Capítulo 6 - Metodologias de triagem de anti-helmínticos naturais

Karina Maia Paiva
Larissa Barbosa Nogueira Freitas

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

PAIVA, K. M., and FREITAS, L. B. N. Metodologias de triagem de anti-helmínticos naturais. In: BEZERRA, A. C. D. S., and SILVA, M. D. C., eds. *Fitoterapia e a Ovinocaprinocultura: uma associação promissora* [online]. Mossoró: EdUFERSA, 2018, pp. 125-140. ISBN: 978-85-57570-91-7.
<https://doi.org/10.7476/9786587108643.0008>.

All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

METODOLOGIAS DE TRIAGEM DE ANTI-HELMÍNTICOS NATURAIS

Karina Maia Paiva
Larissa Barbosa Nogueira Freitas

1 INTRODUÇÃO

Parasitas gastrintestinais afetam a saúde e a produtividade de rebanhos ovinos e caprinos em todas as regiões produtoras do Brasil e do mundo. O controle desses nematoides tem sido realizado com o uso estratégico de anti-helmínticos químicos; entretanto, a propagação de populações de nematoides com resistência múltipla às drogas sintéticas tornou indispensável a busca por novas alternativas para o seu controle (MINHO et al., 2014). Nesse contexto, a utilização de plantas que contenham moléculas bioativas (metabólitos primários e secundários) no controle de helmintos gastrintestinais tem sido foco de pesquisas, uma vez que os fitoterápicos contribuem para o desenvolvimento de aproximadamente 25% dos medicamentos modernos, representando uma fonte viável e promissora de biomoléculas de interesse farmacológico (OMS, 2012).

A etnoveterinária tem fornecido informações de grande interesse científico a respeito de plantas com potenciais atividades anti-helmínticas. Esse termo se refere à ciência que analisa e valida o conhecimento popular e suas técnicas empregadas no controle da saúde animal (ANTONIO et al., 2015).

Utilizar dados científicos sobre a composição bioquímica de vegetais é uma forma eficaz de selecionar novas plantas com potenciais proprie-

dades antiparasitárias, já que a presença de metabólitos primários e/ou secundários está relacionada a essa atividade. Dessa forma, o relato científico da presença de compostos com atividade anti-helmíntica (tais como os taninos e, atualmente, as lectinas) em espécies vegetais ainda não avaliadas quanto a essa ação biológica é um ótimo indicativo de que tais espécies podem servir como formas alternativas no controle parasitário (HOSTE et al., 2008).

2 VALIDAÇÕES CIENTÍFICAS DE PLANTAS ANTI-HELMÍNTICAS

A busca por tratamentos alternativos para infecções causadas por helmintos gastrintestinais em animais tem aumentado, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência pelos nematoides, justificando a utilização de plantas (ou seus derivados) no controle desses parasitas. Entretanto, são necessárias análises científicas que validem a atividade antiparasitária dessas plantas, a fim de estabelecer a eficácia, o grau de toxicidade, a dose correta e a sua melhor via de administração, assim como ocorre na avaliação dos produtos sintéticos. Os testes realizados podem ser *in vitro* e *in vivo* (McGAW; ELOFF, 2008).

2.1 Testes *in vitro*

Os ensaios *in vitro* são utilizados para iniciar a pesquisa e fazer uma triagem de plantas com potencial biológico, reduzindo os custos experimentais e o tempo de pesquisa, bem como evitando o uso indiscriminado de animais de experimentação (HOSTE et al., 2008). Para a determinação do potencial anti-helmíntico de plantas, podem ser realizados testes com diferentes alvos e/ou diferentes fases do ciclo de vida parasitária (ovo ou larva), como os testes de eclosão de ovos,

de motilidade, de desenvolvimento larval, de alimentação larval e de desembainhamento larval, com o intuito de detectar o potencial anti-parasitário de preparações vegetais (JACKSON; HOSTE, 2010, p. 55).

2.1.1 Teste de eclosão de ovos

Nesse ensaio, são utilizados ovos de helmintos obtidos de fezes de animais infectados. As fezes são coletadas diretamente da ampola retal dos animais para evitar a contaminação das fezes por nematoides de vida livre (COLES et al., 1992).

Após a coleta, é realizada uma contagem de ovos de helmintos por gramas de fezes (OPG) (CHAGAS et al., 2011). Nessa etapa, são pesados 4 g de fezes maceradas e, em seguida, são homogeneizadas com solução hipersaturada de cloreto de sódio (para facilitar a submersão dos ovos) e passadas por uma peneira comum para a separação dos resíduos fecais. Um pequeno volume dessa mistura é adicionado em duas células da câmara de McMaster e lido em microscópio óptico de luz para se fazer a contagem total de ovos de helmintos para indicar o grau de infecção do hospedeiro. As etapas subsequentes só são realizadas em casos em que haja infecção (CHAGAS et al., 2011).

Após a OPG, as fezes são processadas para recuperação dos ovos e diminuição dos detritos fecais para que estes não interfiram no mecanismo de ação de metabólitos vegetais. Em seguida, os ovos são submetidos aos ensaios *in vitro* (HUBERT; KERBOEUF, 1992; JACKSON; HOSTE, 2010). Para obtenção de resultados mais significativos e confiáveis, após a coleta, as amostras devem ser processadas em um prazo de até três horas, em razão do rápido desenvolvimento embrionário dos helmintos (COLES et al., 1992; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

O processo de recuperação dos ovos consiste em passar as fezes, homogeneizadas com água da torneira, por uma sequência de peneiras

com poros de 0,15mm, 0,10mm, 0,036mm e 0,02mm de abertura, para retenção dos ovos e separação de contaminantes. O material retido na última peneira (com diâmetro do poro de 0,02mm) deve ser lavado com água destilada e, em seguida, submetido a uma centrifugação em tubos Falcon de 15 mL (por 5 min, a 3.000rpm, em temperatura ambiente). O sobrenadante é descartado, o *pellet* é ressuspensionado com solução hipersaturada de cloreto de sódio (para que haja a suspensão dos ovos) e centrifugado novamente (por 5min, a 3.000rpm, em temperatura ambiente). O sobrenadante obtido após centrifugação é filtrado em uma peneira com poros de 0,02mm e o material retido é lavado com água destilada para a recuperação dos ovos. 3 alíquotas de 40 µL desse lavado (material recuperado) são lidas em microscópio óptico de luz, a fim de verificar a quantidade de ovos presentes e, por fim, calcular a média da quantidade total de ovos (HUBERT; KERBOEUF, 1992).

Os ovos recuperados são colocados em placas de cultivo, em contato com as preparações que estão sendo testadas quanto ao potencial anti-helmíntico, tais como os extratos vegetais (bem como o controle positivo e negativo). Os ensaios são incubados por 48 horas, a 27°C. Após o período de incubação são adicionadas duas gotas de lugol em cada poço, para promover a paralisação do desenvolvimento dos parasitas e se realizar a contagem de ovos e de larvas eclodidas, através de microscópio óptico de luz (COLES et al., 1992).

2.1.2 Teste de motilidade larvar

Esse ensaio tem o objetivo de avaliar o efeito de potenciais anti-helmínticos capazes de causar a paralisia na musculatura somática de larvas no terceiro estágio (L3), obtidas a partir de coproculturas (UENO; GONÇALVES, 1998; FORTES et al., 2013). As L3 são incubadas junto às preparações que estão sendo testadas (bem como o

controle positivo e negativo) por um período variável de tempo (24, 48 ou 72 horas). Após período de incubação, é avaliada a motilidade das larvas L3. Essa avaliação é realizada através da observação das larvas L3 que foram capazes (ou não) de atravessar o gel de ágar e peneiras; a separação de larvas que migram e larvas que não migram (não atravessam o ágar e a peneira) resulta em uma quantificação confiável (DEMELETER et al., 2010).

2.1.3 Teste de desenvolvimento larval

Esse teste é utilizado para avaliar o potencial anti-helmíntico de materiais (vegetais ou não) sobre o desenvolvimento larval. São necessários ovos recuperados de nematoides, assim como no teste de eclosão de ovos. Os ovos são cultivados em placas por um determinado período de tempo para a obtenção de larvas infectantes. O cultivo dos ovos é realizado em presença de *Escherichia coli* liofilizada (fonte nutricional para as larvas que irão eclodir), antifúngico (para o controle de crescimento fúngico, impedindo a contaminação) e meio nutritivo (por 48h, a 27°C), até a eclosão dos ovos em larvas de primeiro estágio (L1) (BIZIMENYERA et al., 2006). Após o período de incubação, são adicionadas as preparações que estão sendo testadas (bem como o controle positivo e negativo). O ensaio é incubado novamente (por 5 dias, a 27°C). Em seguida, o lugol é adicionado e é realizada a leitura em microscópio óptico de luz para se determinar o percentual de larvas em suas diferentes fases de desenvolvimento (L1 e L3) e, assim, avaliar a preparação (vegetal ou não) quanto ao potencial de inibição do desenvolvimento larval para L3 (HUBERT; KERBOUEF, 1992; BIZIMENYERA et al., 2006).

2.1.4 Teste de alimentação larval

Esse ensaio é utilizado para avaliar o efeito de preparações no comportamento de alimentação de larvas de nematoides no primeiro estágio (L1). As larvas são expostas em contato com o produto em teste (por exemplo, preparações vegetais, bem como o controle positivo e negativo) por um determinado período e, posteriormente, são alimentadas com *E. coli* liofilizada, marcada com isotiocianato de fluoresceína. Após um período de incubação, as larvas que se alimentaram podem ser observadas em microscópio de fluorescência invertido, através da detecção da fluorescência de *E. coli* marcando o intestino das larvas (JACKSON; HOSTE, 2010).

2.1.5 Teste de inibição do desembainhamento larval

Com o objetivo de analisar o efeito de um produto em teste (por exemplo, preparações vegetais, bem como o controle positivo e negativo) sobre a inibição do desembainhamento larval, esse teste utiliza larvas L3 recuperadas de coproculturas. Em tubos Falcon de 15 mL, adiciona-se 1,5 mL de uma solução contendo larvas L3 e adiciona-se também 10 mL do produto em teste; após homogeneização, o material é incubado a 22 °C, por 3 h. Após a incubação, o material é centrifugado (por 2 min, a 3000 rpm, em temperatura ambiente) e o sobrenadante (produto em teste) é descartado. Ao *pellet* obtido é adicionado PBS (tampão fosfato de sódio, pH 7,2) e o material é submetido a uma nova centrifugação (a fim de remover o produto em teste que ainda possa estar em contato com as larvas). Essa etapa de lavagem com PBS deve ser realizada três vezes e, ao final da última lavagem, é descartado o sobrenadante e as larvas são recuperadas (1,5 mL de solução larval em PBS) (MINHO et al., 2014).

Em placas de cultivo (placas de 24 poços), o produto em teste é avaliado. Geralmente, utilizam-se as fileiras da placa para avaliar o produto em teste em diferentes concentrações, enquanto as colunas representam o tempo de reação que ocorre entre as larvas e a solução de hipoclorito (solução de desembainhamento). A cada poço, são adicionados 100 µL de solução larval homogeneizada e também 1,4 mL de solução de desembainhamento. Após 10 min de incubação, são adicionadas duas gotas de lugol nos poços da primeira coluna do ensaio; após 20 min, o lugol é adicionado nos poços da segunda coluna, e assim por diante, até que todas as colunas tenham recebido o lugol. Em seguida, as larvas são examinadas em microscópio invertido, quanto à presença ou ausência da cutícula para determinar a porcentagem de inibição do desembainhamento larvar (MINHO et al., 2014).

2.2 Testes *in vivo*

A validação científica de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica exige a realização de testes *in vitro* e também *in vivo* para a determinação da sua eficácia. A eficácia das amostras com potencial anti-helmíntico pode ser determinada pelo teste da redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF), o qual fornece uma estimativa da diminuição na excreção de ovos, comparando-se dados obtidos antes e após o tratamento do animal com a preparação em teste (TAYLOR et al., 2002). O diagnóstico obtido pelo TRCOF proporciona informações relevantes para a orientação e a validação quanto ao uso de preparações com atividade antiparasitária (EMBRAPA, 2009).

Após a obtenção de resultados através dos testes *in vitro*, é possível realizar a seleção inicial da atividade anti-helmíntica das preparações avaliadas (como extratos e frações proteicas, por exemplo). Dessa forma, parte-se para a validação através da aplicação experimental *in vivo*,

primeiramente utilizando animais de laboratório (testes pré-clínicos e toxicológicos) e, em seguida, utilizando testes específicos em espécies de interesse econômico, para indicação terapêutica (HOSTE et al., 2008).

2.2.1 Testes pré-clínicos de eficácia *in vivo*

Os testes pré-clínicos são aqueles realizados em animais experimentais de laboratório, enquanto os testes clínicos são os realizados diretamente na espécie alvo de interesse. A avaliação clínica dessas espécies deve ser realizada após a realização de testes toxicológicos, nos quais é definida a dose mínima necessária de um determinado produto para causar a letalidade de 50% do número total de animais submetidos ao tratamento com o referido produto, chamada de DL50. Os testes pré-clínicos eficazes são os que utilizam animais naturalmente ou artificialmente infectados. Os resultados desses testes são avaliados comparando em percentuais os grupos de animais tratados (com um determinado produto em teste) com grupos de animais não tratados (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

2.2.1.1 Animais de experimentação

Os roedores são os animais mais utilizados como modelos experimentais, por apresentarem diversas vantagens operacionais e por permitirem o uso de maior número de animais por grupo. Assim, pode-se confirmar a possível atividade antiparasitária *in vivo*, de acordo com os resultados dos testes *in vitro*, bem como se torna mais fácil a determinação da dose de um produto em teste a ser aplicado *in vivo*, nos animais de interesse. Os animais mais utilizados para essa finalidade são os roedores das espécies *Nippostrongylus brasiliensis* e *Heligmosomoides polygyrus*, por

demonstrarem grande eficácia na elucidação da atividade biológica de um produto em teste (ROJAS et al., 2006).

Outro tipo de roedor utilizado para testes parasitários é o tipo mutante nude, o qual possui um gene modificado que provoca características, tais como ausência de pelos e deficiência no sistema imune (ocasionada pela diminuição de células T CD4⁺ e CD8⁺), o que torna esses animais alvos de pesquisas científicas, como aquelas envolvendo testes de resistência a nematoides gastrintestinais (GILL; WATSON; BRANDON, 1993; FOSTER et al., 1983).

No entanto, a fisiologia desses animais difere da maioria dos pequenos ruminantes, o que pode vir a comprometer os resultados obtidos em pesquisas envolvendo ensaios parasitários, uma vez que a metabolização das partículas no rúmen dos pequenos ruminantes é específica e pode ocorrer também uma interação diferenciada entre as preparações avaliadas como anti-helmínticas (por exemplo, preparações de origem vegetal) e seus parasitas gastrintestinais (HOSTE et al., 2008).

2.2.2 Testes toxicológicos

Os testes toxicológicos são importantes para determinar a segurança na utilização de plantas para o controle parasitário em animais. A avaliação de toxicidade envolve a verificação dos efeitos que se obtém após a administração direta no animal (toxicidade aguda) ou após administrações consecutivas (toxicidade crônica). Alguns estudos toxicológicos, como os reprodutivos, neurotóxicos, teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos permitem uma avaliação minuciosa da toxicidade de amostras de origem vegetal (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Os estudos toxicológicos, quando aplicados em animais experimentais e sob condições controladas de laboratório, permitem a elucidação dos efeitos de determinadas substâncias, as quais podem

causar efeitos similares em seres humanos ou em outras espécies de interesse (BARROS; DAVINO, 1996).

2.2.3 Testes clínicos de eficácia *in vivo*

Após a realização dos testes pré-clínicos, se comprovada a não toxicidade das amostras avaliadas como anti-helmínticas, em seguida são realizados os testes clínicos de determinação da eficácia do produto, utilizando-se a espécie-alvo para determinar o efeito anti-helmíntico das amostras obtidas de plantas medicinais sobre o animal de interesse. Os testes, em sua maioria, são desenvolvidos com o intuito de avaliar a resistência adquirida por nematoides ao uso de anti-helmínticos sintéticos comercializados. Esses testes procuram determinar a eficácia das amostras vegetais contra os nematoides em animais de produção, dentre eles, os mais comumente utilizados são o TRCOF e o teste controlado (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

O TRCOF demonstra a estimativa da eficácia anti-helmíntica de uma amostra através da comparação da contagem de ovos nas fezes antes e após o tratamento com determinada preparação. Testes anteriormente realizados demonstraram uma boa correlação na redução de ovos de *Haemonchus contortus* pelo TRCOF. Já o teste controlado é realizado por meio da recuperação dos parasitas que foram excretados nas fezes, após o tratamento com determinada preparação, comparando-se esses parasitas com os presentes no trato gastrointestinal do animal, através de necropsia. Embora seja um teste mais reprodutível e confiável, os altos custos e exigência de mão de obra qualificada inviabilizam o teste na maioria dos casos (TAYLOR et al., 2002).

3 UTILIZAÇÃO DE FITOTERÁPICOS

Existem dois métodos para utilização de plantas no controle parasitário, nos quais as plantas podem ser classificadas como plantas nutracêuticas e plantas medicinais. Essa distinção se refere ao método de uso e caracterização dos recursos naturais, assim como se refere também à eficácia na validação científica contra os nematoides gastrointestinais e aos seus potenciais efeitos negativos sobre os mesmos (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006). Considerando que a definição de nutracêutico é mais relacionada ao conceito de alimentação ou produtos considerados aditivos alimentares, a utilização de plantas medicinais (como fitoterápicos) se aproxima do conceito de um medicamento passível de comercialização (HOSTE et al., 2008).

3.1 Nutracêuticos

Os nutracêuticos são alimentos com funções medicamentosas que em sua composição possuem substâncias capazes de trazer benefícios ao organismo. Na alimentação animal, os nutracêuticos são geralmente utilizados na forma de plantas cruas para elaboração de forragens (SANDOVAL-CASTRO et al., 2012). Devido à ampla utilização de plantas medicinais na medicina tradicional, essas espécies podem ser consideradas seguras; porém, os nutracêuticos são geralmente considerados tóxicos aos animais, devido a possuírem em sua composição moléculas que podem promover toxicidade ao animal, dependendo de sua cinética e distribuição no organismo (ZEISEL, 1999). Portanto, não devem ser utilizados como forma eficaz de controle de doenças. Dessa forma, recomenda-se a utilização de medicamentos oriundos de plantas consideradas medicinais e a elucidação de biomoléculas ativas responsáveis pela atividade antiparasitária (HOSTE et al., 2008).

3.2 Plantas medicinais

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma planta medicinal é todo e qualquer espécime vegetal que possui substâncias terapêuticas ou que possam atuar como princípio ativo na síntese de fármacos. Tais substâncias devem estar presentes em um ou mais órgãos da planta (OMS, 2002). A utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, a fitoterapia, tem despertado grande interesse na área médica, mostrando-se bastante promissora também na medicina animal em avaliações de atividade antiparasitária (CHAGAS et al., 2008).

A validação de substâncias fitoterápicas como anti-helmínticas inicia-se com a obtenção de extratos provindos das plantas, com propriedades bioativas e com a realização de diversos testes qualitativos (HOSTE et al., 2011). Além dos fatores ambientais e das plantas selecionadas, deve-se considerar os fatores intrínsecos relacionados ao animal de interesse. Em se tratando especialmente dos ruminantes, o sistema ruminal desses animais pode influenciar na metabolização de substâncias vegetais administradas oralmente, de forma que compostos ativos que apresentaram bons resultados *in vitro* podem sofrer variações estruturais devido ao ambiente do rúmen, perdendo assim sua atividade *in vivo* (SANTOS et al., 2012). A pesquisa envolvendo plantas medicinais tem revelado essas plantas como fontes ricas em substâncias bioativas para o controle parasitário, apresentando-as como uma alternativa ao uso dos anti-helmínticos sintéticos utilizados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A boa análise na seleção de uma planta medicinal, o delineamento de protocolos adequados para obtenção de amostras que podem ser admi-

nistradas em animais (considerando a correta forma de administração e a definição de doses eficientes a serem empregadas), bem como a correta avaliação de atividade antiparasitária e de eficiência por testes adequados conduzem aos resultados confiáveis na validação de testes anti-helmínticos. Os resultados da eficácia desses experimentos devem ser aproveitados para orientar a escolha de plantas mais adequadas ao controle parasitário que se mostrem eficazes para a aplicação em animais ruminantes de produção, evidenciando a fitoterapia como uma alternativa segura e promissora no combate aos nematoides gastrintestinais que acometem esses animais.

REFERÊNCIAS

- ANTONIO, R. L. et al. Investigation of urban ethnoveterinary in three veterinary clinics at east zone of São Paulo city, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 183-190, 2015.
- BARROS, S.B.M., DAVINO, S.C. **Avaliação da toxicidade**. In: OGA, S. Fundamentos detoxicologia. São Paulo: Atheneu, 1996.
- BIZIMENYERA, E. S. et al. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond.(Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 336-343, 2006.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.
- CHAGAS, A.C.S. et al. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 68-73, 2008.
- CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. **Manual Prático**: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF. 153p. 2011.
- COLES, G. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 44, n. 1, p. 35-44, 1992.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary parasitology**, v. 170, p. 61-70, 2010.

EMBRAPA, NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; MOLENTO, M. B. (Ed.). **Determinação da Eficácia Anti- Helmíntica em Rebanhos Ovinos**: Metodologia da Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zossanitário. 2009. Disponível em: <www.cppse.embrapa.br/sites/default/files/principal/.../Documentos91.pdf>. Acesso em: 27 maio 2016.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, v. 139, p. 308-320, 2006.

GILL HS, WATSON DL, BRANDON MR. Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **Immunology**.78 v.1; 43-49, 1993.

FOSTER, H.; SMALL, D.; FOX, G. (Eds.). *The Mouse in Biomedical Research*. New York: **Academic Press**, 1983.

HOSTE, H.; TORRES- ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solution for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 144-154, 2011.

HOSTE, H. et al. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. **Tropical biomedicine**, v. 25, n. 1, p. 56-72, 2008.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Records**, v.130, p.442-446, 1992.

JACKSON, F.; HOSTE, H. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: VERCOE, P. E.; MAKAR, H. P. S.; SCHLINK, A. C. (Orgs). **In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies**. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2010. 247p.

MINHO, A.P.; GRANADA, R.L.; DOMINGUES, R. **Teste de inibição do desembainhamento larvar**. Rio Grande do Sul: EMBRAPA, 2014. 8p. (Comunicado Técnico 87).

McGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 559-574, 2008.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SAÚDE (OMS). **Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Genebra 2002. 67p. <Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf>. Acesso em: 26 maio 2016

ROJAS, D.K. et al. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in *Mongolian gerbils* (*Meriones unguiculatus*) and pelibuey lambs. **Veterinary Parasitology** v.128, p. 218-228, 2006.

SANDOVAL-CASTRO, C.A. et al. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. *Animal Feed Science and Technology*, v. 176, p. 192-201, 2012.

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) sobre nematódeos gastrointestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, p. 139-144, 2012.

SILVA, W. M. O.; SOUZA, G. F. X.; VIEIRA, P. B. Uso popular de plantas medicinais na promoção da saúde animal em assentamentos rurais de Seropédica-RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 32-36, 2013.

TAYLOR, M.A.; HURT, K.R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.183-94, 2002.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4.ed. JICA, 1998. 166p.

ZEISEL, S.H. Regulation of “nutraceuticals”. **Science**, v. 285, p. 1853-1855, 1999.