

Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos brutos de plantas da Floresta Amazônica e Mata Atlântica brasileira sobre *Haemonchus contortus*

[Evaluation of the anti-helminthic activity of crude extracts from the Brazilian Amazon and Mata Atlântica plants against *Haemonchus contortus*]

M.P.V. Cunha, A.F. Alves Neto, I.B. Suffredini*, L.J.C. Abel

Universidade Paulista – UNIP – São Paulo, SP

RESUMO

No mundo todo, as verminoses são causa de considerável prejuízo econômico na criação de ovinos. As perdas estão relacionadas ao retardo na produção, custos com tratamentos profiláticos e, em casos extremos, à morte dos animais. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação anti-helmíntica de extratos vegetais sobre nematoides como alternativa terapêutica no tratamento da verminose em ovinos. Extratos orgânicos e aquosos foram obtidos de plantas nativas da Floresta Amazônica e Mata Atlântica, e foram testados na concentração de 100µg/mL em ensaios de toxicidade *in vitro* contra ovos de *Haemonchus contortus* e de 200µg/mL contra suas larvas. Na concentração estabelecida, apresentaram significativa atividade relacionada à inibição de eclosão de ovos; em particular, o extrato orgânico de folhas e frutos de *Trichilia* sp. e o extrato aquoso dos órgãos aéreos de *Phyllanthus attenuatus*. Os resultados *in vitro* sugerem que extratos aquosos e orgânicos dessas plantas podem oferecer novas alternativas de controle da verminose em ovinos a partir de produtos naturais.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*, anti-helmínticos, Floresta Amazônica, extratos vegetais, controle parasitário

ABSTRACT

Helminthosis play a crucial role in small ruminant production leading to enormous economic losses particularly in areas where extensive grazing is practiced. It causes a loss of production through mortality, weight loss, reduced milk and wool production. Haemonchus contortus is a highly pathogenic small ruminant helminthes parasite, which is capable of causing acute diseases and high mortality. Therefore, there is an urgent need to seek alternative or complementary solutions to the control of parasitic nematodes of ruminants. The tropical forests concentrate the highest biodiversity in the world, particularly those located in Brazil, whose species richness is estimated to account for 20% of the total world richness and little is known about the chemical and pharmacological potentialities of Brazilian tropical forests. In this work, organic and aqueous extracts were tested on eggs and in the larval development test on Haemonchus contortus. The organic extract obtained from leaves and fruits of Trichilia sp. and the aqueous extract obtained from the aerial organs of Phyllanthus attenuates showed significant activity related to the inhibition of H. contortus egg eclosion. In vitro results suggest that both extracts, as well as eleven other active extracts, can offer alternatives in sheep worm control.

Keywords: *Haemonchus contortus*, anti-helminthics, Amazon rain forest, plant extracts, parasite control

INTRODUÇÃO

A criação de ovinos tem desempenhado importante papel econômico na pecuária

brasileira. No que diz respeito à participação no mercado mundial, a importação de carne ovina passou de 2,3 mil toneladas em 1992 para 14,7 mil toneladas em 2000, representando um crescimento acima de 600%. A importação de

Recebido em 22 de outubro de 2012

Aceito em 1 de outubro de 2013

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: ibsuffredini@yahoo.com.br

carne caprina também apresentou um crescimento bastante significativo (EMBRAPA CNPC, acessado em 2012).

Dentre os fatores que causam prejuízos na ovinos e caprinocultura, as verminoses causadas pelo parasita *Haemonchus contortus* ocupam lugar de destaque, uma vez que este é o nematódeo de patogenia mais significativa para pequenos ruminantes (Jasmer e Mc Guire, 1996) e altamente prevalente no Brasil (Amarante, 2001). As consequências das infecções causadas por esse parasita são o atraso de desenvolvimento corporal dos cordeiros, a queda na produção e na qualidade da carne e da lã (Ramos *et al.*, 2004) e a morte de animais jovens, nos casos mais graves (Molento *et al.*, 2004). Um dos principais fatores ligados à eficiência do ciclo de vida e infecção dos nematoides de ovinos é a resistência a fármacos anti-helmínticos atualmente empregados (Echevarria e Pinheiro, 1989). Por isso o uso de produtos naturais aparece como alternativa terapêutica para o tratamento de verminoses, (Githiori *et al.*, 2006).

O emprego de plantas medicinais tem sido feito há séculos pelos agricultores para o tratamento do parasitismo e melhorar o desempenho produtivo dos animais. No entanto, a evidência científica sobre a eficácia antiparasitária da maioria dos produtos vegetais é limitada, apesar de sua ampla utilização. A validação científica dos efeitos antiparasitários e possíveis efeitos colaterais de produtos vegetais em ruminantes é necessária antes da sua adoção como um novo método para controle de parasitas (Githiori *et al.*, 2006). O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta. Sua biota conhecida está entre 170 e 210 mil espécies de plantas, sendo que as descritas representam apenas 49.520 espécies, embora seja um número crescente (Capobianco, 2001). A Floresta Amazônica e a Mata Atlântica constituem cerca de 30% dos remanescentes de florestas tropicais existentes sobre a superfície terrestre, abrigando não somente a maior diversidade biológica do planeta (Mittermeier *et al.*, 1999), como também alta variabilidade genética expressa na forma de componentes fitoquímicos (Hamann *et al.*, 1991). Diante desse contexto, verificamos a pertinência de se realizar estudos relacionados ao potencial farmacológico de plantas tropicais brasileiras, especificamente da Mata Atlântica brasileira e da Floresta Amazônica, como agentes anti-helmínticos.

Este trabalho tem como objetivo realizar ensaios de identificação de extratos vegetais de plantas brasileiras que sejam ativos contra ovos e larvas de *Haemonchus contortus*, através de testes *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção e preparo dos extratos, as plantas foram coletadas em florestas brasileiras, após obtenção de licenças de coleta e acesso aos recursos genéticos emitidas pelo IBAMA e do CGen (MMA) (12A/2008). As espécies foram coletadas em igapó, florestas inundadas pelo Rio Negro. Exemplares de cada espécie (exsicatas) foram registrados e depositados no Herbário UNIP (Suffredini *et al.*, 2007a).

Diferentes órgãos de cada espécie foram coletados (p.ex., órgãos aéreos, folhas ou caule) e foram secos em estufa de circulação de ar (Fanem), a 40°C. Depois, foram moídos em moinho de facas (Holmes) e submetidos à maceração, por 24 horas, com diclorometano:metanol (1:1) (Merk), seguido de uma segunda maceração, por mais 24 horas, com água destilada Milli-Q (Millipore). Os extratos aquosos foram liofilizados (Virtis) e os orgânicos, rotaevaporados (Buchii), para depois serem mantidos sob congelamento até o uso (Suffredini *et al.*, 2006).

Os extratos orgânicos foram diluídos em dimetilsulfóxido 50% (DMSO 50%) e os aquosos, em água. Foram preparados inicialmente a uma concentração de 2mg/mL. Depois, foram diluídos 10 vezes, utilizando-se microplacas de 96 poços, sendo que 20µL de cada solução inicial de extrato inicial foram transferidos para cada um dos poços, e em seguida, o volume final foi completado para 200µL de água destilada grau Milli-Q (Millipore). Desse modo, cada extrato foi diluído a 200µg/mL. Durante a realização do ensaio, 100µL do extrato diluído foram adicionados às suspensões de ovos de *H. contortus*, resultando em uma concentração final de extrato de 100µg/mL. Para a avaliação da atividade dos extratos vegetais contra as larvas de *H. contortus*, 30µL dos extratos vegetais diluídos à concentração de 2mg/mL foram transferidos para as placas contendo 270µL de suspensão de larvas em meio de cultura, originando uma diluição final de 200µg/mL. Como controle negativo,

foram utilizados DMSO 50%, água destilada e como controle positivo, moxidectina dissolvida em DMSO 50%, na concentração final de 100µg/mL.

Para a obtenção dos ovos de helmintos usados, empregou-se uma versão adaptada do teste de eclodibilidade, para determinação de resistência anti-helmíntica, proposto por *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* – WAAVP (Coles et al., 1992). Foram utilizados ovinos criados em sistema semi-intensivo e com status parasitológico de contagem média de 2.000 OPG (ovos por grama de fezes), segundo o método de Gordon e Whitlock modificado (Ueno e Gutierrez, 1983). Aproximadamente 10g de fezes, coletadas diretamente da ampola retal, foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas imediatamente ao laboratório, à temperatura ambiente. O material foi triturado em graal contendo 150mL de solução salina hiper-saturada e foi filtrado em tamises de malhas de 250mn/µm (nº 60) e 180mn/µm (nº 80). O material obtido foi acondicionado em tubos de centrifuga (1,4 x 9,8cm) e centrifugado a 2.000rpm por dois minutos. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de centrifuga, repetindo-se três vezes o último procedimento para lavagens consecutivas com água destilada. Na última lavagem, o sedimento foi mantido com um pequeno volume de água destilada, ressuspensionado e transferido para tubos de ensaio (1,8 x 10cm) em alíquotas de 200µL, de modo a comporem uma suspensão com ovos de helmintos, contados com auxílio de microscópio óptico.

A análise do efeito dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento de ovos de helmintos, através do teste de eclodibilidade (TE), foi realizada em placas de 96 poços, contendo 100µL da suspensão de ovos (equivalente a 100 ovos) por poço, em que se adicionou igual volume do tratamento (extrato vegetal) a ser estudado, preparado de modo que a concentração final resultante fosse 100µg/mL. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em estufa à temperatura de 26±1°C, por 48h, umidade relativa de 100%. O tempo decorrido entre a coleta de fezes e o início da incubação dos ovos sob a ação dos extratos das plantas foi de, no máximo, duas horas. Avaliou-se a ação dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento dos ovos, após o período de incubação de 48h,

através de leitura em microscopia óptica, no aumento de 100 vezes. Foram avaliados todos os ovos presentes na amostra, de modo a classificá-los de acordo com o estágio de desenvolvimento em que se encontravam. Cada tratamento foi feito em triplicata e os extratos que apresentaram atividade foram testados posteriormente no desenvolvimento larval.

O teste de desenvolvimento larval (TDL) foi proposto por Demeler et al. (2010). Realizou-se o ensaio em placa de 24 poços. Cada poço recebeu 200µL de água destilada, 20µL de suspensão contendo 100 ovos e 50µL de meio de crescimento, que foi preparado a partir de uma mistura na proporção de 2:2:1 de levedura:extrato de Earle, anfotericina B (Sigma A2942, 0,5mg/mL) e 1,5mg/mL de *Escherichia coli* K12 liofilizada (suspensa em água destilada, autoclavada). Após 24 horas da eclosão dos ovos, foram adicionados 30µL de extrato vegetal, totalizando um volume de 300µL. Incubou-se a placa a 27°C por 7 dias. Após esse período, as larvas viáveis foram contadas.

Os experimentos foram avaliados a partir da análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, seguida de comparações múltiplas entre médias pelo teste Tukey, considerando-se diferenças entre as médias significantes se $p < 0.05$ (GraphPad Prism 5.0).

RESULTADOS

A Tabela 1 relaciona os extratos vegetais que apresentaram atividade contra ovos de nematoides, fornece os dados botânicos das espécies usadas para obtenção desses extratos, assim como a parte do vegetal que foi usada. ANOVA de uma entrada realizada com os extratos orgânicos mostrou diferenças significantes ($F_{(79,160)}=5,939$; $X^2=0,7457$; $p < 0,001$) entre tratamentos e controles, assim como os extratos aquosos ($F_{(74,150)}=4,163$; $X^2=0,6725$; $p < 0,001$). A figura 1A mostra os resultados do processo de triagem realizado para os extratos orgânicos em comparação com os grupos controle e a Figura 1B mostra os resultados do processo de triagem realizado para os extratos aquosos em comparação com os grupos controle. Na Figura 1, estão representados os resultados mais significantes obtidos com extratos orgânicos e aquosos em comparação aos grupos controle. Dos extratos testados,

sete orgânicos e seis aquosos apresentaram significância na capacidade de inibir a eclosão de ovos em relação ao controle positivo. Os extratos que interferiram com a eclosão dos ovos foram testados no teste de desenvolvimento larval

(TDL) e, baseado na ANOVA de uma entrada, nenhum extrato refletiu a eficácia anteriormente observada para os ovos ($F_{(11,12)}=11.47$; $X^2=0,9131$; $p<0,001$) (Fig. 1A).

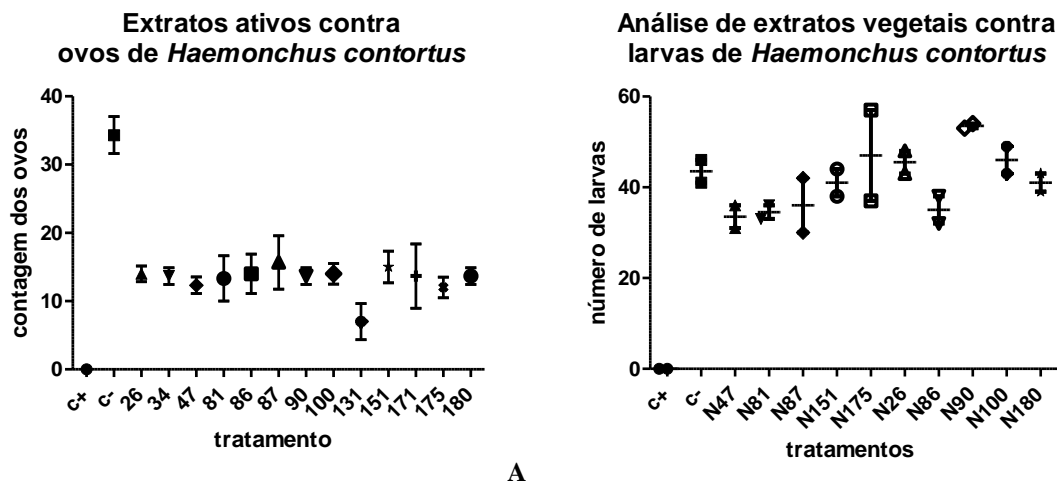


Figura 1. A) Resultados da triagem de extratos orgânicos obtidos de diferentes órgãos de plantas amazônicas contra ovos de *Haemonchus contortus*. B) Resultados da triagem de extratos aquosos obtidos de diferentes órgãos de plantas amazônicas contra ovos de *Haemonchus contortus*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O método proposto permitiu a análise biológica de um número satisfatório de extratos vegetais e pode ser considerado como uma das formas mais rápidas e eficazes de se buscar produtos naturais bioativos. Essa metodologia é frequentemente usada na busca de extratos com atividade antimicrobiana, antifúngica e antitumoral (Younes *et al.*, 2007), mas dados sobre a aplicação desse método na busca de plantas com atividade anti-helmíntica sobre nematódeos de ovinos são escassos.

Dos extratos vegetais testados, sete extratos orgânicos e seis aquosos apresentaram-se significativamente eficazes na inibição dos ovos de *Haemonchus*, na concentração de 100µg/mL. Segundo a literatura consultada, não existem dados publicados sobre a atividade anti-helmíntica dessas espécies. Moxidectina (2mg/mL), controle positivo utilizado, inibiu 100% a eclosão dos ovos. Os extratos apresentaram desempenho promissor, quando comparado com a moxidectina. Nessa análise, é

importante ressaltar que a moxidectina é um composto ativo isolado, enquanto os extratos são compostos por constituintes químicos de origem diversa, que podem agir de modo isolado ou em sinergismo, em relação à atividade ovicida/larvicida (Rates, 2001). No presente estudo, o extrato orgânico EB175, obtido de *Trichilia* sp., apresentou atividade ovicida significativa. Os triterpenoides e limonoides isolados de algumas Meliaceae são descritos como potencialmente inseticidas contra *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho) (Sarria *et al.*, 2011). Três extratos de plantas da família Euphorbiaceae inibiram a eclosão de ovos de modo significativo, sendo dois aquosos, *Mabea nitida* (EB90) e *Phyllanthus attenuatus* (EB86), e um orgânico, *Croton glandulosum* (EB87). Às diversas substâncias isoladas de algumas plantas pertencentes a essa família são atribuídas propriedades antimicrobiana (Brusotti *et al.*, 2011), antioxidante (Van Hong *et al.*, 2011), antidiabética (QI *et al.*, 2010), antitumoral (BALIGA *et al.*, 2011) e anti-inflamatória (Okokon *et al.*, 2010). O extrato orgânico de *Tabernaemontana angulata* (EB81), responsável

por inibição significativa dos ovos de *Haemonchus*, apresentou como compostos majoritários coronaridina e voacangina (Matheus de Assis et al., 2009). Marie-Magdalene et al. (2010) relatam a atividade anti-helmíntica de *Tabernaemontana citrifolia* sobre *Haemonchus contortus*. Suffredini et al. (2007b) descrevem os extratos orgânicos de *Caryocar microcarpum* (EB100) e *Callophyllum brasiliense* (EB47) como citotóxicos a células tumorais. A presença de cumarinas, xantonas, flavonoides e triterpenos em *C. brasiliense* (Clusiaceae) é descrita como responsável pela atividade citotóxica em várias linhagens de células (Cechinel Filho et al., 2009). No presente estudo, o extrato orgânico de *C. microcarpum* (Caryocaraceae) e o extrato aquoso de *C. brasiliense* inibiram de forma significativa a eclosão de ovos de *Haemonchus*. O potencial anti-helmíntico de compostos isolados de espécies pertencentes à família Annonaceae já foi descrito em ensaios sobre nematódeos e protozoários, assim como foi descrita a presença de alcaloides e acetogeninas, compostos isolados frequentemente associados à atividade antiparasitária dessas plantas (Souza et al., 2008). No nosso estudo, o extrato orgânico de *Guatteria riparia* (EB151) foi responsável pela inibição significativa da eclosão de ovos de *H. contortus*.

O extrato aquoso EB26, obtido de *Aldina* sp. e de uma espécie não identificada da família Myrtaceae (EB180) apresentaram atividade ovicida significativa. Não existem menções de atividade biológica sobre nematódeos de pequenos ruminantes relacionadas a essas plantas na literatura. Porém, dados sobre atividades farmacológicas diversas ocorrem. A comparação da atividade relativa à inibição de eclosão de ovos desses extratos na concentração de 100µg/mL com estudos semelhantes indica uma potencial atividade anti-helmíntica dessas plantas. Assis et al. (2003) relataram que o extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia*, responsável por 100% de atividade tóxica a ovos de *H. contortus* na concentração de 50mg/mL, inibiu em torno de 20% a eclosão de ovos na concentração de 3,1mg/mL.

No teste de desenvolvimento larval realizado com os extratos orgânicos e aquosos que apresentaram maior índice de inibição de eclosão de ovos, os resultados de inibição do

desenvolvimento e morte de larvas demonstram ausência significativa de atividade, quando comparados à substância de referência. De acordo com a literatura consultada, concentrações diversas dos extratos devem ser testadas. Costa et al. (2001), pesquisando a atividade anti-helmíntica de extratos brutos *Azadirachta indica*, apresentaram resultados de inibição de ovos de *H. contortus* de 98,22% com uma concentração de 3,12mg/mL e 17,7% de inibição no desenvolvimento de larvas com o mesmo extrato e igual concentração. Quando o mesmo extrato foi empregado na concentração de 50mg/mL, a inibição no desenvolvimento das larvas aumentou para 87,1%. É importante destacar que os testes realizados por esses autores mostram um efeito inibitório de larvas menor que o de eclodibilidade de ovos, quando se usa a mesma concentração de extrato. A inibição de 50% de eclosão de ovos foi observada na concentração de 0,36mg/mL, já a inibição no desenvolvimento de 50% de larvas, na concentração de 98mg/mL. Dados semelhantes também foram apresentados por Al-Shaibani et al. (2008). No presente estudo, os resultados de inibição de eclosão de ovos e de desenvolvimento larval são superiores aos encontrados na literatura, que descreve extratos vegetais ativos em concentrações mais elevadas dos que as utilizadas. Plantas que apresentaram ação letal aos ovos ou larvas no presente estudo necessitam de estudos mais aprofundados no que diz respeito à identificação dos componentes ativos presentes.

Com base nos resultados apresentados, os extratos vegetais selecionados oferecem uma oportunidade para a busca de novos compostos com atividade anti-helmíntica. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para avaliar os componentes ativos e os mecanismos de ação dos extratos. Além disso, determinar uma curva dose-resposta, avaliação dos efeitos *in vivo* e toxicidade é necessário para validar seu uso como uma alternativa terapêutica e pode oferecer novas oportunidades de controle efetivo e econômico das verminoses em ovinos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC de MPC, à Fapesp pelo auxílio 2008/58706-8, à CAPES e à Universidade Paulista pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- AL-SHAIBANI, I.R.M.; PHULAN, M.S.; ARIJOAND A.; QURESHI T.A. Ovicidal And Larvicidal Properties Of *Adhatoda Vasica* (L.) Extracts Against Gastrointestinal Nematodes Of Sheep *in vitro*. *Pakistan Vet. J.*, v.28, p.79-83, 2008.
- AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: MATOS, W.R.S. *A produção animal na visão dos brasileiros*. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.461-473.
- ASSIS, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M. *et al.* Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, v.117, p.43-49, 2003.
- BALIGA, M.S.; DSOUZA, J.J. Amla (*Emblica officinalis* Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, v.20, p.225-39, 2011.
- BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; FRASSÀ, G. *et al.* Antimicrobial properties of stem bark extracts from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Excell. *J. Ethnopharmacol.*, v.135, p.797-800, 2011.
- CAPOBIANCO, J.P.R. *Dossiê Mata Atlântica*. Projeto monitoramento participativo da mata Atlântica. Instituto Socioambiental; Rede de ONGs Mata Atlântica, Sociedade Nordestina de Ecologia. São Paulo: Ipsis Gráfica e Editora. 2001. 407p.
- CECHINEL FILHO, V.; MEYRE-SILVA, C.; NIERO, R. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chem. Biodivers.*, v.6, p.313-327, 2009.
- COLES, G.C.; BAUER, F.H.M.; BORGSTEEDE, S. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*, v.44, p.35-44, 1992.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A. *et al.* Standardization of the larval migration inhibition test for detection of resistance to ivermectin into gastro intestinal nematoids of ruminants. *Vet Parasitol.*, v.174, p.58-64, 2010.
- ECHEVARRIA, F.; PINHEIRO, A.C. Avaliação de resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos no município de Bagé, RS. *Pesq. Vet. Bras.*, v.9, p.69-71, 1989.
- EMBRAPA Caprinos e Ovinos, disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/>> acessado em 06/09/2012, às 14h30. Responsável pela página: Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE.
- GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminthes in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.*, v.139, p.308-320, 2006.
- HAMANN, O. *The Joint IUCN-WWF Plants conservation programme and its interest in medicinal plants*. In: AKERREK, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (eds.). *The Conservation of Medicinal Plants*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 13-22.
- JASMER, D.P.; MCGUIRE, T.C. Antigens with application toward immune control of blood-feeding parasitic nematodes. *Br. Vet. J.*, v.152, p.251-268, 1996.
- MARIE-MAGDELEINE, C.; MAHIEU, M.; D'ALEXIS, S. *et al.* *In vitro* effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.*, v.89, p.88-92, 2010.
- MATHEUS DE ASSIS, C.; MORENO, P.R.H.; YOUNG, M.C. *et al.* Isolamento e determinação da atividade biológica dos alcaloides majoritários de *Tabernaemontana angulata*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, p.626-631, 2009.
- MITTERMEIER, R.A.; MYERS, N.; GIL, P.R.; MITTERMEIER, C.G. *Hotspots*. Cidade do México: Cemex S.A. 1999.
- MOLENTO, M.B.; TASCIA, C.; GALLO, A. *et al.* Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. *Cienc. Rural.*, v.34, p.1139-1145, 2004.
- OKOKON, J.E.; NWAFOR, P.A. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of ethanolic root extract of *Croton zambesicus*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, v.23, p.385-392, 2010.

- PESSOA, L.M.; MORAIS, S.M.; BEVILÁQUA, C.M.L. et al. Avaliação, *in vitro*, do efeito ovicida dos óleos essenciais de *Chenopodium ambrosoides* e *Ocimum gratissimum* sobre *Haemonchus contortus*. *Cienc. Animal*, v.11, p.63-65 2001.
- QI, L.W.; LIU, E.H.; CHU, C. et al. Anti-diabetic agents from natural products--an update from 2004 to 2009. *Curr. Top. Med. Chem.*, v.10, p.434-57, 2010.
- RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P. et al. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Cienc. Rural*, v.34, p.1889-1895, 2004.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *J. Int. Soc. Toxinol.*, v.39, p.603-13, 2001.
- SARRIA, A.L.; SOARES, M.S.; MATOS, A.P. et al. Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH). *Z Naturforsch C.*, v.66, p.245-50, 2011.
- SOUZA, M.M.C.; BEVILACQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M. et al. Anthelmintic acetogenin from *Annosa aquamosa* L. Seeds. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v.80, p.271-277, 2008.
- SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Cytotoxic molecules from natural sources. Tapping the Brazilian biodiversity. *Anti-Canc. Agents Med. Chem.*, v.6, p.367-75, 2006.
- SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; FRANA, S.A. et al. *In vitro* breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. *Pharmazie*, v.62, p.798-800, 2007a.
- SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia*, v.78, p.223-6, 2007b.
- UENO, H.; GUTIERREZ, V.C. *Manual para o diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. Japan International Cooperation Agency, 1983. 176p.
- VAN HONG, N.T.; RIVIÈRE, C.; HONG, Q.T. et al. Identification by LC-ESI-MS of flavonoids responsible for the antioxidant properties of *Mallotus* species from Vietnam. *Nat. Prod. Commun.*, v.6, p.813-8, 2011.
- YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. *Clinics*. v.62, p.763-8, 2007b.