de autoria de ANDRADE, F.D., RIBEIRO, A.R.C., MEDEIROS, M.C.; BENVENUTTI, M.E.M; RODRIGUES, O.G.; MAGALHÃES, F.E.A.; SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R., que recebeu o protocolo de nº 14_049.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães

Editor Chefe

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais

rbpm.sbpmed@gmail.com



Scientific Electronic Library Online

UNICAMP-CPQBA - Av. Alexandre Cazellato, 999 Vila Betel
13.140-000 Paulínia-SP - Brasil - Tel.: 19 2139 28 91
rbpm.sbpmed@gmail.com

Jurgen Dobereiner (jurgen.dobereiner@pvb.com.br)
Adicionar aos contatos
01/07/2014
Para: 'Ana Raquel'

Prezada Dra. Ana Raquel,

O seu artigo foi registrado com **Trabalho 3807 LD**.

Atenciosamente,

Jürgen Döbereiner

Editor Pesq. Vet. Bras.