



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ZULIETE ALIONA ARAÚJO DE SOUZA FONSECA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE
Momordica charantia

MOSSORÓ-RN
2016

ZULIETE ALIONA ARAÚJO DE SOUZA FONSECA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE
*Momordica charantia***

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Doutora no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid - UFERSA

MOSSORÓ-RN
2016

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do(a) autor(a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data da defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu(a) respectivo(a) autor(a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ
Setor de Informação e Referência

F676a Fonseca, Zuliete Aliona Araújo de

Avaliação da toxicidade e atividade anti-helmíntica de Momordica charantia / Zuliete Aliona Araújo de Souza Fonseca. - Mossoró, 2016.
75f: il.

Orientador: Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid
Co-Orientador: Dr. Moacir Franco de Oliveira

Tese (DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

1. Ovinos. 2. Fitoterápico. 3. helmintose. I. Título

RN/UFERSA/BOT/010

CDD 636.2

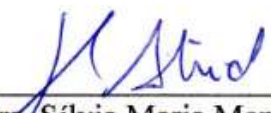
ZULIETE ALIONA ARAÚJO DE SOUZA FONSECA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE
*Momordica charantia***

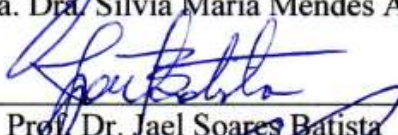
Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Doutora no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aprovada em: 23/02/2016

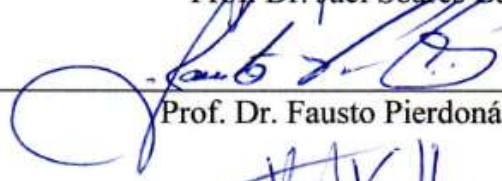
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid



Prof. Dr. Jael Soares Batista



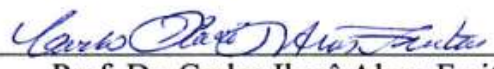
Prof. Dr. Fausto Pierdoná Gusen



Prof. Dr. José Ticiano Arruda Ximenes de Lima



Prof. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira



Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ZULIETE ALIONA ARAÚJO DE SOUZA FONSECA, filha de José Bernardino de Souza e Altemira Araújo de Souza, nasceu em 13 de julho de 1982, na cidade de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte. Concluiu o ensino médio no Escola Estadual Abel Freire Coelho, Mossoró. Ingressou, em 2004, no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), na cidade de Mossoró. Graduiu-se no ano 2009. Em março de 2010 concluiu a especialização em Saúde Coletiva pela Faculdade Integrada de Patos (FIP), no mesmo ano ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal em nível mestrado do Departamento de Ciências Animais da UFERSA, tendo como linha de pesquisa a Sanidade Animal e em 2012 obteve o título de mestre.

Ao meu querido esposo Silvio Jânio
Fonseca, pela infinita compreensão e
companheirismo ao longo dessa jornada;

A minha filha Lara Evelyn Araújo de
Souza Fonseca que fez meu mundo muito
mais apaixonante e tornou-se a razão do
meu viver.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e saúde para continuar lutando pelos meus sonhos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA);

A CAPES pelo apoio financeiro na concessão da bolsa durante a realização deste trabalho;

À profa. Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid, por sempre estar presente quando precisei e pela orientação e ensinamentos adquiridos;

Ao prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva que de forma muito compreensível esteve sempre pronto a escutar nossos problemas e a resolver da forma mais simples possível, sendo um excelente administrador a quem admiro muito;

Ao prof. Jael Soares Batista que sempre esteve a disposição para orientações e esclarecimentos em momentos ímprobo da minha pesquisa;

A profa. Selene Maia de Moraes por disponibilizar a equipe do Laboratório de Química da Universidade Estadual do Ceará (UECE), na realização do teste fitoquímico;

A profa. Michelline do Vale Marciel pela ideia inicial da minha pesquisa e pela disponibilidade quando precisei;

Ao prof. Dr. Wesley Adson Costa Coelho da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança (FACENE) Mossoró, pelas análises estatísticas;

Ao prof. Dr. Haroldo Bezerra Paula responsável pelo laboratório de química de polímeros da UFC pela disponibilidade e atenção quando solicitado;

A minha amiga Muriel Pimentel, pela amizade construída e pela ajuda na coleta e processamento de hematológico;

A minha amiga Ivana Cristina Gadelha, que sempre estar disposta a ajudar quando preciso, e a quem agradeço pelo ensinamento na produção das lâminas histológicas;

Ao meu Amigo Weibson Paz Pinheiro André pela ajuda na execução e orientação metodológica;

A Wesley Lieverton Ribeiro que tanto admiro, agradeço a imensa ajuda e esclarecimentos fornecidos durante a realização da minha pesquisa;

Aos meus pais Altemira Araújo de Souza e José Bernardino de Souza que sempre estiveram ao meu lado sendo minha sustentação;

A minha vó Erenita Dantas de Araújo (*in memoriam*) que mesmo ausente estar ao meu lado em oração;

A minha tia Elena Dantas que considero minha segunda mãe e estar sempre disposta a ajudar e dar conselhos em momentos difíceis;

Aos meus irmãos Zana Andréia Araújo de Souza Queiroz; Zilka Adriana Araújo de Souza e Zildeirton André Araújo de Souza que amo;

À minha família que é a base de tudo, e estar sempre ao meu lado em momentos bons e ruim, apoiando minhas decisões;

Aos colegas do laboratório pela companhia e ajuda na realização dos experimentos, em especial a Guilherme Moniz Sodré Lopes Teixeira, Kaliane Alessandra Rodrigues de Paiva, Janilene de Oliveira Nascimento, Hilgarde Ferreira Pessoa e Josivânia Soares Pereira;

A Gleidson Benevides que ao longo dessa jornada acadêmica foi sempre amigo a qualquer momento;

Ao produtor Erivam Bezerra da Costa pela disponibilidade dos animais do sítio camorim em Governador Dix-sept Rosado para avaliação da eficácia do extrato testado;

As amigadas construídas durante o Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA;

Enfim, a todos que direta e indiretamente contribuíram para execução e conclusão deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE *Momordica charantia*

FONSECA, Zuliete Aliona Araújo de Souza. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE *Momordica charantia***. 2016. 76f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró - RN, Brasil, 2016.

RESUMO: Nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes causam patologias graves e são uma das principais causas de perdas econômicas para criação de ovinos e caprinos, principalmente em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo. No entanto, o desenvolvimento de métodos sustentáveis, ambientalmente aceitáveis de controle de nematóides tornou-se um estudo necessário. Objetivando avaliar a ação anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* (EHMC) no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos foi realizado teste de eclosão de ovos (TEO), teste de desenvolvimento larvar (TDL), assim como testes de toxicidade e teste de redução de contagem de ovos nas fezes (FECRT). Para avaliação da eficácia anti-helmíntica *in vitro* os testes TEO e TDL foram realizados utilizando EHMC nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,3; 0,7 e 1,5 mg ml⁻¹ sobre ovos e larvas de *Haemonchus contortus*, já para o teste de toxicidade foram utilizados camundongos Balb/c agrupados aleatoriamente (n=12), com base nos tratamentos: 4000 (G1), 6000 (G2), 8000 (G3), 10.000 mg kg⁻¹ (G4) e grupo controle (G5), administrados por gavagem e mantidos em observação durante 14 dias. Para avaliar a ação anti-helmíntica *in vivo*, 50 ovinos infectados naturalmente foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n=10 por grupo): G1 (grupo controle), G2 tratado com 350 mg kg⁻¹ EHMC, G3 com 5 mg kg⁻¹ de Levamisol, G4 com 0,2 mg kg⁻¹ de Ivermectina, G5 com 10 mg kg⁻¹ de Albendazol. A eficácia no controle de nematóides gastrintestinais foi avaliada 7, 14 e 21 dias pós-tratamento para o cálculo do teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT). Nos testes *in vitro* o EHMC mostrou eficácia elevada reduzindo 98,81% a eclosão de ovos e 99,61% o desenvolvimento de larvas de *H. contortus* na dose de 1,5 mg ml⁻¹. Para o teste de toxicidade aguda, o EHMC não produziu sinais de toxicidade ou morte na concentração de 4000 mg kg⁻¹, mostrando que doses abaixo do valor referido são consideradas seguras para utilização em ovinos infectados naturalmente. A redução no OPG observada no FECRT em ovinos foi de 57% e 56% para EHMC, 93% e 74% para Levamisol nos dias 7 e 14 pós-tratamento, respectivamente. No dia 14 pós-tratamento, não houve diferença significativa entre EHMC e Levamisol (p<0,05), ocorrendo redução de 54% e 69% da excreção de ovos do gênero *Haemonchus* e *Trichostrongylus* respectivamente no grupo tratado com EHMC no mesmo período. Concluímos que o EHMC mostrou efeito anti-helmíntico significativo *in vitro* e *in vivo*, constituindo uma alternativa para o controle de nematóides gastrintestinais em ovinos.

Palavras-chave: Fitoterápico, Helmintose, Ovinos, *Haemonchus contortus*

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE *Momordica charantia*

FONSECA, Zuliete Aliona Araújo de Souza. **Evaluation of toxicity and anthelmintic activity of *Momordica charantia***. 2016. 76f. Thesis (Master's degree In Animal Science) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró - RN, Brazil, in 2016.

ABSTRACT - Gastrointestinal nematodes of small ruminants cause severe pathology and are a major cause of economic losses in sheep and goat farming, particularly in tropical and subtropical areas worldwide. Therefore, the development of sustainable, environmentally acceptable methods of nematode control has become a necessity. To evaluate the anthelmintic action of hydroalcoholic extract of *Momordica charantia* (EHMC) in the control of gastrointestinal nematodes of sheep, the egg hatch test (EHT), larval development test (LDT), and toxicity test using mices Balb/c and reduced eggs count in the feces (FECRT), were conducted. To evaluate the anthelmintic efficacy *in vitro*, TEO and TDL tests were conducted using EHMC at concentrations of 0.05; 0.1; 0.3; 0.7; 1.5 mg ml⁻¹ on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. For the toxicity tests, Balb/c mice were randomly divided in groups (n = 12), based on the following treatments: 4.000 (G1), 6.000 (G2), 8.000 (G3), 10.000 mg.kg⁻¹ (G4) and control group (G5), administered by gavage and observed for 14 days. To evaluate the anthelmintic action *in vivo*, 50 sheep naturally infected were randomly divided into five groups (n=10 per group) where: G1 was the control group, G2 was treated with 350 mg kg⁻¹ EHMC, G3 with 7.5 mg kg⁻¹ of Levamisole, G4 with 0.2 mg.kg⁻¹ of Ivermectina and G5 with 10 mg.kg⁻¹ of Albendazol. The efficacy on the control of gastrointestinal nematodes was valued 7, 14 and 21 days after treatment for the calculation of the fecal egg count reduction test (FECRT). In the *in vitro* tests, the EHMC turned out to be very effective by reducing 98.81% of the hatching eggs and the development 99.61% of *H. contortus* larvae in the dose of 1.5 mg.ml⁻¹. In the acute toxicity test, the EHMC produced no signs of toxicity or death at a concentration of 4.000 mg kg⁻¹, showing that doses below that value are considered safe for use in sheep naturally infected. In the FECRT, the reduction in OPG in sheep was 57% and 56% for EHMC, 93% and 74% for levamisole on days 7 and 14 after treatment, respectively. On day 14 after treatment, there was no significant difference between EHMC and levamisole (p<0.05), there was a reduction of 54% and 69% of excretion of eggs of *Haemonchus* and *Trichostrongylus* respectively in the group treated with EHMC in the same period. We conclude that the hydroalcoholic extract of *M. charantia* showed significant anthelmintic effect *in vitro* and *in vivo*, providing an alternative for the control of gastrointestinal nematodes in sheep.

Keywords: Herbal medicine, Helminths, Sheep, *Haemonchus contortus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Momordica charantia*: A. Material vegetal observado a campo com flor e fruto; B. Exsicata produzida para identificação botânica 32

Figura 2 - Processamento da amostra vegetal e obtenção do extrato de *Momordica charantia*: A. Secagem em estufa de circulação forçada; B. Trituração manual do material foliar seco; C. Retirada dos resíduos sólidos; D. Filtração em algodão; E. Evaporação em banho maria a 65°C; F. Extrato bruto concentrado 33

Figura 3 - Estágios evolutivos de *Haemonchus contortus* usados como referência para diferenciação no teste de eclosão de ovos, mostrando ovo (A) e larva L1 (B) observado em objetiva de 10X 35

Figura 4 - Teste de desenvolvimento larvar: A. Incubação das amostras em placas de 24 poços; B. Larvas de terceiro estágio observadas após sete dias de incubação 36

Figura 5 - Etapas do teste de redução de contagem de ovos nas fezes: A. Rebanho ovino sem raça definida; B. Pastagem de capim tanzânia irrigada disponível para o rebanho durante o experimento; C. Coleta de fezes diretamente da ampola retal; D. Administração das drogas a serem avaliadas 38

Figura 6 - Necropsia realizada 3 dias após ingestão de EHMC: A. Camundongo do grupo controle com aparência intestinal normal; B. Camundongo Balb/c que recebeu dose de 10.000 mg kg⁻¹ apresentando congestão intestinal 45

Figura 7 - Cavidade abdominal de camundongo Balb/c, enfatizando hemorragia petequial na cápsula hepática, em camundongo Balb/c que recebeu dose de 10.000 mg kg⁻¹ 7 dias pós administração de EHMC 45

Figura 8 - Necropsia de camundongos Balb/c eutanasiados 14 dias pós ingestão de 10.000 mg kg⁻¹ EHMC: A. Camundongo com fígado de aparência normal; B. Camundongo com fígado apresentando congestão hepática 46

Figura 9 - Alteração macroscópica no fígado, apresentando lesão hepática com proliferação de origem fibrosa em camundongo que recebeu dose de 10.000 mg kg⁻¹ 14 dias pós tratamento com EHMC 46

Figura 10 - Aspecto histológico por microscopia óptica do rim em camundongos do grupo G4: A. Áreas de congestão renal; B. Degeneração hidrópica (seta preta) com áreas de descamação do epitélio tubular (seta vermelha). Objetiva 100X (A) e 40X (B) 49

Figura 11 - Estudo histopatológico por microscopia óptica do fígado em animais do grupo G4: A. Congestão das veias centrolobular; B. Hepatócitos com núcleo aumentado 49

Figura 12 - Estudo histopatológico por microscopia óptica do fígado em camundongos do grupo G5: A. Infiltrado inflamatório mononuclear; B. Degeneração de hepatócitos; C. Áreas de necrose (áreas claras). Objetiva 40X (A, B) e 100X (C) 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais com doses avaliadas e médias de peso dos camundongos Balb/c selecionados para o teste de toxicidade aguda utilizando extrato de <i>Momordica charantia</i>	37
Tabela 2 - Grupos experimentais adotados para o Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes realizado em ovinos naturalmente infectados	39
Tabela 3 - Composição química do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Momordica charantia</i>	40
Tabela 4 - Percentual de eficácia média $\pm$ erro padrão (E.P.) do extrato hidroalcoólico de <i>Momordica charantia</i> em diferentes concentrações na inibição da eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i>	42
Tabela 5 - Percentual de eficácia média $\pm$ erro padrão (E.P.) do extrato hidroalcoólico de <i>Momordica charantia</i> em diferentes concentrações na inibição do desenvolvimento larvar de <i>Haemonchus contortus</i>	42
Tabela 6 - Alterações histológicas renais e hepáticas encontradas em camundongos Balb/c tratados com extrato hidroalcoólico de <i>Momordica charantia</i> com 3, 7 e 14 dias pós administração	48
Tabela 7 - Valores de média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros hematológicos de camundongos Balb/c tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Momordica charantia</i> em dose única por via oral 3, 7 e 14 dias pós tratamento	51
Tabela 8 - Valores de média $\pm$ desvio padrão do leucograma de camundongos Balb/c tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Momordica charantia</i> em dose única por via oral 3, 7 e 14 dias pós tratamento	52
Tabela 9 - Valores de média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos de camundongos Balb/c tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Momordica charantia</i> em dose única por via oral 3, 7 e 14 dias pós tratamento	54
Tabela 10 - OPG médio e percentual de redução (%) da contagem de ovos nas fezes de ovinos naturalmente infectados tratados com EHMC comparado com o Levamisol, Ivermectina e Albendazol	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 HELMINTOSES EM OVINOS	18
3.1.1 Parasitismo por <i>Haemonchus contortus</i>	18
3.1.1.1 Patogenicidade do <i>Haemonchus contortus</i>	19
3.2 CONTROLE DAS HELMINTOSES	19
3.2.1 Benzimidazóis	20
3.2.2 Imidazotiazóis	20
3.2.3 Lactonas Macrocíclicas	20
3.2.4 Monepantel	21
3.3 CONTROLE FITOTERÁPICO DAS HELMINTOSES	21
3.3.1 Fitoterapia como alternativa de controle	21
3.3.2 Plantas medicinais	22
3.3.2.1 Atividade anti-helmíntica de fitoterápico	23
3.3.2.2 <i>Momordica charantia</i>	24
3.3.2.3 Potencial anti-helmíntico de <i>Momordica charantia</i>	25
3.3.2.4 Estudo investigativo de fitoterápico	25
3.3.2.5 Teste de toxicidade com fitoterápicos	26
3.4 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA	27
3.4.1 Testes <i>in vitro</i>	28
3.4.1.1 Teste de eclosão de ovos	28
3.4.1.2 Teste de desenvolvimento larvar	29
3.4.2 Teste <i>in vivo</i>	30
3.4.2.1 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (FECRT)	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	32
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS VEGETAIS	32
4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA	33
4.4 TESTES <i>IN VITRO</i>	34
4.4.1 Coleta do material fecal	34
4.4.2 Recuperação dos ovos	34
4.4.3 Teste de eclosão de ovos (TEO)	34
4.4.4 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)	35
4.4.4.1 Teste laboratorial	35
4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EHMC	36
4.6 TESTE <i>IN VIVO</i>	37
4.6.1 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes	37
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO	40

5.2 TESTES <i>IN VITRO</i>	41
5.3 TESTE DE TOXICIDADE	43
5.3.1 Alterações Histopatológicas	47
5.3.2 Alterações Hematológicas e Bioquímicas	50
5.4 TESTE DE REDUÇÃO DE CONTAGEM DE OVOS NAS FEZES ...	55
 6 CONCLUSÕES	 59
 REFERÊNCIAS	 60
 ANEXOS	 74

1 INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura é uma atividade socioeconômica bastante explorada no Brasil, principalmente no Nordeste, constituindo importante fonte de renda para região, no entanto, sua rentabilidade é limitada por fatores nutricionais, sanitários e de manejo, sendo as helmintoses gastrintestinais principais responsáveis por perdas econômicas para o setor (VERÍSSIMO et al., 2012; VIEIRA et al., 2014).

Haemonchus contortus é o principal endoparasita de pequenos ruminantes em regiões tropicais e subtropicais, promovendo perda de peso, anemia e até mesmo a morte de animais susceptíveis (FORTES et al., 2013). Seu controle é realizado principalmente com uso de anti-helmínticos (AH) administrados muitas vezes de forma inadequada, desenvolvendo populações resistentes (SANTOS et al., 2012), além de contaminar produtos de origem animal e o meio ambiente, elevando os custos de produção (VIEIRA, 2008; KUNSA; ABEBE 2009).

A resistência anti-helmíntica constitui um problema mundial na criação de ovinos, dessa forma a busca por novos AH é extremamente necessário, no intuito de controlar a infecção por nematóides multi-resistentes em áreas onde AH clássicos não são mais eficazes, assim como prevenir o alastramento da resistência em áreas em que o problema não é tão grave (KAMINSKY et al., 2011). Uma das drogas anti-helmínticas mais recente derivada da amino-acetonitrila lançadas em 2009 foi o Monepantel, desenvolvida como anti-helmíntico para ovinos comercializado como Zolvix® (KAMINSKY et al., 2008a, b), no entanto estudos já demonstram resistência de *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* e *H. contortus* a essa droga (SCOTT et al., 2013; BROM et al., 2015)

Dessa forma, o uso convencional de anti-helmínticos sintéticos está sendo gradativamente substituída ou associada à busca por abordagens alternativas que ofereçam a perspectiva de não apenas reduzir a dependência da quimioprofilaxia, mas ao fazê-lo, ajudar a manter a eficácia dos atuais anti-helmínticos (CEZAR et al., 2008; VIEIRA, 2008; FRED-JAIYESIMI et al., 2011), tornando-se necessário o desenvolvimento de estudos que visem buscar alternativas complementares aos métodos tradicionais (ADEMOLA; ELOFF, 2010).

A fitoterapia constitui uma abordagem alternativa no controle endoparasitário de pequenos ruminantes, desempenhando um papel importante, ao serem associadas a outros métodos, promovendo o controle sustentável das infecções por nematóides gastrintestinais, tendo como vantagens que justificam seu uso a ação sinérgica de vários compostos anti-helmínticos com efeitos similares e que juntos, mesmo em baixas concentrações atuam

aumentando a eficácia, além de constituir matéria biodegradável e apresentarem suprimento autossustentável devido à diversidade da flora medicinal (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008; MAX et al., 2010).

Momordica charantia (Cucurbitaceae) é uma planta frequentemente encontrada em países de clima tropical e subtropical incluindo o Brasil. Folhas, frutos e sementes são usados como anti-helmíntico em diferentes sistemas medicinais tradicionais (PAUL; RAYCHAUDHURI, 2010; KUMAR et al., 2010), no entanto estudos demonstram ação contra diferentes patologias, incluindo atividade antitumoral hipoglicêmica (SHETTY et al., 2005), antibacteriana (MWAMBETE et al., 2009), cicatrizante (PRASHANTHI et al., 2012), anti-oxidante (HAMISSOU et al., 2013), antidepressivo e ansiolítico (ISHOLA et al., 2014), usado principalmente em áreas rurais para controle endoparasitário de pequenos ruminantes.

Estudos de eficácia anti-helmíntica de *M. charantia* contra nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes são escassos, dessa forma, objetivou-se investigar o potencial anti-helmíntico *in vitro* e *in vivo* possibilitando ao produtor uma alternativa não química para o controle de nematóides, diminuindo os resíduos ambientais e em produtos de origem animal, assim como reduzir os custos com a aquisição de anti-helmínticos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar a ação anti-helmíntica e análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de folhas de *Momordica charantia* e sua ação anti-helmíntica em ovinos.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar os constituintes por meio de análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *M. charantia*;
- b) Avaliar *in vitro* a atividade ovicida e larvicida de *M. charantia* sobre ovos e larvas de *Haemonchus contortus*;
- c) Analisar a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *M. charantia* em camundongos Balb/c estimando a dose a ser utilizada em ovinos;
- d) Avaliar *in vivo* a atividade anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico de *M. charantia* em ovinos naturalmente infectados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HELMINTOSES EM OVINOS

A ovinocaprinocultura é considerada uma atividade bastante explorada no nordeste brasileiro, fornecendo carne e leite à população e, portanto, estimulada para melhorar as condições nutricionais das comunidades de baixa renda, no entanto infecções por nematóides gastrintestinais apresentam fator limitante a produção constituindo principal problema sanitário (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008; LÔBO et al., 2009).

As endoparasitoses gastrintestinais afetam todas as faixas etárias, com maior severidade em animais jovens, sendo responsáveis por inúmeros prejuízos como doenças subclínicas, retardo no crescimento, diminuição na produção de leite e carne, e em alguns casos provocam altas taxas de mortalidade em decorrência de infecções elevadas por diferentes gêneros de nematóides, constituindo infecções múltiplas (BRITO JÚNIOR et al., 2011; VERRÍSIMO et al., 2012).

Os pequenos ruminantes são acometidos por nematóides dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Cooperia*, *Bunostomum*, *Trichuris*, *Skrjabinema* e *Oesophagostomum*. (VIEIRA et al., 1998), com 80% da carga parasitária constituída de *H. contortus*, nematóide mais frequente e patogênico de pequenos ruminantes na região nordeste do Brasil (AROSEMENA et al., 1999; MATTOS et al., 2005).

No Rio Grande do Norte, Ahid et al. (2008), atribuíram a maior prevalência para *Strongyloides* sp. (62,3%), *Haemonchus* sp. (16,9%) *Trichostrongylus* sp. (12%) e *Oesophagostomum* sp. (9%). Já para Souza et al. (2012) descreveram além dos gêneros citados acima *Cooperia pectinata*, *Cooperia punctata* e *Skrjabinema ovis* parasitando ovinos no município de Lajes-RN, com frequência de 82,57% para *H. contortus*.

3.1.1 Parasitismo por *Haemonchus contortus*

H. contortus é um parasita hematófago frequentemente encontrado em pequenos ruminantes, seu ciclo é direto e envolve uma fase de vida livre no meio ambiente e outra parasitária no hospedeiro (YOSHIHARA et al., 2013). Quando adulto consome cerca de 0,05 a 0,08ml de sangue/dia, promovendo lesões no abomaso e hemorragias em decorrência da secreção de substâncias anticoagulantes, capaz de impedir a formação da rede de fibrina estabelecendo um quadro clínico de parasitismo (TAYLOR et al., 2002).

O parasitismo por *H. contortus* ocorre principalmente em pequenos ruminantes com idade inferior a um ano, ou fêmeas em estágio gestacional que permite condições favoráveis de sobrevivência do parasita, eliminando grande quantidade de ovos nas fezes desde as duas semanas anterior até dois meses após o parto, promovendo grande quantidade de larvas infectantes no pasto e consequente contaminação da nova população de hospedeiros suscetíveis (CLIMENI et al., 2008; COSTA et al., 2011).

3.1.1.1 Patogenicidade do *Haemonchus contortus*

H. contortus constitui o parasito mais patogênico para ovinos e caprinos em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, inclusive no Brasil e representa a espécie mais dominante em termos de intensidade de infecção, sendo o maior responsável pelo rápido desenvolvimento da resistência em nematóides de pequenos ruminantes, por esse motivo, estudos de eficácia das drogas anti-helmíntica são realizados frequentemente com essa espécie (SAULAI et al., 2001; ACHI et al., 2003).

As perdas econômicas causadas pelo parasitismo por *H. contortus* deve-se principalmente a dificuldade de controle do parasito, assim como sua grande prolificidade; devido a informações insuficientes ou mesmo inadequadas sobre a frequência de tratamentos e a utilização correta de drogas antiparasitárias em ruminantes, que em decorrência de graves problemas ocasionados no rebanho necessita de um controle eficiente com associações de tratamento e condições ambientais, reduzindo a infecção e elevando a imunidade animal (COSTA et al., 2011).

Na região semiárida além do *H. contortus* ser o parasita mais frequente é o único descrito como responsável pela ocorrência de surtos de helmintoses gastrintestinais, portanto o controle de nematóides gastrintestinais no semiárido deve ser baseado principalmente no controle de *H. contortus* (COSTA et al., 2009).

3.2 CONTROLE DAS HELMINTOSES

O controle da infecção por nematóides gastrintestinais depende principalmente do tratamento com agentes anti-helmínticos, no entanto aliados a falha de manejo constituem os principais responsáveis pelo crescente aparecimento e propagação de populações de nematóides resistentes aos medicamentos. Até há pouco tempo, apenas três grandes classes de anti-helmínticos têm estado disponíveis: os benzimidazóis (tiabendazol), imidazotiazóis

(levamisole), e lactonas macrocíclicas (ivermectina) (ALMEIDA et al., 2010; VIEIRA et al., 2010).

3.2.1 Benzimidazóis

Os benzimidazóis, entre eles o Albendazol, apresentam baixa toxicidade com ação sobre uma grande quantidade de nematóides, promovendo perda de equilíbrio celular e inibição da enzima fumarato redutase que agem no transporte de glicose, alterando o mecanismo energético do parasito levando a morte do nematódeo. Atua também como agente ovicida, com ação no útero dos nematóides impedindo o desenvolvimento dos ovos eliminados, no entanto, o uso desse princípio em fêmeas de ruminantes gestantes é contraindicado, pois é considerado teratogênico (LACEY, 1988; LANUSSE, 1996; LANUSSE et al., 2009; KŘÍZOVÁ-FORSTOVÁ et al., 2011).

3.2.2 Imidazotiazóis

A principal característica dos imidazotiazóis é a abertura dos canais de sódio sensíveis à nicotina das células nervosas e musculares dos parasitos, permitindo entrada de sódio na célula aferente ao estímulo e resultando em intensa contração muscular, facilitando a eliminação pelo organismo hospedeiro (MARTIN, 1997).

A atividade dos imidazotiazóis leva a inanição do verme e consequentemente a sua morte, pois a ação destes compostos sobre os receptores musculares nicotínicos da acetilcolina causa paralisia espasmódica nos nematóides (SANGSTER et al., 2005).

3.2.3 Lactonas Macrocíclicas

As lactonas Macrocíclicas bloqueiam a transmissão dos estímulos neurais aos músculos resultando em paralisia flácida seguida de morte ou expulsão do parasito (ADAMS, 2003). São endectocidas bastante utilizados em caprinos, com destaque para as avermectinas clássicas como: abamectina, doramectina, eprinomectina e ivermectina, derivadas da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis*, atuando sob os estágios adultos e em desenvolvimento de nematóides gastrintestinais (LANUSSE et al., 2009). Além disso, estes compostos causam efeitos inibidores no trato reprodutivo das fêmeas reduzindo a postura de ovos (FELLOWES et al., 2000).

3.2.4 Monepantel

O Monepantel foi uma droga recém descoberta capaz de controlar as infecções de nematóides resistentes a todos os anti-helmínticos clássicos (KAMINSKY et al., 2008). Porém para manter sua eficácia por um longo período, é necessário a continuidade de pesquisas e a adoção de alternativas de forma integrada, que reduzam ou eliminem a dependência por compostos químicos, sejam de baixo custo e menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (VIEIRA et al., 2010), inibindo o aparecimento da resistência anti-helmíntica a esse princípio ativo.

3.3 CONTROLE FITOTERÁPICO DAS HELMINTOSES

3.3.1 Fitoterapia como alternativa de controle

Atualmente, o controle alternativo de nematóides gastrintestinais é realizado através do método FAMACHA associado a estratégias de manejo e do uso de anti-helmínticos. Na região do semiárido o controle é basicamente baseado no uso de anti-helmínticos, no entanto a utilização indiscriminada dessas drogas teve como consequência à seleção de populações de helmintos com resistência aos diferentes grupos químicos utilizados no tratamento dos animais. Esta situação tornou-se grave especialmente nas criações de pequenos ruminantes, onde ocorre resistência a todos os grupos de anti-helmínticos de amplo espectro de ação (TAYLOR et al., 2002).

Diversas estratégias têm sido estudadas no sentido de promover métodos que auxiliem no controle dos nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Desta forma, o controle integrado de parasitos constitui a adoção combinada de métodos que utilizam anti-helmínticos com métodos que não utilizam estes produtos, com a finalidade de manter níveis aceitáveis de infecção de forma a não promover perdas para a produção animal (VIEIRA, 2003). Além disso, o uso inadequado e exagerado de vermífugos fez emergir o problema da ecotoxicidade e a liberação de resíduos em produto e subproduto animal, determinando efetivamente o rumo atual das pesquisas científicas na área da parasitologia (CHAGAS, 2004).

Dentre as muitas alternativas que vêm sendo pesquisadas para o controle de nematóides gastrintestinais, podemos citar o estudo com plantas medicinais, indicando

caminho promissor para o desenvolvimento de extratos que podem ser usados comercialmente (ELOFF et al., 2010). A Organização Mundial de Saúde estima que 25% dos medicamentos modernos são oriundos de plantas, além disso, a aceitação do mercado consumidor por alimentos orgânicos ou naturais e o aumento do consumo destes produtos têm reforçado o interesse pela busca de alternativas não químicas para o controle das diversas doenças em animais de produção, tendo como foco principal as helmintoses (LEIMANN, 2009).

Segundo a Regulamentação da Produção Animal Orgânica, devem ser empregadas as terapêuticas homeopática, fitoterápica e a acupuntura, sendo restrito o uso de produtos químico de síntese na produção animais orgânicos (BRASIL, 2003; REPAB, 2007). Entre as vantagens do emprego da fitoterapia, destacam-se os aspectos econômicos e a possibilidade da administração do princípio ativo sob a forma de pastagem (VILLALBA et al., 2010).

3.3.2 Plantas medicinais

A vulnerabilidade dos produtos químicos diante da capacidade de sobrevivência dos parasitas faz com que eles tenham tempo de uso pré-determinado, já a aplicação de extratos vegetais promove desenvolvimento mais lento da resistência, além de normalmente atingir somente espécie alvo, serem biodegradáveis, não causarem a poluição ambiental e diminuir drasticamente o problema dos resíduos (CHAGAS, 2004). O uso de fitoterápicos destaca-se também devido à grande variabilidade de espécies de plantas existentes, o baixo custo e a fácil disponibilidade em determinadas regiões (HEIMERDINGER et al., 2006).

Diversas doenças têm sido alvos de pesquisas que envolvem plantas, muitas destas afetam os animais de produção, com destaque para os nematóides gastrintestinais, considerados como uma das principais causas de redução na produtividade de ruminantes em todo o mundo (VIEIRA, 2008). Estudo com fitoterápicos têm atestado a ação de plantas, mas ao mesmo tempo demonstram reações tóxicas no organismo hospedeiro. A relação entre ação da planta, doses com ação significativa e efeito tóxico, deve ser muito bem investigada, para que os conhecimentos possam ser passados de maneira clara no momento da utilização prática do fitoterápico, tornando-se essencial a realização de teste laboratorial, no sentido de determinar seus princípios ativos e estimar a possibilidade de uso de determinado fitoterápico (CHAGAS, 2004).

Os fitoterápicos apresentam inúmeros constituintes que estão sendo pesquisados com potencial anti-helmíntico, entre os princípios ativos pesquisados estão os ácidos

orgânicos, alcalóides, cumarinas, flavonóides, óleos essenciais, compostos fenólicos antraquinonas, saponinas e os taninos apresentando resultados promissores no controle de nematóides em pequenos ruminantes. Outro grupamento bioquímico com potencial são as proteínas, como as lecitinas; metabólitos que podem conferir propriedades contra parasitos gastrintestinais, através da interrupção do desenvolvimento larvar em todo o seu ciclo de vida, proporcionar uma alternativa útil para as estratégias de controle (FERRO, 2008; NERY et al., 2009).

3.3.2.1 Atividade anti-helmíntica de fitoterápico

Com o objetivo de contribuir para um controle alternativo efetivo de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes, várias pesquisas têm dado especial atenção à medicina etnoveterinária, ao fazer uso de plantas usadas na medicina popular, avaliando seus princípios, eficácia e nível segurança (MONTEIRO et al., 2011).

Componentes bioativos de plantas podem ter ação nas diferentes fases de vida de nematóides gastrintestinais, podendo atuar desde a redução na eclosão de ovos até a fecundidade do parasito (HOSTE et al., 2006), na motilidade, no desenvolvimento e desembainhamento larvar, culminando na diminuição da infecção em pequenos ruminantes e da contaminação no pasto (HERNÁNDEZ-VILLEGAS et al., 2012).

Duas abordagens têm sido empregadas para avaliar o efeito anti-helmíntico dos fitoterápicos: a preparação de produtos (extratos, óleos essenciais ou substâncias isoladas) e o fornecimento de plantas *in natura* aos animais com infecção experimental ou natural (ATHANASIADOU et al., 2007). Segundo recomendações da World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) os fitoterápicos podem ser classificados de acordo com a seu efeito de ação, como altamente eficaz com 98% de eficiência, eficaz (90-98%), moderadamente eficaz (80-89%) ou insuficientemente ativo com menos de 80% (WOOD et al., 1995). As diferenças nas eficácias dos produtos ocorrem devido as variações de composições químicas dos fitoterápicos (AL-ROFAAI et al., 2012).

A alternativa da utilização de plantas pode ser uma ferramenta útil associada a outros métodos para controlar nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes, tendo seu uso justificado mesmo com eficácia inferior a 95% em situações onde anti-helmínticos sintéticos não são recomendados, como na pecuária orgânica, produção leiteira, ou quando o custo não é compensatório (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008). Desta forma, plantas com moderada atividade anti-helmíntica devem ser consideradas, pois podem permitir uma

abordagem integrada, especificamente desenhada para alcançar um controle sustentável de parasitos em sistemas de produção de ruminantes (GITHIORI et al., 2006).

Tradicionalmente muitas plantas são conhecidas como possuidoras de atividade anti-helmíntica, necessitando que sua eficácia seja cientificamente comprovada (VIEIRA, 2007). Desse modo, na tentativa de contribuir para um controle alternativo efetivo de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes, vários pesquisadores têm se empenhado em testar plantas usadas na medicina popular avaliando sua eficácia e segurança, entre estas podemos destacar a *Momordica charantia*.

3.3.2.2 *Momordica charantia*

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae) vulgarmente conhecida como melão de são caetano, melão amargo, balsamo pêra, karela, cabaço amargo ou abobora amarga é um vegetal indígena de áreas tropicais, incluindo a Índia, China, Japão, Ásia, África e América do Sul, encontrado com facilidade em muitas regiões brasileiras (NEE, 2007; BRACA et al., 2008).

É uma trepadeira de folhas verdes de bordas irregulares, aparentemente mordidas, por isso o nome *Momordica* que significa “morder”, apresenta flores amarelas, o fruto é oblongo e verde esmeralda quando jovem e amarelo alaranjado quando maduro, é cultivada em todo o mundo e normalmente utilizada como alimento e planta medicinal nos países em desenvolvimento como Brasil, China, Colômbia, Cuba, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Perú, estimando o uso da medicina tradicional por 80% da população em problemas médicos primários (GROVER; YADAV, 2004).

Utilizado contra aproximadamente 30 doenças, *M. charantia* possui mais de 60 propriedades medicinais, seu fruto é altamente valorizado por ser antidiabético, hepatoprotetor, antirreumatismo e antimicrobiano. Folhas da planta são usadas para tratamento da hanseníase, icterícia, tosse e dor torácica em crianças. As sementes têm sido consideradas como redutora de gordura e diabetes, já os brotos são usados para tratamento da pneumonia e leucorréia, enquanto as raízes possuem atividades abortivas (BATRAN et al., 2006; SURESH et al., 2008; PAUL, 2010).

Estudos biológicos demonstram que todas as partes da planta possuem atividades incluindo propriedades antitumoral (JILKA et al., 1983), imunomodulador (CUNNICK et al., 1990), anti-HIV (LEE HUANG et al., 1995), antidiabético (VIRDI et al., 2003; SHETTY et al., 2005), anti-obesidade (CHAN et al., 2005), antifúngica (SCHMOURLO et al., 2005),

anti-hiperlipidêmico (CHEN; LI, 2005), antiulcerativo (ALAMA et al., 2009), anti-bacteriano (MWAMBETE, 2009; COSTA et al., 2011), analgésico e antipirético (PATEL et al., 2010), hepatoprotetor (PEREIRA et al., 2010), anti-oxidante (THENMOZHI et al., 2011; HAMISSOU et al., 2013), inseticida (SUBRAMANIAM et al., 2012), anticancerígeno (PITCHAKARN et al., 2011; HUSSAIN et al., 2013), antiviral (PONGTHANAPISITH et al., 2013), antidepressivo e ansiolítico (ISHOLA et al., 2014), anti-fertilidade (ADEWALE et al., 2014), cicatrizante (ADEWALE et al., 2014), e anti-helmíntico (CORDEIRO et al., 2010; GOMES et al., 2010; SEN et al., 2014).

3.3.2.3 Potencial anti-helmíntico de *Momordica charantia*

Potencial anti-helmíntico de diferentes partes de *M. charantia* incluindo frutos, folhas e sementes foram descritos com atividade contra *Ascaridia galli* (SHAHADAT et al., 2008), *Ascaris suum* (TJOKROPANOTO; NATHANIA, 2011), nematóides de vida livre (DAS et al., 2006) e *H. contortus* (AMIN et al., 2009).

Estudo da atividade anti-helmíntica das folhas de *M. charantia* sugere que os glicosídeos triterpenos, bem como mormodinas I e II sejam os principais agentes nematicidas (BELOIN et al., 2005). Avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico de *M. charantia*, demonstraram que a aderência do extrato às larvas dos parasitos, impede a motilidade e a alimentação, resultando em estresse energético e consequente morte do parasito (GOMES et al., 2010).

3.3.2.4 Estudo investigativo de fitoterápico

Diversos fitoterápicos com suposta ação anti-helmíntica têm sido testados cientificamente com resultados promissores, merecendo desta forma, indicação para avaliação mais detalhada quanto ao seu potencial anti-helmíntico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, entretanto, para aceitação de uma planta pela medicina científica, é necessário que a eficácia seja avaliada e confirmada, assim como deve ser garantida que sua administração a organismos vivos ocorra sem riscos para saúde através do processo de validação científica (McGAW; ELOFF, 2008).

A primeira etapa no processo de validação científica é a seleção da planta a ser testada, incluindo identificação botânica e uso popular (parte da planta usada, forma de administração, doses e tempo de tratamento). Posteriormente, são necessários testes *in vitro*

para avaliar a provável propriedade anti-helmíntica através da observação do seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento ou motilidade de larvas. Estes são testes de triagem com plantas, seus extratos ou óleos essenciais para escolha dos mais promissores, apresentando como vantagem a possibilidade de medir a eficácia, simultaneamente, de vários compostos, além da rapidez, simplicidade e baixo custo, para em seguida serem realizados os testes *in vivo* (ATHANASIADOU; KYRIAZAKIS, 2004).

Os testes *in vivo*, inicialmente através de estudos toxicológicos em animais de laboratório contribuem para determinação da margem de segurança da planta em organismos vivos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Estes testes permitem conhecer os possíveis efeitos decorrentes da exposição a determinadas substâncias (BARROS; DAVINO, 2003) que podem ser avaliados quando administradas em dose única ou em doses repetidas. Após a determinação da margem de segurança, a planta é submetida a testes pré-clínicos de eficácia para avaliação da atividade anti-helmíntica em animais de laboratório utilizando gerbil (*Meriones unguiculatus*). Estes testes possibilitam uma estimativa de doses para o uso terapêutico da planta na espécie alvo (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

A última etapa de uma pesquisa sobre a atividade de plantas medicinais são testes de eficácia anti-helmíntica realizados na espécie alvo, devido à laboriosidade, alto custo e necessidade de utilização de um grande número de animais (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005), são considerados mais confiáveis e devem ser realizados com animais natural ou experimentalmente infectados (GITHIORI et al., 2006). Os ensaios mais utilizados são o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (COLES et al., 1992), e o teste controlado (WOOD et al., 1995), que permitem avaliar a diminuição da infecção endoparasitária, assim como a redução da carga parasitária no órgão alvo respectivamente. No entanto, o teste controlado torna-se inviável para as condições de avaliação a campo, devido à necessidade de sacrifício dos animais e ao alto custo. Consequentemente, o teste fenotípico indireto *in vivo* de redução de contagem de ovos (FECRT) continua sendo o principal método de escolha para a detecção da resistência e eficácia da droga (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012).

3.3.2.5 Teste de toxicidade com fitoterápicos

A toxicologia é a ciência que estuda as interações de substâncias químicas com o organismo provocando efeito nocivo, já o termo toxicidade se refere à propriedade de agentes tóxicos de promoverem injúrias às estruturas biológicas através de interação físico-química, sendo a intoxicação o processo patológico provocado por substâncias endógenas ou exógenas

promovendo desequilíbrio fisiológico, identificados por sinais e sintomas ou exames laboratoriais (BARROS; DAVINO, 2003).

A toxicidade de uma substância pode ser considerada como a capacidade de causar danos graves ou morte. Toda substância, segundo a toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias pela qual é administrada. Desse modo, os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos decorrentes da exposição a determinadas substâncias (BARROS; DAVINO, 2003).

Em estudos de toxicidade é realizado inicialmente testes de toxicidade aguda, avaliando os efeitos adversos ocorridos em 24 horas, onde a droga ou planta é administrada em única dose ou administração múltipla, objetivando avaliar a sintomatologia consequente a administração do composto testado e sua letalidade (LOOMIS; HAYES, 1996; BARROS; DAVINO, 2003),

Segundo Velasco e Capanema (2006), a maneira mais simples de se expressar a toxicidade é por meio de dose letal (DL50), ou seja, a dose necessária para matar 50% de uma população sob determinada condição. Para avaliação da toxicidade aguda, os fármacos a serem testados podem ser administrados em duas vias, orais ou intraperitoneais, utilizando ratos ou camundongos, podendo ser observados até 14 dias, porém sinais de intoxicação, letargia e mudanças de comportamento deveram ser avaliados diariamente (AMDUR et al., 1991).

Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar que uma planta medicinal ou um fitoterápico não tem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com a sua ingestão, mas principalmente efeitos que se instalam de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos. Portanto, é necessária a avaliação da segurança, ou seja, a avaliação da relação risco/benefício, ter sua ação comprovada e sua toxicidade potencial avaliada cientificamente.

3.4 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

O uso frequente desses fármacos no controle de nematóides gastrintestinais demonstrou grande impacto positivo durante uma década de uso, mas atualmente constitui na forma mais desastrosa de controle, resultando na seleção e propagação de parasitos resistentes com elevado índice de homozigose e perda total da heterozigose para indivíduos suscetíveis,

agravado pelo uso de combinações de medicamentos em altas concentrações, muitas vezes sem critérios de produção ou indicação para uso, provoca além da resistência, a presença dos resíduos nos produtos de origem animal e no meio ambiente (FORTES; MOLENTO, 2013).

Na ovinocultura nacional a utilização de anti-helmínticos contra nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes é indispensável, levando a maioria dos criadores a aplicarem diversos grupos químicos com várias dosificações por ano, promovendo à diminuição da eficácia dos produtos (UENO et al., 1997; BORGES, 2003).

A multirresistência é outro agravante para a ovinocaprinoecultura, dificultando ainda mais o controle parasitário, culminando com o encerramento da criação em algumas localidades (SARGISON et al., 2005; BLAKE; COLES, 2007). O aparecimento da multirresistência a drogas por nematóides está ameaçando a quimioterapia de ovinos e caprinos infectados em muitos países (YUE et al., 2003; WRIGLEY et al., 2006; SUTHERLAND et al., 2008), levando a busca por novas drogas que demonstrem eficiência no suporte da terapia anti-helmíntica.

Dentre os testes de maior utilização para detecção da resistência anti-helmíntica destacam-se os testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* são utilizados para avaliar a eficácia das drogas utilizadas como anti-helmínticos nas fases de vida livre, ou seja, sua capacidade de inibir a eclosão de ovos e desenvolvimento das larvas. Já os testes *in vivo* permitem avaliação da eficácia da droga na espécie para qual foi fabricada, nesse caso os pequenos ruminantes.

3.4.1 Testes *in vitro*

3.4.1.1 Teste de eclosão de ovos

Desenvolvidos com o objetivo de detectar a resistência anti-helmíntica, o teste *in vitro* de maior uso é o teste de eclosão de ovos (TEO), elaborado por Le Jambre em 1976, inicialmente para detecção da resistência aos benzimidazóis que inibem o embrionamento e a eclosão dos ovos (COLES et al., 1992; TAYLOR et al., 2002), atualmente, é amplamente realizado para avaliação do potencial anti-helmíntico de plantas, onde o tiabendazol é frequentemente utilizado como controle.

O teste inicia-se com a coleta de fezes diretamente da ampola retal para não ocorrer contaminação por nematóides de vida livre. Os animais selecionados devem estar infectados em testes prévios com ovos por grama de fezes (OPG) superior a 2000. Por ser de

rápido embrionamento o seu desenvolvimento e eclosão podem ser observados em microscópio 48 horas após a coleta.

As fezes coletadas são homogeneizadas em água e passam por um processo de sucessivas lavagens em tamises, onde na peneira de 25 μ m os ovos são retidos, lavados com água e centrifugados, o sobrenadante é descartado e solução salina é adicionada para ressuspender o sedimento, procedendo a uma nova centrifugação e posteriormente lavados novamente em peneiras de 25 μ m onde os ovos são em seguida colocados em cálice de sedimentação por duas horas.

Os ovos são aspirados em pipetas graduadas de 50 μ l e contados em cinco repetições, obtendo-se a quantificação de ovos/ μ l, para serem utilizados em até uma hora. São distribuídos aproximadamente 100 ovos incubados em tubos ou placas a 37°C por um período de 48 horas em contato com o extrato diluído em diferentes concentrações. Após o período de incubação é observado em microscópio óptico se existe a presença de larvas de primeiro estágio ou ovos não eclodido e efetua-se a contagem (HUBERT; KOERBOEUF, 1984).

O teste também permite que uma fração dos ovos seja mantida em contato com droga de eficácia conhecida constituindo um grupo controle positivo, e assim possa promover uma comparação entre o percentual de eclosão do produto natural testado em relação ao sintético (COLES et al., 1992).

Algumas limitações podem influenciar os resultados obtidos no TEO e merecem atenção e padronização na hora da execução, tais como uso de diferentes fontes de água (destilada, desionizada ou água de torneira), grau de limpeza dos ovos, método de dissolução da amostra e temperatura, sendo essencial a detecção de tais fatores para obtenção de resultados igualmente eficazes (COLES et al., 2006; FORTES; MOLENTO, 2013).

3.4.1.2 Teste de desenvolvimento larvar

O teste de desenvolvimento larvar (TDL) é amplamente utilizado para avaliação do ciclo evolutivo das larvas dos nematóides gastrintestinais. A origem deste teste, esta no conhecimento de que pequenas concentrações de anti-helmínticos possam agir afetando a eclosão, o desenvolvimento ou motilidade dessas larvas (TAYLOR et al., 2002; COLES et al., 2006). Descrita por Hubert e Kerboeuf (1992), foi desenvolvida para detecção de nematóides resistentes utilizando um meio de cultura para obtenção de larvas infectantes a partir de ovos recuperados nas fezes.

Modificação da técnica antes descrita por Roberts e O'Sullivan (1950) permitiu que ovos recuperados de animais infectados fossem incubados em fezes livres de nematóides, no entanto técnicas mais atuais descrita por Bizimenyera et al. (2006) objetivando descartar a contaminação de fezes utilizadas como meio de cultura e ainda promover a alimentação das larvas para o seu desenvolvimento, descreveram a utilização de suspensão de *Escherichia coli* liofilizada (ATCC 9637 Sigma), associada a anfotericina B como meio de cultivo. Incubados por 48 horas permitem a adição de extratos a serem testados e após sete dias é adicionado Lugol e feita a contagem das larvas L1 e L3, onde os resultados são comparados a grupo não tratados e grupo tratado com princípio ativo conhecido, podendo fazer uso do tiabendazol ou Ivermectina.

Tais testes *in vitro* ainda apresentam limitações sendo necessária a coleta de grande quantidade de amostra para definir um processo padrão que possibilite uma interpretação confiável, associado ao alto nível de treinamento técnico para a interpretação dos achados, com poucos laboratórios que oferecem esse tipo de serviço (COLES et al., 2006; FORTES; MOLENTO, 2013).

3.4.2 Teste *in vivo*

3.4.2.1 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (FECRT)

O FECRT é realizado com uma sequência de exames de contagem de ovos por grama de fezes (OPG), objetivando avaliar a flutuação do número de ovos nas fezes. É um método de fácil execução e interpretação, além de ser considerado o método de escolha para o monitoramento da eficácia anti-helmíntica (COLES et al., 1992).

A avaliação da eficácia está diretamente relacionada à quantificação de ovos liberados por fêmeas de nematóides adultos, onde nem sempre há uma correlação entre o número de ovos liberados com a carga parasitária, constituindo uma grande limitação do teste, fato observado para *Trichostrongylus axei* cuja postura de ovos é muito baixa (PALACY et al., 2010). Contudo, foi observada uma boa correlação entre a contagem de ovos nas fezes e número de parasitos foi encontrado para *H. contortus* (TAYLOR et al., 2002; CHAGAS et al., 2013).

Para execução do teste, é primordial que os animais sejam distribuídos de forma homogênea, observando sexo, raça, idade, tratamento anti-helmíntico utilizado anteriormente, peso corporal, grau Famacha e contagem de OPG pré-experimento. Deverão ser distribuídos

entre sete a 10 animais por grupo experimental tratado e grupo controle não tratado, recomendando jejum alimentar prévio de 12 horas, sendo o dia da administração do fármaco a ser avaliado o dia zero, com coletas de fezes realizadas de 10 a 14 dias após o tratamento (COLES et al., 1992; NICIURA et al., 2009). Os animais permanecerão no mesmo manejo e pasto anteriormente ao tratamento.

Para avaliar os efeitos do fármaco sobre a redução do número de ovos nas fezes, além do OPG, deve-se realizar a cultura de larvas objetivando identificar as espécies envolvidas na infecção e suas respectivas flutuações populacionais (PRESIDENTE, 1985).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O melão de são caetano (*Momordica charantia*) foi coletado em ambiente natural na cidade de Mossoró-RN, sendo utilizando estruturas morfológicas (inflorescência, folhas e frutos) intactas para produção da exsicata e identificação botânica no Herbário Dardano de Andrade Lima (MOSS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), depositada sobre Número 14089 (Anexo A). Para a produção do extrato procedeu-se a coleta do material foliar uma única vez logo após o período chuvoso (Figura 1), objetivando uniformizar o extrato hidroalcoólico de *M. charantia*.

Figura 1 - *Momordica charantia*: A. Material vegetal observado a campo com flor e fruto; B. Exsicata produzida para identificação botânica.



Fonte: Acervo da autora

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS VEGETAIS

O processamento do material vegetal para obtenção do extrato hidroalcoólico de *M. charantia* (EHMC) seguiu recomendações propostas por Matos (1997), onde o material foliar coletado foi submetido à dessecação em estufa de circulação forçada, sob temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 5$, até atingirem peso constante e posteriormente triturado e pesado. Utilizou-se álcool etílico PA e água na proporção 70 e 30%, respectivamente como solvente orgânico,

adicionado 2 litros para cada 500g do material foliar triturado. Após 72 horas em descanso o conteúdo foi submetido a três filtrações sucessivas objetivando retirada de resíduo e em seguida evaporado em banho maria a 40°C para obtenção do extrato bruto concentrado, com rendimento final de 3% (Figura 2).

Figura 2 - Processamento da amostra vegetal e obtenção do extrato de *Momordica charantia*: A. Secagem em estufa de circulação forçada; B. Trituração manual do material foliar seco; C. Retirada dos resíduos sólidos; D. Filtração em algodão; E. Evaporação em banho maria a 40°C; F. Extrato bruto concentrado.



Fonte: Acervo da autora

4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os testes fitoquímicos qualitativos para detecção da presença de flavonóides, esteróides, alcalóides, antocianinas, catequinas, saponinas, taninos, terpenos e xantonas foi realizado no Laboratório de Química da Universidade Estadual do Ceará (UECE), seguindo metodologia descrita por Matos et al. (1997), com quantificação dos teores de fenóis totais e

flavonóides segundo Sousa et al. (2007) e Funari e Ferro (2006), também foi realizada análise qualitativa para etanol, utilizando reação de oxidação com dicromato de potássio e ácido sulfúrico, descrita por Baathen (1997) e modificada para fitoterápico. Os testes foram realizados com base na observação visual da cor ou mudança na formação de precipitado após a adição de reagentes.

4.4 TESTES *IN VITRO*

4.4.1 Coleta do material fecal

As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal de ovinos monoinfectados experimentalmente com *H. contortus* mantidos em gaiolas metabólicas, e submetidas a teste de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) seguindo metodologia descrita por Gordon e Whitlock, (1939) e Chagas et al. (2011), confirmada infecção acima de 2000 OPG procedeu-se a recuperação de ovos.

4.4.2 Recuperação dos ovos

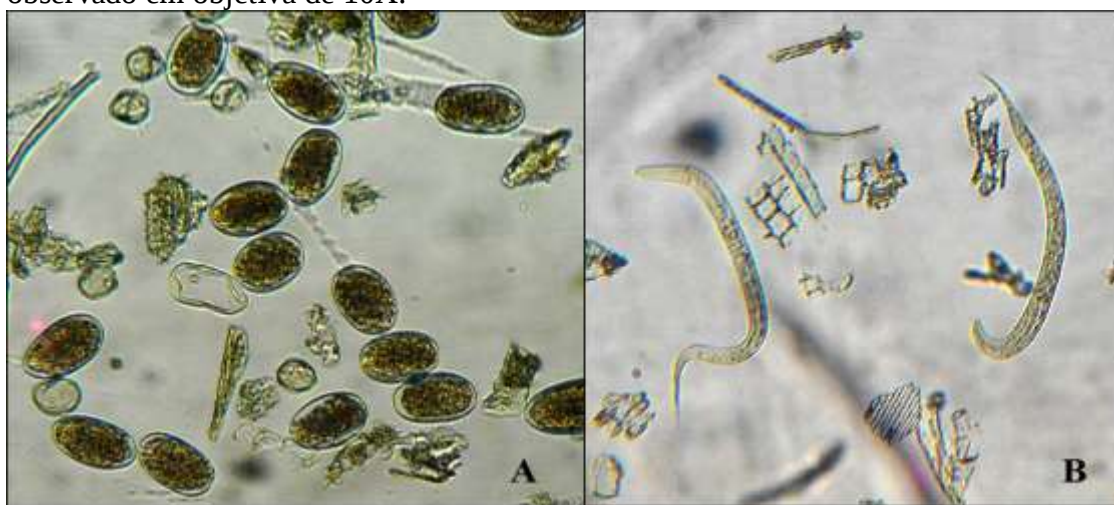
Seguiu metodologia descrita por Hubert e Kerboeuf (1992), onde as fezes foram submetidas a sucessivas lavagens com água em tamises com abertura de 1mm, 105µm, 55µm e 25µm para retenção dos ovos. A amostra de ovos retida foi centrifugada por 5min a 3000 rotações por minuto (rpm), desprezado o sobrenadante e adicionado solução hipersaturada (sal) para suspensão dos ovos recuperados e novamente centrifugada. O conteúdo sedimentado foi colocado em um cálice de sedimentação por 30 minutos, obtendo uma concentração de 100 ovos/250 µl.

4.4.3 Teste de eclosão de ovos (TEO)

Alíquotas de 250 µl contendo 100 ovos frescos de *H. contortus* foram incubadas em placas de 24 poços em contato com EHMC diluído em 3% de Tween 80 em concentrações (1,5 mg ml⁻¹; 0,7 mg ml⁻¹; 0,3 mg ml⁻¹; 0,1 mg ml⁻¹; 0,05 mg ml⁻¹) distintas, em quinze replicatas por concentração de acordo com a metodologia de Coles et al. (1992). Para controle negativo, foi utilizada a adição de água destilada e Tween 80 diluído a 3% e para controle positivo o tiabendazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,025 mg

ml⁻¹ utilizando populações de *H. contortus* resistentes aos benzimidazóis. As amostras foram incubadas por 48 horas a 37°C, e em seguida adicionadas uma gota de lugol por poço objetivando interromper o ciclo evolutivo do parasita. Foram realizadas três repetições com 5 replicas para cada concentração constituindo 15 repetições incubadas por 48h a 37°C. O conteúdo obtido foi examinado ao microscópio óptico, para contagem dos ovos e larvas de primeiro estágio (L1) (COLES et al. 2006).

Figura 3 - Estágios evolutivos de *Haemonchus contortus* usados como referência para diferenciação no teste de eclosão de ovos, mostrando ovo (A) e larva L1 (B) observado em objetiva de 10X.



Fonte: Acervo da autora

4.4.4 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

Para obtenção das larvas L1 uma alíquota de 200 µl de solução contendo 100 ovos/poço recém recuperados provenientes de ovino monoinfectados com *H. contortus* e obtido segundo Hubert e Kerbeuf (1992) foram incubados em placas de 24 poços por 48 horas em estufa a 37°C.

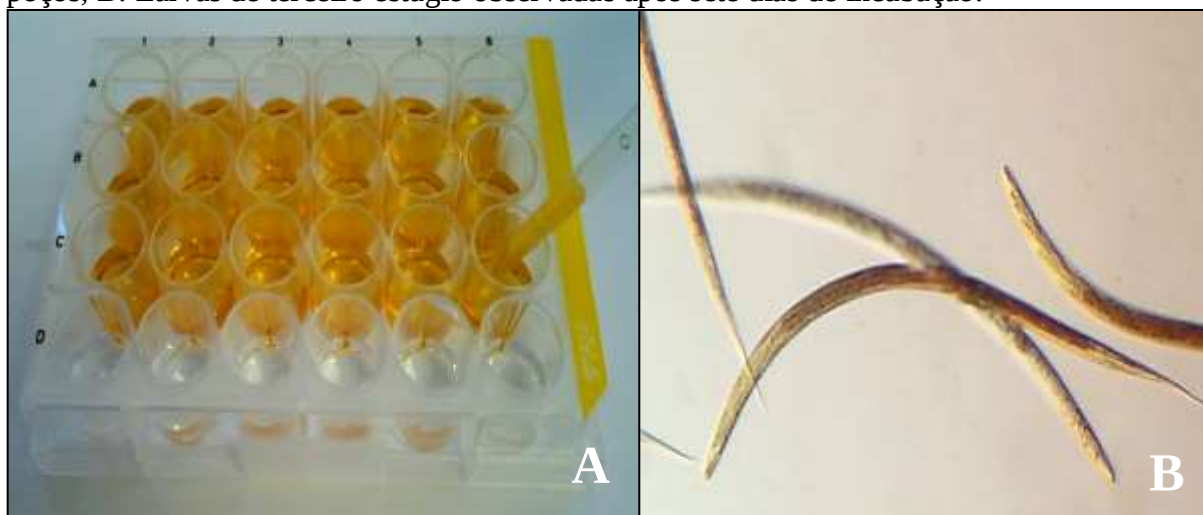
4.4.4.1 Teste laboratorial

Uma alíquota de 100 larvas L1/poço foi incubada em placa de 24 poços, com adição de 80 µl de meio nutriente (*Escherichia coli* e anfotericina B) por 7 dias (HUBERT; KERBOEUF 1992; CHAGAS et al., 2011) em adição ao extrato hidroalcoólico de *M. charantia* nas diluições e repetições anteriores descritas para o TEO. Ao fim de 7 dias foi

adicionada uma gota de lugol por poço e as larvas foram recuperadas e contadas ao microscópio de acordo com o desenvolvimento larvar (L1, L2 e L3).

Para o controle positivo, foi adicionado a ivermectina ($0,008 \text{ mg ml}^{-1}$) como larvicida ao meio nutritivo de *E. coli* em contato com os ovos, totalizando um volume de $500 \mu\text{l}$ /poço, já para o controle negativo foi adicionado a suspensão de ovos, água destilada e Tween 80 diluído a 3%, possibilitando o ciclo evolutivo do nematódeo e consequente comparação entre os controles positivos e negativos com os grupos testados em contato com o EHMC. Para avaliação da eficácia foram contadas as larvas que permaneceram em L1 e as larvas que continuaram o desenvolvimento chegando até L3 (Figura 4).

Figura 4 - Teste de desenvolvimento larvar: A. Incubação das amostras em placas de 24 poços; B. Larvas de terceiro estágio observadas após sete dias de incubação.



Fonte: Acervo da autora

4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EHMC

O experimento foi realizado no Laboratório de Parasitologia Animal seguindo recomendações do comitê de Ética no uso de Animais sob parecer N° 23091.005376/2013-67 (Anexo B). Foram utilizados camundongos (Balb/c), com peso entre 20 e 40g, divididos em 5 grupos (Tabela 1) segundo doses testadas entre 4000 a $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$, contendo doze animais por grupo submetidos a jejum prévio de 12 horas. Para administração do extrato os camundongos foram pesados, marcados por método australiano e tratados em dose única com EHMC diluído em 1% com Tween 80 por via oral. Para o grupo controle foi fornecido água e Tween 80 (polissorbato 80, Vetec) a 1% administrado $0,2 \text{ ml/camundongo}$.

Após a administração, os animais foram observados as cegas por 3 avaliadores, para avaliação dos parâmetros toxicológicos nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, 4, 8 e 24 horas e posteriormente a cada 24 horas totalizando 14 dias de observações.

Os parâmetros de toxicidade observados foram o índice de mortalidade, tremores, convulsões, lacrimejamento, salivação, micção e defecação, piloereção, ptose, efeitos na respiração, movimentação e tônus muscular, segundo preconiza Carlini (1972), Heuvel et al. (1990) e Brito (1994).

Tabela 1 - Grupos experimentais com doses avaliadas e médias de peso dos camundongos Balb/c selecionados para o teste de toxicidade aguda utilizando extrato de *Momordica charantia*.

Grupo Experimental	Doses testadas (mg kg ⁻¹)	Media de peso (g)	
		Fêmeas	Machos
G1 (Controle)	Tween 3% + água	23,1	28,4
G2	4000	28,1	32,4
G3	6000	26,9	34,3
G4	8000	25,1	31,6
G5	10.000	24,1	30,3

Para avaliação da progressão da toxicidade, 4 animais/grupo foram eutanasiados nos dias 3, 7 e 14 pós administração do EHMC. Foram submetidos a anestesia com cetamina e xilazina intraperitoneal segundo recomendações de Neto e Santos (2008). Confirmado efeito anestésico coletou-se sangue por punção cardíaca para avaliação do perfil hematológico (hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio - VCM, concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM e valores de contagem total e diferencial de células sanguíneas brancas) e bioquímico (alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, uréia, creatinina e fosfatase alcalina), seguida de eutanásia por deslocamento cervical. Os órgãos foram analisados macroscopicamente quanto à presença de possíveis alterações, e coletados individualmente fragmentos de fígado e rim para exame histopatológico.

4.6 TESTE *IN VIVO*

4.6.1 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes

Para o experimento, foram selecionados ovinos sem raça definida com ausência de tratamento anti-helmíntico por um período mínimo de 90 dias e mantidos sob pastagem

irrigada. Fezes foram coletadas diretamente da ampola retal para realização de teste de ovos por grama de vezes (OPG) e verificação do grau de infecção (Figura 5).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com 10 animais por grupo, pesados e tratados com o extrato de *M. charantia* e compostos anti-helmínticos comerciais de acordo com doses recomendadas pelos fabricantes, objetivando promover comparação de eficácia das drogas com o extrato testado (Tabela 2). A dose utilizada para EHMC foi calculada de acordo com os resultados das doses letais (DL) obtidas nos testes *in vitro* e teste de toxicidade.

Figura 5 - Etapas do teste de redução de contagem de ovos nas fezes: A. Rebanho ovino sem raça definida; B. Pastagem de capim tanzânia irrigada disponível para o rebanho durante o experimento; C. Coleta de fezes diretamente da ampola retal; D. Administração das drogas a serem avaliadas.



Fonte: Acervo da autora

Os ovinos experimentais foram pesados e receberam o tratamento por via oral em dose única, sendo o dia da administração considerado o dia zero do experimento. No sétimo dia pós tratamento, foi realizado uma segunda coleta de fezes, e com 14 dias procedeu-se o terceiro e com 21 o quarto teste de OPG, possibilitando um acompanhamento da flutuação do número de ovos nas fezes.

Tabela 2 - Grupos experimentais adotados para o Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes realizado em ovinos naturalmente infectados.

Grupo Experimental	Anti-helmíntico	Dosagens
G1 (Controle)	-	-
G2	Extrato de <i>M. charantia</i>	*
G3	Levamisole	7,5 mg kg ⁻¹
G4	Ivermectina 0,08%	0,2 mg kg ⁻¹
G5	Albendazol	10 mg kg ⁻¹

*Dose estabelecida a partir dos resultados obtidos nos testes *in vitro* e de toxicidade

O número de ovos nas fezes (OPG) foi calculado por multiplicação do número total de ovos encontrado na câmara de McMaster por 50, seguindo metodologia descrita por Gordon e Whitlock (1939) e Chagas et al. (2011). Coproculturas foram realizadas nos dias 0, 7 e 14 após tratamento, para identificação dos gêneros e quantificação da redução da carga parasitária segundo características morfológicas descritas por Ueno e Gonçalves (1998).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média±erro padrão através dos programas estatísticos IBM SPSS Statistics for Windows (Armonk, NY:IBM Corp.) versão 22.0 e GraphPad Prism (San Diego, California USA) versão 5.0. Para evidenciar diferenças estatísticas entre grupos experimentais para variáveis TEO e TDL utilizou-se, após análise dos pressupostos paramétricos, ANOVA seguida por Tukey. A determinação das concentrações efetivas para inibir 50% (DE50) da eclosão de ovos e desenvolvimento larvar foi obtida através do método Próbit.

O monitoramento da infecção helmíntica foi feito por meio da determinação do número de OPG dos animais. Os resultados obtidos com a contagem de OPGs foram tratados pela fórmula $\log(x+1)$ e analisados com o auxílio do Software Sigma Plot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc) versão 12.0. Diferenças estatísticas entre e dentro de cada grupo ao passar dos dias foram conduzidas por análise de variância e análise de variância para medidas repetidas, respectivamente, seguida do teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

A avaliação qualitativa do extrato hidroalcoólico de folhas de *Momordica charantia* está descrito na tabela 3, com maior prevalência dos compostos fenólicos do grupo dos flavonóides entre eles as flavonas e flavonóis, que podem ser responsáveis pela ação biológica anti-helmíntica, embora os taninos sejam referidos como componente anti-helmíntico não foi encontrado na amostra estudada. Análise fitoquímica negativa também foi observada quando analisado a presença de álcool etanólico no extrato produzido.

Na análise quantitativa o extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* (EHMC) apresentou teor de fenóis e flavonas de $3,84 \pm 0,12$ e $4,79 \pm 0,55$ mg ml⁻¹, respectivamente. Segundo Huber e Rodriguez-Amaya (2008), a produção de metabólitos secundários pelas plantas ocorre em resposta a agressores ambientais, no entanto estudos fitoterápicos demonstraram ação antioxidante, cardiovasculares (YAO et al., 2004), anticancerígeno (YANG et al., 2000), antivirais e antialérgicos, bem como ação antitrombótica e anti-inflamatória (NIJVELDT et al., 2001) inerente aos metabolitos provenientes de *M. charantia*.

Tabela 3 - Composição química do extrato hidroalcoólico de folhas de *Momordica charantia*.

Constituintes	<i>Momordica charantia</i>
Alcaloides	-
Antocianidinas	-
Antocianinas	-
Catequinas	-
Chalconas	-
Cumarinas	-
Esteroides	+++
Fenóis simples	+
Flavonas	+++
Flavonóis	+++
Flavanonas	-
Flavanonois	-
Saponinas	-
Taninos catéquicos	-
Taninos pirogálicos	-
Triterpenoides	-
Xantonas	+++

Forte: +++ Médio: ++ Fraco: + Negativo: -

Em estudo realizado por Rodrigues et al. (2010), a análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. charantia* coletado no estado do Maranhão apresentou esteróides e fenóis semelhantes a descrita no presente estudo, no entanto foram encontrados outros compostos como alcalóides e saponinas. Costa et al. (2010) ao analisar a mesma espécie corroborou com os resultados encontrados ao descrever os esteróides, xantonas e flavonóides como constituintes das folhas de *M. charantia* provenientes de Fortaleza-CE, além de alcalóides e taninos não observado na amostra estudada.

Variação fitoquímica também foi descrita por Gomes et al. (2011) em amostra proveniente do fruto de *M. charantia* oriundo da cidade de Patos-PB, relatando a presença de flavonas, flavonóis, chalconas e xantonas, descritas no presente estudo para folhas, além da presença de taninos e chalconas.

Para Raman e Lau (1996) alterações de constituintes fitoquímicos são observadas quando diferentes partes de *M. charantia* são analisadas. Segundo Matos (1997), a variação fitoquímica encontrada na espécie estudada é justificada pela existência de onze variedades classificadas em grupos que apresentam frutos curtos, longos e finos, predominando a variante de frutos curtos na região Nordeste, contribuindo com a diversidade fitoquímica na espécie. Para Rodrigues et al. (2010) as diferenças ambientais também podem influenciar nos constituintes fitoquímicos produzidos pela espécie determinando uma variação quantitativa de metabólitos secundários.

5.2 TESTES *IN VITRO*

No teste de eclosão de ovos (TEO) os percentuais de eficácias do EHMC estão dispostos na tabela 4, evidenciando diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle negativo. Nas concentrações de 0,7 e 1,5 mg ml⁻¹ o EHMC apresentou efeito dose dependente, reduzindo 94,07% e 98,81% a eclodibilidade de ovos de *H. contortus* respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas quando comparado ao Tiabendazol avaliado a 0,025 mg ml⁻¹ ($p < 0,05$).

Em estudos realizados por Cordeiro et al. (2010) e Gomes (2010) no estado da Paraíba com extrato de folhas de *M. charantia*, foram descritas eficácias inferiores ao encontrado no presente estudo, tornando inviável apenas 36,53% e 37,14% dos ovos de nematóides gastrintestinais da família Trichostrongylidae, respectivamente, quando avaliados na concentração de 50 mg ml⁻¹, evidenciando que o uso de elevadas doses podem retardar a ação do fitoterápico em decorrência do acúmulo de resíduo não diluídos na amostra.

Considerando as doses testadas variando de 0,05 a 1,5 mg kg⁻¹, observou-se DE50 de 0,132 mg ml⁻¹ (IC95%: 0,064-0,238), e DE90 de 0,414 mg ml⁻¹ (IC95%: 0,232-2,026). Resultados encontrados por Batista et al. (1999) descreveram DE50 de 0,101 mg ml⁻¹ aproximada a observada na amostra analisada, quando a ação ovicida do extrato aquoso de *M. charantia* foi testado nas concentrações de 50, 10, 2, 0,4 e 0,08 mg ml⁻¹.

Tabela 4 - Percentual de eficácia média ± erro padrão (E.P.) do extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* em diferentes concentrações na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg ml ⁻¹)	Eficácia ± E.P.
1,5	98,81 ± 0,29A
0,7	94,07 ± 1,88A
0,3	85,82 ± 1,55B
0,1	49,45 ± 4,25C
0,05	4,84 ± 0,58D
Controle positivo (0,025 mg ml ⁻¹ Tiabendazol)	96,27 ± 0,53A
Controle negativo (3 % Tween 80)	5,53 ± 0,69D

Letras diferentes na coluna significa diferença estatística (p<0,05).

No teste de desenvolvimento larvar (TDL) o EHMC apresentou eficácia anti-helmíntica inibindo 99,61% das larvas de *H. contortus* quando submetidas a doses de 1,5 mg ml⁻¹ (Tabela 5), com DE50 de 0,423 (IC95%: 0,217 – 0,884) e DE90 1,289 (IC95%: 0,679 – 9,894).

Tabela 5 - Percentual de eficácia média ± erro padrão (E.P.) do extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* em diferentes concentrações na inibição do desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg ml ⁻¹)	Eficácia ± E.P.
1,5	99,61 ± 0,28A
0,7	64,58 ± 2,59B
0,3	27,14 ± 1,94C
0,1	6,38 ± 0,99D
0,05	3,27 ± 0,60D
Controle positivo (0,008 mg ml ⁻¹ Ivermectina)	98,79 ± 0,41A
Controle negativo (3 % Tween 80)	2,70 ± 0,53D

Letras diferentes na coluna significa diferença estatística (p<0,05).

Eficácia de folhas de *M. charantia* sobre o desenvolvimento de larvas de nematóides gastrintestinais foi descrita por Gomes et al. (2010) inibindo 78% e 66,6% quando

testadas nas doses de 25 e 50 mg ml⁻¹, já em testes realizados por Cordeiro et al. (2010) o número de larvas viáveis diminuíram de acordo com a concentração testada, afetando 48,4% e 86,7% das larvas quando avaliadas nas concentrações de 25 e 50% (mg ml⁻¹), respectivamente.

Os resultados encontrados para o TEO e TDL apontam que a eficácia se elevou de acordo com as doses avaliadas, sendo considerada como efeito dose dependente para o extrato testado. Apesar de não constituir substância isolada, o EHMC demonstrou nos testes *in vitro* a mesma eficácia quando comparados com os resultados encontrados para substâncias puras, tais como Tiabendazol e Ivermectina ($p < 0,05$) sobre ovos e larvas, respectivamente, apresentando alta eficácia de acordo com normas da WAAVP, representando grande potencial anti-helmíntico possibilitando seu uso no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Estudo que relatam plantas com alta eficácia *in vitro* semelhantes ao encontrado para EHMC foram descritas por Macedo et al. (2012) ao avaliarem o efeito de extratos provenientes de *Tagetes minuta* e *Mentha villosa* na inibição da eclosão de ovos de *H. contortus*, na concentração de 2,5 mg ml⁻¹ demonstraram eficácia de 96,8 e 97,6%, respectivamente. Ferreira et al. (2013) avaliaram o extrato aquoso da folha de *Annona muricata*, sobre ovos de *H. contortus*, inibindo 84,91% a eclodibilidade quando diluído na concentração de 50 mg ml⁻¹. Oliveira et al. (2009) avaliaram o extrato acetato de etila obtido do líquido da casca de *Cocos nucifera* sobre a eclodibilidade de ovos e o desenvolvimento larvar de *H. contortus*, promovendo a inviabilidade de 100% dos ovos testados com inibição de 99,77% sobre o desenvolvimento larvar nas concentrações de 5 mg ml⁻¹ e 80 mg ml⁻¹.

Substâncias purificadas de fitoterápicos também apontam eficácias elevadas, fato relatado por Macedo et al. (2011) ao avaliarem o efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*, reduzindo 98,8% da eclosão de ovos e 99,71% no desenvolvimento larvar sobre *H. contortus*, nas doses de 5,3 mg ml⁻¹ e 10,6 mg ml⁻¹ respectivamente. Já o óleo essencial de *E. globulus* apresentou eficácia de 99,3% no teste de eclosão de ovos e 98,7% no desenvolvimento larvar de *H. contortus*, nas concentrações 21,75 mg ml⁻¹ e 43,5 mg ml⁻¹, respectivamente (MACEDO et al., 2009). Tais resultados apontam para o potencial de diferentes plantas no controle de nematóides gastrintestinais em ovinos e caprinos, no entanto necessitam de doses superiores para promoverem resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo para *M. charantia*.

5.3 TESTE DE TOXICIDADE

No teste toxicológico, não ocorreu mortalidade quando os camundongos foram submetidos a doses de 4000 a 10.000 mg kg⁻¹, apenas alterações histopatológicas foram observadas e utilizadas para calcular a DL50 e DL90. Os camundongos do grupo controle e aquele que receberam 4.000 mg kg⁻¹ de EHMC permaneceram ativos durante todo o tempo monitorado, e não apresentaram alterações físicas e comportamental.

Os animais experimentais apresentaram até a primeira hora, incoordenação motora com excitação após 10 minutos da administração do extrato quando fornecido 6000 mg kg⁻¹, já aqueles que receberam 8.000 mg kg⁻¹, ocorreu diarreia, perda de reflexo, incoordenação, andar rastejante com ausência de apreensão da cauda, retornando a normalidade até o fim do experimento.

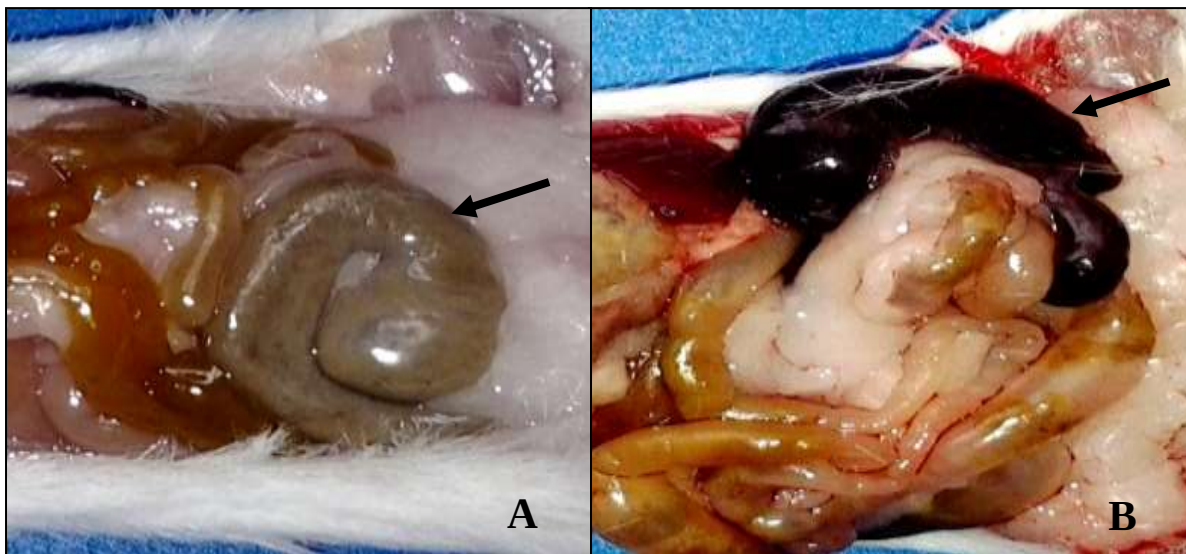
Aumento da frequência respiratória, diarreia, dificuldade de ambulação, excitação, incoordenação motora e perda de apreensão de patas posteriores foi observado quando administrado dose de 10.000 mg kg⁻¹ nas primeiras 4 horas, permanecendo após esse período com padrões normal de comportamento e de sinais clínicos. Estudos realizados por Almeida et al. (1999), indicaram que esses sinais representam ação depressora do sistema nervoso central (SNC), já Radhakrishnan et al. (2001) relataram que a redução da atividade motora pode ser causada tanto pela ação inibitória a um dano ao SNC como pela atividade relaxante muscular provocada pelo extrato.

Nas necropsias realizadas 3, 7 e 14 dias pós administração do EHMC não foi observado alteração renal macroscópica, somente lesões hepáticas foram encontradas quando testadas nas doses de 4000 a 10.000 mg kg⁻¹. Os animais acompanhados e necropsiados 3 dias pós administração não apresentaram alterações macroscópica independente da dose administrada, apenas um animal que recebeu dose de 10.000 mg kg⁻¹ do EHMC apresentou congestão intestinal (Figura 6).

Sete dias após receber o EHMC um camundongo dos grupos tratados com 6000 e outro com 10.000 mg kg⁻¹ apresentaram hemorragia petequial na cápsula hepática, indicando sinais de intoxicação (Figura 7), representando 12,5% dos sinais observados sete e 14 dias pós administração.

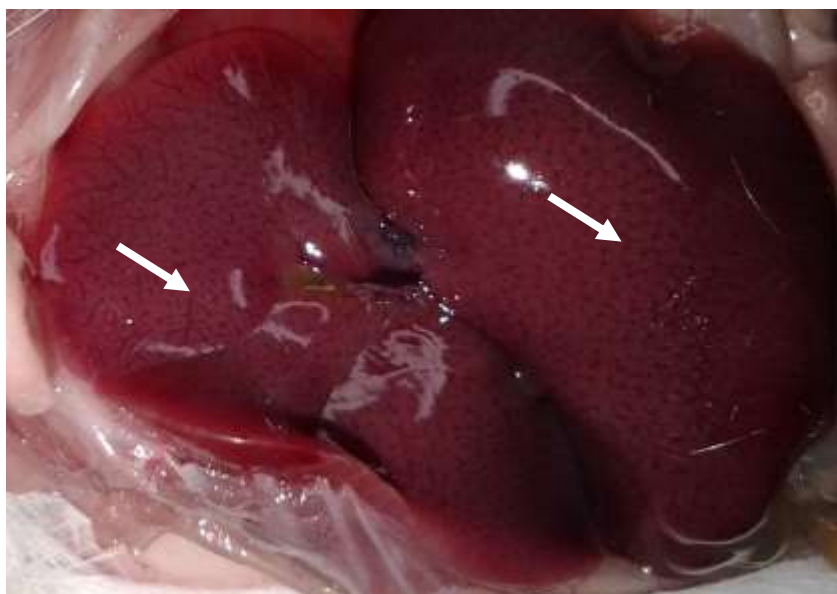
Alterações macroscópicas hepáticas também foram observadas quando fornecido 6000, 8000 e 10.000 mg kg⁻¹ 14 dias pós administração do EHMC, onde foi visualizado quatro camundongos com congestão hepática (Figura 8), sendo um no grupo que recebeu 6000 e outro 8000 mg kg⁻¹, assim como dois animais que receberam a maior dose do EHMC

Figura 6 - Necropsia realizada 3 dias após ingestão de EHMC: A. Camundongo do grupo controle com aparência intestinal normal; B. Camundongo Balb/c que recebeu dose de 10.000 mg kg⁻¹ apresentando congestão intestinal.



Fonte: Acervo da autora

Figura 7 - Cavidade abdominal de camundongo Balb/c, enfatizando hemorragia petequial na cápsula hepática, em camundongo Balb/c que recebeu dose de 10.000 mg kg⁻¹ 7 dias pós administração de EHMC.

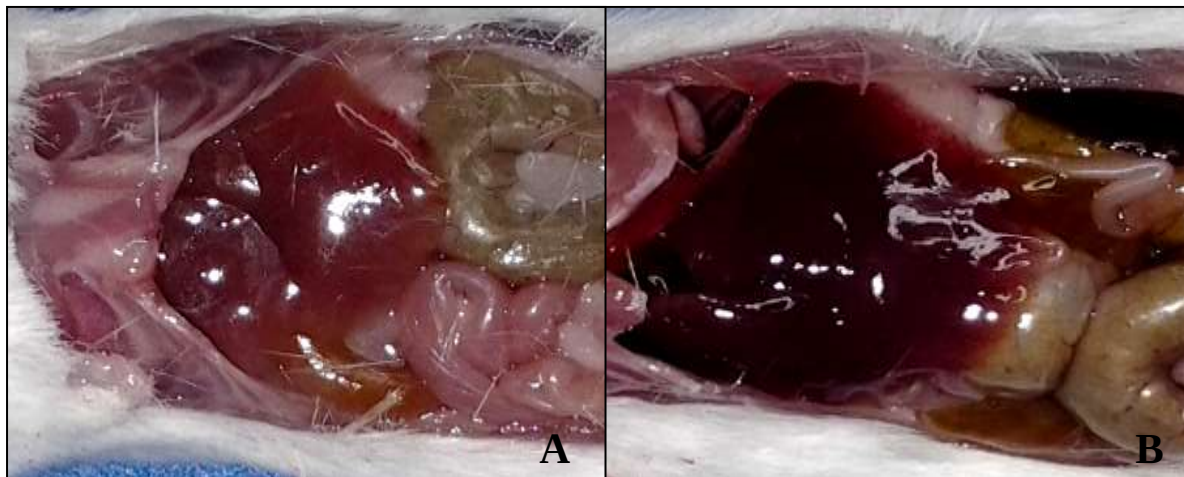


Fonte: Acervo da autora

Lesão hepática caracterizada por fibrose (Figura 9) foi observada uma única vez quando fornecida dose de 10.000 mg kg⁻¹ indicando lesão irreversível no órgão afetado. Segundo Friedman e Arthur (2002) a fibrose hepática ocorre por exposição crônica a

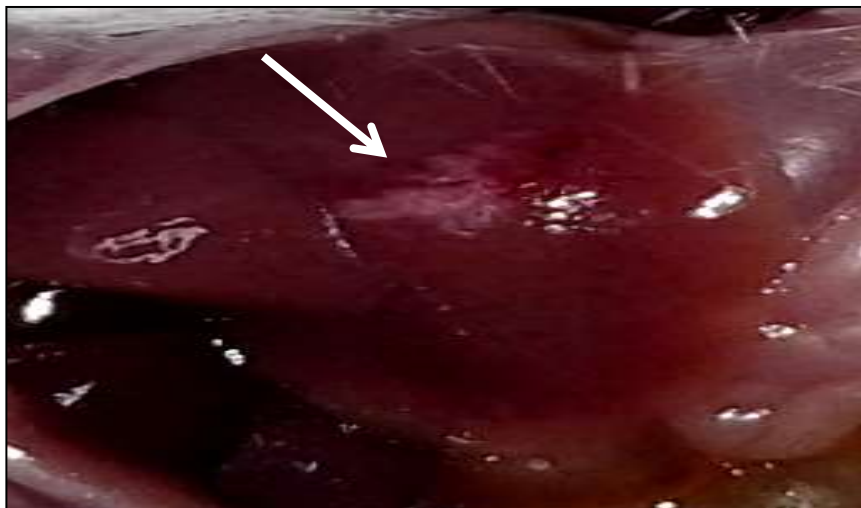
substâncias tóxicas geralmente resultantes de alteração da função orgânica, diminuição do tamanho do órgão e aumento do tecido conjuntivo, causando fibrose intra-hepática.

Figura 8 - Necropsia de camundongos Balb/c eutanasiados 14 dias pós ingestão de 10.000 mg kg⁻¹ EHMC: A. Camundongo com fígado de aparência normal; B. Camundongo com fígado apresentando congestão hepática.



Fonte: Acervo da autora

Figura 9 - Alteração macroscópica no fígado, apresentando lesão hepática com proliferação de origem fibrosa em camundongo que recebeu dose de 10.000 mg kg⁻¹ 14 dias pós tratamento com EHMC.



Fonte: Acervo da autora

Alterações de coagulação observadas no presente estudo tais como petéquias e equimoses nas serosas e enterorragia, são descritos com frequência no curso das hepatopatias tóxicas agudas (COLODEL et al., 2000). Resultado semelhante foi descrito por Batran et al. (2006) ao avaliar a toxicidade do extrato alcoólico do fruto de *M. charantia* (362mg kg⁻¹)

administrado por via subcutânea diariamente durante 30 dias, mostrando congestão em todos os órgãos internos. Nos casos de necrose hepática há transtornos de todas as funções hepáticas, e ocorre hipoprotrombinemia com diátese hemorrágica após o esgotamento das proteínas séricas. As células hepáticas destruídas liberam abundantes enzimas intracelulares, porém não é sempre que há correlação do aumento enzimático com a extensão da lesão hepática (ROBBINS; ANGEL, 1973).

Segundo Fontana (2008) alterações hepáticas induzidas por medicamento, entre eles os fitoterápicos, constitui a maior causa de lesões aguda no fígado sendo uma das principais preocupações para aprovação de drogas por órgãos reguladores governamentais na atualidade.

A toxicidade de fitoterápicos ocorre com maior efeito patológico sobre o fígado e rim, por várias espécies de plantas, entre elas o *Cylicosdiscus gabunenses* (MABEKU et al., 2007), já o acometimento renal ocorre por *Solanum grandiflorum* causando nefrotoxicidade e *Herniaria cinera* promovendo necrose tubular e hemorragias (SOKAR et al., 2003).

5.3.1 Alterações Histopatológicas

No estudo histopatológico não foram observadas alterações renais no grupo G2 que recebeu dose de 4000 mg kg⁻¹, apenas congestão hepáticas foi observada em camundongos necropsiados após 7 e 14 dias. Porém, revelou alterações renais e hepática imperceptíveis na macroscopia em animais que receberam dose de 6000, 8000 e 10.000 mg kg⁻¹ independente do sexo dos camundongos avaliado, ocorrendo degeneração hidrópica com áreas de descamação das células do epitélio tubular renal em todas as necropsias realizadas para o grupo G5 que receberam 10.000 mg kg⁻¹ de EHMC (Tabela 6).

Considerando todos os animais experimentais, 55,1% apresentaram degeneração hidrópica, 33,3% descamação e 8,3% necrose das células do epitélio tubular renal (Figura 10), independente da dose fornecida aos grupos. Para os camundongos que receberam 10,000 mg kg⁻¹ foi observado em 33,3% áreas de inflamação e congestão renal 14 dias após ingestão do EHMC.

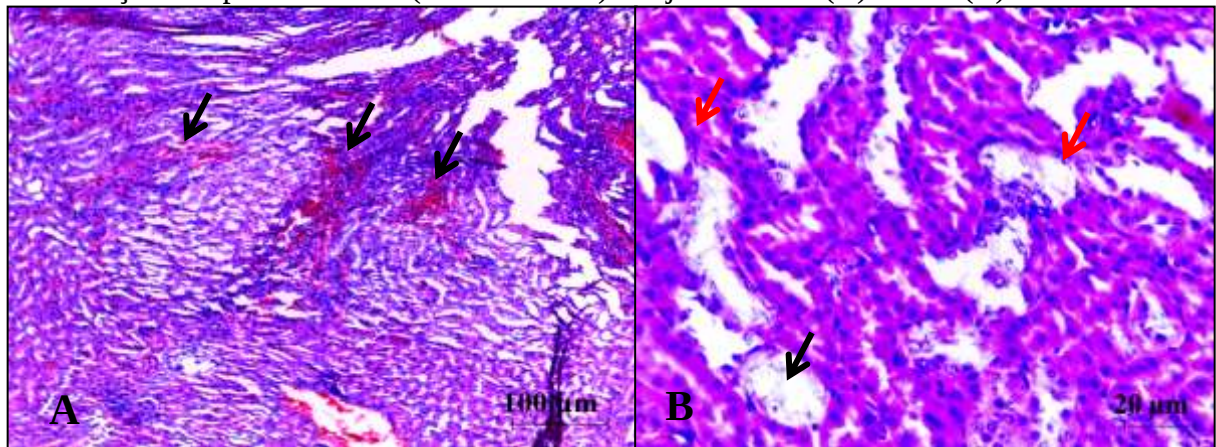
Alterações hepáticas (64,5%) foram observadas independentes da dose administrada com 74,5% dos camundongos necropsiados apresentando congestão vascular, e 34% aumento do volume do núcleo dos hepatócitos (Figura 11). No entanto, somente o grupo G5 apresentou infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração e necrose de hepatócitos (Figura 12), indicando que doses elevadas promoveram lesões hepáticas irreversíveis.

Tabela 6 - Alterações histológicas renais e hepáticas encontradas em camundongos Balb/c tratados com extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* com 3, 7 e 14 dias pós administração.

ALTERAÇÕES	Doses Testadas (mg kg ⁻¹) / Dias de Observação															
	Controle			T4000			T6000			T8000			T10.000			
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14	
RIM																
Infiltrado perivascular mononuclear com predominância de linfócitos							+				+	+	+	++	++	++
Áreas de descamação do epitélio tubular								++	++					+++	+++	+++
Presença de cilindros intratubular											+	+	+			
Degeneração hidrópica das células do epitélio tubular								++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Necrose do epitélio tubular											++	++	++	++		
Congestão de vasos															++	++
FÍGADO																
Aumento do volume do núcleo do Hepatócito											++	++	++	+++	++	++
Congestão vascular					++	+	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear															++	+++
Degeneração vascular de hepatócitos											+				++	
Necrose de hepatócitos																++

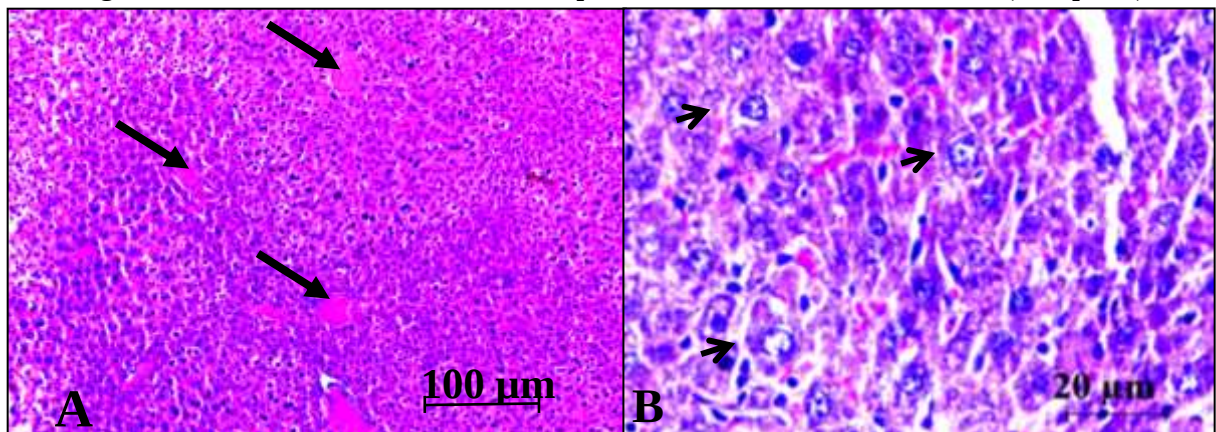
+: discreta; ++: moderada; +++: difusa

Figura 10 - Aspecto histológico por microscopia óptica do Rim em camundongos do grupo G4: A. Áreas de congestão renal; B. Degeneração hidrópica (seta preta) com áreas de descamação do epitélio tubular (seta vermelha). Objetiva 100X (A) e 40X (B).



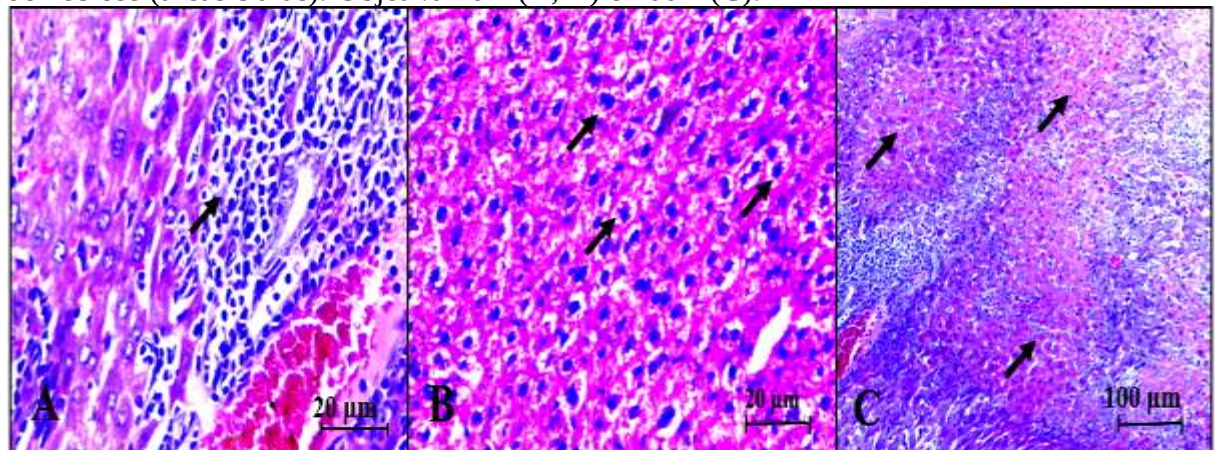
Fonte: Acervo da autora

Figura 11 - Estudo histopatológico por microscopia óptica do fígado em animais do grupo G4: A. Congestão das veias centrolobular; B. Hepatócitos com núcleo aumentado (seta preta).



Fonte: Acervo da autora

Figura 12 - Estudo histopatológico por microscopia óptica do fígado em camundongos do grupo G5: A. Infiltrado inflamatório mononuclear; B. Degeneração de hepatócitos; C. Áreas de necrose (áreas claras). Objetiva 40X (A, B) e 100X (C).



Fonte: Acervo da autora

A presença de alterações histopatológicas hepáticas e renais possibilitou calcular as doses letais para degeneração hidrópica DL50 5216,7 mg kg⁻¹ (IC95%: 4542,3 - 5881,5) e DL90: 6597,9 mg kg⁻¹ (IC95%: 5856,8 - 8548,4) e para necrose celular hepática e renal com DL50: 7952,2 mg kg⁻¹ (IC95%: 7066,9 - 8756,9) e DL90: 9921,4 mg kg⁻¹ (IC95%: 8962,4 - 12766,8). A ausência de mortalidade ocorrida e as doses letais calculadas demonstraram uma margem segura elevada para administração de folhas de *M. charantia* por via oral. Na classificação de toxicidade do comitê conjunto FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares, a ausência de mortalidade quando administrado 2mg kg⁻¹ é suficiente para considerar uma substância segura (MBAKA et al., 2010).

Resultado semelhante foi descrito por Mada et al. (2014) ao descreverem DL50 superior a 5000 mg kg⁻¹ quando administrado extrato de folhas de *M. charantia* por via oral em ratos wistar. Para Husna et al (2013) e Husain et al. (2014) a administração de extrato proveniente da fruta de *M. charantia* por via oral foi considerada segura, já que doses maiores que 2000 mg kg⁻¹ foram relatadas como DL50. Similaridade foi descrita por Batran et al. (2006) ao descreverem DL10 (2686 mg kg⁻¹), DL50 (3623,4 mg kg) e DL100 (5028 mg kg) superiores a 2000 mg kg⁻¹ quando o extrato alcoólico da fruta de *M. charantia* foi aplicado por via subcutânea em ratos wistar.

5.3.2 Alterações Hematológicas e Bioquímicas

Na avaliação dos parâmetros hematológicos (Tabela 7) foi detectado diminuição do hematócrito (Ht) e hemoglobina (Hb) com aumento do volume corpuscular médio (VCM) três dias pós ingestão do EHMC, indicando anemia macrocítica nos animais tratados com doses acima de 4000 mg kg⁻¹, apresentando diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle (p<0,05). Esses parâmetros retornaram à normalidade sete dias após a administração do fitoterápico e se elevou após 14 dias, sendo estatisticamente diferentes ao grupo controle no mesmo período estudado (p<0,05). Elevação dos parâmetros plaquetários também foram observados nos camundongos tratados com 6000 e 10.000 mg kg⁻¹ aos 14 dias quando comparados com animais do mesmo grupo 3 e 7 dias pós tratamento (p<0,05).

Ao leucograma (Tabela 8) foi possível observar uma leucopenia em camundongos tratados com 6000, 8000 e 10.000 mg kg⁻¹ três dias após receber o EHMC, evidenciada por uma eosinopenia e monocitopenia nos mesmos grupos estudados. Os parâmetros do leucograma observado com 7 e 14 dias mostraram-se dentro da normalidade quando comparados ao grupo controle.

Tabela 7 - Valores de média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros hematológicos de camundongos Balb/c tratados com o extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* em dose única por via oral 3, 7 e 14 dias pós tratamento.

Variáveis	Dias	GRUPOS				
		Controle	G2 (4000 mg kg ⁻¹)	G3 (6000 mg kg ⁻¹)	G4 (8000 mg kg ⁻¹)	G5 (10.000 mg kg ⁻¹)
Ht (%)	03	39,00 $\pm$ 0,57aA	39,00 $\pm$ 1,15aB	32,66 $\pm$ 0,33bB	35,33 $\pm$ 0,88bB	32,00 $\pm$ 0,57bB
	07	39,50 $\pm$ 1,44aA	43,67 $\pm$ 1,45aA	47,67 $\pm$ 1,45aA	45,33 $\pm$ 1,33aA	44,44 $\pm$ 5,17aA
	14	38,0 $\pm$ 3,0bA	40,25 $\pm$ 0,94abAB	44,75 $\pm$ 0,85aA	45,50 $\pm$ 0,86aA	42,75 $\pm$ 0,25abA
Hb (g/dL)	03	12,58 $\pm$ 0,18aA	12,58 $\pm$ 0,37aB	10,53 $\pm$ 0,10bB	11,39 $\pm$ 0,28bB	10,32 $\pm$ 0,18bB
	07	12,74 $\pm$ 0,46aA	14,08 $\pm$ 0,46aA	15,37 $\pm$ 0,46aA	14,62 $\pm$ 0,43aA	14,40 $\pm$ 1,67aA
	14	12,25 $\pm$ 0,96bA	13,14 $\pm$ 0,30abAB	14,43 $\pm$ 0,27aA	14,67 $\pm$ 0,27aA	13,79 $\pm$ 0,08abA
VCM	03	47,18 $\pm$ 1,44cC	65,68 $\pm$ 11,2bcB	99,10 $\pm$ 7,12abA	99,99 $\pm$ 9,94abAB	105,32 $\pm$ 6,20aA
	07	77,68 $\pm$ 5,42aA	101,50 $\pm$ 14,2aA	95,33 $\pm$ 1,49aA	111,19 $\pm$ 8,55aA	110,90 $\pm$ 6,07aA
	14	65,52 $\pm$ 2,68aB	81,89 $\pm$ 4,54aAB	57,99 $\pm$ 4,90aB	69,8 $\pm$ 11,2aB	65,3 $\pm$ 10,1aB
CHCM (%)	03	32,25	32,25	32,25	32,25	32,25
	07	32,25	32,25	32,25	32,25	32,25
	14	32,25	32,06 $\pm$ 0,06	32,25	32,25	32,25
Plaquetas (mil/mm3)	03	566,50 $\pm$ 70,1aA	650,67 $\pm$ 72,1aA	565,0 $\pm$ 21,9aB	439,0 $\pm$ 43,8aA	517,33 $\pm$ 57,0aB
	07	422,5 $\pm$ 30,3aA	615,7 $\pm$ 59,8aA	537,33 $\pm$ 6,69aB	489,3 $\pm$ 38,5aA	488,0 $\pm$ 60,7aB
	14	585,7 $\pm$ 79,3aA	621,5 $\pm$ 33,6aA	958,0 $\pm$ 164aA	770 $\pm$ 160aA	1153 $\pm$ 182aA

Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Ht: hematócrito, Hb: hemoglobina, VCM: volume corpuscular médio, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística (p<0,05); ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística (p<0,05).

Tabela 8 - Valores de média $\pm$ desvio padrão do leucograma de camundongos Balb/c tratados com o extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* em dose única por via oral 3, 7 e 14 dias pós tratamento.

Variáveis	Dias	GRUPOS				
		G1 Controle	G2 (4000 mg kg ⁻¹)	G3 (6000 mg kg ⁻¹)	G4 (8000 mg kg ⁻¹)	G5 (10.000 mg kg ⁻¹)
Leucócitos totais (mm ³)	03	93,50 $\pm$ 17,03aA	68,67 $\pm$ 7,62abA	46,33 $\pm$ 6,22bB	50,00 $\pm$ 8,08abA	27,00 $\pm$ 1,15bB
	07	45,50 $\pm$ 6,64bB	57,33 $\pm$ 7,36abA	105,0 $\pm$ 1,53aA	69,30 $\pm$ 14,4abA	73,3 $\pm$ 15,2abA
	14	69,7 $\pm$ 21,7aB	63,25 $\pm$ 3,40aA	80,3 $\pm$ 21,9aAB	93,3 $\pm$ 17,4aA	62,5 $\pm$ 3,71aA
Eosinófilo (%)	03	6,5 $\pm$ 0,28aA	3,0 $\pm$ 0,57bA	2,0 $\pm$ 0,57bA	1,66 $\pm$ 0,33bA	1,66 $\pm$ 0,66bA
	07	2,0aB	2,33 $\pm$ 0,88aA	2,33 $\pm$ 0,88aA	3,0 $\pm$ 0,57aA	1,33 $\pm$ 0,66aA
	14	4,0aB	3,75 $\pm$ 0,94aA	3,0 $\pm$ 0,70aA	2,75 $\pm$ 0,62aA	1,0 $\pm$ 0,57aA
Neutrófilo (%)	03	23,0 $\pm$ 8,66aA	34,0 $\pm$ 6,43aA	11,0 $\pm$ 2,52aB	15,33 $\pm$ 1,45aA	15,67 $\pm$ 2,96aB
	07	36,0 $\pm$ 1,73aA	24,0 $\pm$ 1,53aA	20,67 $\pm$ 6,98aA	21,33 $\pm$ 3,28aAB	27,67 $\pm$ 3,84aA
	14	25,0 $\pm$ 2,52aA	24,50 $\pm$ 6,20aA	24,75 $\pm$ 3,42aAB	25,25 $\pm$ 6,21aB	27,50 $\pm$ 3,57aA
Linfócito (%)	03	57,0 $\pm$ 3,46bB	59,67 $\pm$ 6,06bA	82,0 $\pm$ 1,0aA	78,66 $\pm$ 0,88aA	78,0 $\pm$ 2,52aA
	07	55,50 $\pm$ 3,18aA	63,0 $\pm$ 3,21aA	70,33 $\pm$ 6,17aA	69,0 $\pm$ 2,65aA	66,0 $\pm$ 5,69aB
	14	64,67 $\pm$ 2,60aAB	59,0 $\pm$ 7,56aA	64,25 $\pm$ 5,36aA	63,0 $\pm$ 6,62aA	63,0 $\pm$ 2,74aB
Monócito (%)	03	10,0 $\pm$ 4,04aA	3,0 $\pm$ 0,57aA	5,0 $\pm$ 1,73aA	4,0 $\pm$ 0,57aB	4,66 $\pm$ 0,88aB
	07	6,0 $\pm$ 1,15aA	10,67 $\pm$ 2,67aAB	6,67 $\pm$ 2,85aA	6,67 $\pm$ 1,33aAB	4,67 $\pm$ 1,20aAB
	14	6,33 $\pm$ 0,88aA	12,50 $\pm$ 1,94aB	8,0 $\pm$ 2,55aA	9,0 $\pm$ 1,47aA	8,50 $\pm$ 1,19aA
Basófilo (%)	03	3,5 $\pm$ 0,86aA	0,33 $\pm$ 0,33bA	-	0,33 $\pm$ 0,33b	-
	07	0,5 $\pm$ 0,28aB	0,33 $\pm$ 0,33aA	-	-	0,33 $\pm$ 0,33a
	14	-	-	-	-	-

Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$); ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$).

Alterações hematológicas e bioquímicas significantes são parâmetros que identificam sinais de intoxicação (CUNHA, 2009), no entanto não foram verificadas alterações bioquímicas (Tabela 9) consideráveis quando comparados ao grupo controle, com dados semelhantes aos descritos como valores de referências para espécie (ALMEIDA et al., 2008), apenas redução de alguns parâmetros foram observados entre os grupos estudados.

Redução de ALT ocorreu nos animais do grupo G4 e G5 três dias após receber 8000 e 10.000 mg kg⁻¹ de EHMC ($p > 0,05$), já a diminuição dos níveis da fosfatase alcalina foi observada em camundongos do grupo G3 após 3 dias do EHMC. Redução da creatinina foi observada entre os animais do grupo G3, G4 e G5 após três dias da ingestão do EHMC, já os níveis de uréia reduziram em camundongos do grupo G4 que recebeu 8000 mg kg⁻¹ após 14 dias, porem apesar da redução, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao grupo controle ($p > 0,05$).

Dessa forma as alterações bioquímicas descritas não foram suficientes para causar lesões graves, considerando que os níveis normais de AST e ALT indicaram que não houve injúria hepática, uma vez que efeitos tóxicos no fígado podem ser identificados pelos elevados níveis de transaminases (SHANKER et al., 2002) e os níveis normais dessas enzimas descartam a presença de uma lesão hepática aguda (RODRIGUES, 1998).

AST e ALT são enzimas sensíveis a lesão hepatocelular, a liberação de grandes quantidades dessas enzimas no sangue está associado com necrose centrolobular, degeneração e estado de desempenho reduzido do fígado (RAJESH; LATHA, 2004), já a redução desses parâmetros indicam potencial efeito hepatoprotetor da *M. charantia*. Resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo foi relatado por Zahra et al. (2012) ao administrar por via oral o extrato aquoso preparado a partir da fruta de *M. charantia*, em coelhos com intoxicação hepática, observando redução dos parâmetros de AST e ALT após 10 dias de administração oral. Redução significativa da uréia, creatinina, ALT, AST, fosfatase alcalina, além dos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos no sangue também foi observado por Batran et al. (2006) ao administrar por via subcutânea extrato do fruto de *M. charantia* durante 30 dias.

Tabela 9 - Valores de média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos de camundongos Balb/c tratados com o extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* em dose única por via oral 3, 7 e 14 dias pós tratamento.

Variáveis	Dias	GRUPOS				
		G1 Controle	G2 (4000 mg kg ⁻¹)	G3 (6000mg kg ⁻¹)	G4 (8000mg kg ⁻¹)	G5 (10.000mg kg ⁻¹)
AST (U ml ⁻¹)	03	188,0 $\pm$ 4,62aA	140,0 $\pm$ 24,0aA	164,33 $\pm$ 1,20aA	188,0 $\pm$ 42,8aA	93,33 $\pm$ 7,31aB
	07	169,0 $\pm$ 15,0aA	137,0 $\pm$ 10,8aA	152,3 $\pm$ 40,0aA	146,0 $\pm$ 18,0aAB	177,7 $\pm$ 23,8aA
	14	165,3 $\pm$ 29,2aA	191,0 $\pm$ 35,0aA	185,8 $\pm$ 30,9aA	101,75 $\pm$ 8,36aB	132,3 $\pm$ 23,9aAB
ALT (U ml ⁻¹)	03	191,0 $\pm$ 5,77abA	279,7 $\pm$ 83,6aA	125,0 $\pm$ 33,9abA	70,3 $\pm$ 13,7bA	68,0 $\pm$ 14,6bA
	07	126,0 $\pm$ 31,2aA	226,7 $\pm$ 57,0aA	80,33 $\pm$ 9,68aA	130,7 $\pm$ 30,7aA	99,0 $\pm$ 29,5aA
	14	145,0 $\pm$ 43,5aA	161,5 $\pm$ 44,0aA	141,3 $\pm$ 56,0aA	148,5 $\pm$ 31,6aA	131,0 $\pm$ 32,7aA
Creatinina (μ g/dl)	03	0,70 $\pm$ 0,05aAB	0,73 $\pm$ 0,06aA	0,53 $\pm$ 0,08aA	0,50 $\pm$ 0,0aB	0,56 $\pm$ 0,08aA
	07	0,85 $\pm$ 0,02aA	0,70 $\pm$ 0,05aA	0,53 $\pm$ 0,08aA	0,60 $\pm$ 0,05aAB	0,63 $\pm$ 0,12aA
	14	0,60 $\pm$ 0,11aB	0,65 $\pm$ 0,08aA	0,60 $\pm$ 0,05aA	0,70 $\pm$ 0,04aA	0,62 $\pm$ 0,07aA
Uréia (μ g dl ⁻¹)	03	60,0 $\pm$ 7,51aA	65,33 $\pm$ 3,33aA	63,33 $\pm$ 0,88aA	56,33 $\pm$ 5,24aA	68,67 $\pm$ 6,67aA
	07	51,50 $\pm$ 0,86aA	61,67 $\pm$ 2,03aAB	58,67 $\pm$ 6,44aA	62,33 $\pm$ 1,45aA	67,33 $\pm$ 7,42aA
	14	58,67 $\pm$ 5,84aA	53,50 $\pm$ 3,75aB	58,0 $\pm$ 5,58aA	51,0 $\pm$ 8,12aA	60,0 $\pm$ 2,83aA
Fosfatase	03	141,0 $\pm$ 24,8abAB	172,7 $\pm$ 10,2abA	74,7 $\pm$ 11,7bB	186,0 $\pm$ 35,4aA	211,3 $\pm$ 12,4aA
Alcalina	07	90,5 $\pm$ 15,9aB	196,7 $\pm$ 21,2aA	125,3 $\pm$ 25,4aAB	113,3 $\pm$ 34,4aA	134,7 $\pm$ 22,3aB
(U l ⁻¹)	14	187,7 $\pm$ 50,1aA	169,3 $\pm$ 31,3aA	183,0 $\pm$ 23,0aA	136,5 $\pm$ 21,7aA	167,0 $\pm$ 9,35aAB

AST: Aspartato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística (p<0,05); ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística (p<0,05).

Segundo Loomis (1996) extratos fitoterápicos administrados por via oral apresentam maior margem de segurança quando comparados com administração intraperitoneal, uma vez que por via oral pode ocorrer uma pobre absorção da substância ou ainda esta ser detoxificada através da passagem pelo fígado, enquanto que por via intraperitoneal ocorre a absorção sistêmica e desta forma os efeitos tóxicos mostram-se mais intensos e mais precoces.

Além da via de administração, outro fator importante a ser considerado na fitoterapia é a parte da planta utilizada no teste de toxicidade, pois podem apresentar efeitos diferentes quando testadas.

Considerando a ausência de alterações bioquímicas e lesões hepáticas e renais em camundongos Balb/c do grupo G2 que recebeu 4000 mg kg⁻¹ do extrato hidroalcoólico de folhas de *M. charantia* pode-se sugerir com segurança que doses abaixo do valor referido são consideradas seguras para uso em ovinos naturalmente infectados.

5.4 TESTE DE REDUÇÃO DE CONTAGEM DE OVOS NAS FEZES

A dose estabelecida para avaliação do extrato hidroalcoólico de *M. charantia* (EHMC) em ovinos foi de 350 mg Kg⁻¹ definida com base no teste toxicológico. Na avaliação do EHMC sobre os percentuais de redução da carga parasitária *in vivo* em ovinos naturalmente infectados, observou-se redução de 51% (Tabela 10) na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) do grupo tratado com o EHMC quando comparado ao OPG do dia zero 14 dias pós tratamento.

Todos os anti-helmínticos comerciais testados apresentaram baixa eficácia, demonstrando multirresistência parasitária, segundo Oliveira et al. (2014), a resistência é considerada múltipla quando presente a mais de um princípio ativo, fato observado no presente estudo, porém o fármaco de melhor resultado foi o Levamisol que reduziu 78% do OPG 14 dias pós administração.

Quando se compara o grupo que recebeu EHMC com os grupos tratados com princípios comerciais observou-se semelhanças estatísticas quando comparado aos efeitos anti-helmíntico da Ivermectina, Levamisol e Albendazol ($p < 0,05$) 14 dias pós tratamento. Ao analisar a atividade anti-helmíntica de *M. charantia* Sen et al. (2014), corroboram com o presente estudo ao descrever similaridade entre a ação do extrato de *M. charantia* e o Albendazole, promovendo paralisia do nematóides.

Tabela 10 - OPG médio e percentual de redução (%) da contagem de ovos nas fezes de ovinos naturalmente infectados tratados com EHC comparado com o Levamisol, Ivermectina e Albendazol.

Tratamentos	OPG Dia zero	OPG Dia 7	OPG Dia 14	OPG Dia 21	Redução de OPG (%) em relação ao dia zero			Redução (%) em relação ao Grupo 0		
					7 dias	14 dias	21dias	7 dias	14 dias	21dias
G1 – controle	1575Aa	1706Aa	2635Aa	2640Aa	0	0	0	-	-	-
G5 - Extrato	1758Aa	912ABCb	868Bb	1308Bab	48	51	26	47	67	50
G3 –levam	1639Aa	183Cc	364Bbc	988Bab	89	78	40	89	86	63
G4 – Ivermec	1063Aa	475BCa	456Ba	750Ba	55	57	29	72	83	72
G4 - Albenda	1360Aa	1422ABa	725Ba	866Ba	0	47	36	17	72	67

^{AB} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna ($p < 0,05$); ^{ab} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha ($p < 0,05$). G0: grupo controle (água + Tween 80 diluído a 3%); G1: ivermectina 0,08% ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$); G2: Levamisol ($7,5 \text{ mg kg}^{-1}$); G3: Albendazol (10 mg kg^{-1}); G4: EHC (350 mg kg^{-1}).

Na coprocultura, os gêneros observados parasitando ovinos foram *Haemonchus* (90%), *Trichostrongylus* (10%) apresentando uma redução de 54% e 69 da excreção de ovos de *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp., respectivamente no grupo tratado com EHMC 14 dias pós administração. Segundo Lahlou (2002), o metabólito secundário presente em *Origanum compactum* conhecido como flavonóides, encontrado em *M. charantia*, é o principal responsável pelo efeito anti-helmíntico. Estudos realizados por Simon et al. (2012) também descrevem os flavonóides como principal responsável pela ação antiparasitária encontrada em *Combretum molle* administrado em ovinos monoinfectados reduzindo 96,2% da excreção de ovos de *H. contortus* quando fornecido 2000 mg kg⁻¹.

A eficácia anti-helmíntica de *M. charantia* *in vivo* é descrita por alguns autores, no entanto são utilizadas doses distintas para avaliação dificultando sua comparação. Porém, resultado acima do encontrado no presente estudo foi relatado por Almeida et al. (2007) ao testarem dose e frequência superior, demonstrando redução de 94,17% aos 30 dias no OPG de caprinos naturalmente infectados quando fornecido 45g/10Kg de *M. charantia* por três dias consecutivos. Eficácia inferior foi observado por Brito-Júnior et al. (2011) e Girão et al. (1998) ao descreverem redução de 40% (5,85 mg kg⁻¹) e 43% (50g/animal) do número de ovos expelidos nas fezes de caprinos após 30 dias da administração de *M. charantia*.

Estudos com fitoterápicos demonstram eficácia anti-helmíntica bastante diversificada, Andrade et al. (2014) descreveram redução de 41% da carga parasitária em ovinos avaliados com extrato de raiz de *Tarenaya spinosa* (3000 mg/animal) fornecido semanalmente por cinco semanas. Uma maior eficácia foi encontrada por Grade et al. (2008) ao administrar 358 mg.kg⁻¹ de *Albizia anthelmintica* em ovinos naturalmente infectados reduzindo 66,5% quando o extrato encapsulado foi fornecido. Outros estudos também apontam redução de 50% da excreção de ovos nas fezes quando administrados 1700 mg kg⁻¹ de extrato aquoso de *Agave sisalana* (sisal) 9 dias pós tratamento em caprinos (BOTURA et al., 2011).

Na busca por isolar e testar substâncias provenientes de fitoterápicos está sendo avaliados óleos essenciais e extratos encapsulados, no entanto resultados com esses isolados também apresentam eficácia baixa ou moderada em testes *in vivo*. Resultados observado por Macedo et al. (2009; 2010) ao avaliar o óleo essencial de *Eucalyptus stageriana* e *E. citriodora* encontraram redução de 76,5% e 60,7% respectivamente na excreção de ovos de nematóides gastrintestinais em ovinos. Resultado satisfatório com fitoterápicos também foram descritos com eficácia de 97,4% na redução do número de ovos nas fezes de ovinos quando

administrado emulsão de óleo de laranja 600 mg kg⁻¹ em dose única 14 dias pós administração.

Apesar de alguns resultados com fitoterápicos estarem abaixo dos padrões recomendado pela WAAVP, ressalta-se que muitos anti-helmínticos comerciais não reduzem os níveis de infecção desejado, representando um problema na criação de pequenos ruminantes em todo o mundo (BARRÈRE et al., 2013), inclusive na região Nordeste brasileira onde esse fenômeno é observado (SANTOS et al., 2013) estimulando pesquisas na busca alternativa de controle parasitário (RIBEIRO et al., 2013).

É importante ressaltar que atualmente a busca por novas drogas fitoterápicas tem por objetivo reduzir a carga parasitária em longo prazo e de forma sustentável e não a eliminação de 100% da população de nematóides gastrintestinais em curto prazo como prometem os anti-helmínticos comerciais (HOSTE; TORRES COSTA, 2011). Por outro lado, os produtos naturais apresentam várias vantagens, como biodegradável, autossustentável, além de ser constituído de diversos compostos bioativos que podem agir de forma sinérgica atuando diferentemente em uma grande variedade de nematóides, diminuindo o número de parasitas resistentes diluindo seus alelos, para acasalar com adultos resistentes que sobrevivem ao tratamento (BARTRAM et al., 2012).

Dessa forma, a redução do OPG observada para o EHMC pode ser de grande valia para a produção de pequenos ruminantes e controle de nematóides gastrintestinais diminuindo a resistência, assim favorecendo a produção de animais orgânicos, ajudando ao produtor agregar valor ao seu produto.

6 CONCLUSÕES

A análise fitoquímica o extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* apresentou maior prevalência de compostos fenólicos do grupo dos flavonóides;

M. charantia mostrou-se um anti-helmíntico eficaz dose dependente para *Haemonchus contortus*;

No teste toxicológico *M. charantia* apresentou baixa toxicidade em dose de 4000 mg kg⁻¹ não apresentaram efeito tóxico, sendo determinada uma dose de 350 mg kg⁻¹ para utilização em ovinos;

No teste *in vivo* *M. charantia* promoveu redução do número de ovos nas fezes de ovinos naturalmente infectados, constituindo alternativa para o controle de nematóides gastrintestinais em ovinos.

REFERÊNCIAS

- ACHI, Y. L. et al. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. **Veterinary Parasitology**, v.116, n.2, p.151-158. 2003.
- ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2003. 1048p.
- ADEMOLA, I. O.; ELOFF, J. N. *In vitro* anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.2, p.198-203, 2010.
- ADEWALE, O. O.; ODUYEMI, O. I.; AYOKUNLE, O. Oral administration of leaf extracts of *Momordica charantia* affect reproductive hormones of adult female Wistar rats. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine Biomedicine**, v.4, n.1, p.521-524, 2014.
- AHID, S. M. M. et al. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região oeste do rio grande do norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.212-218, 2008.
- ALAMA, S. et al. Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.464-469, 2009.
- ALMEIDA, F. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v.59, n.4, p.622-625, 2010.
- ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.80, n.4, p.72-76. 1999.
- ALMEIDA, W. V. F. et al. Avaliação de plantas medicinais em caprinos da região do semiárido paraibano naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais. **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.1-7, 2007.
- ALMEIDA, A. S. et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.44, n.6, p.429-432, 2008.
- AL-ROFAAI, A. et al. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of methanolic leaf extract of *Manihot esculenta* (cassava) on susceptible and resistant strains of *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v.190, n.2, p.127-135, 2012.
- AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASEN, C. D. **Toxicology: The basic science of poisons**. 4. ed. New York: Pergamon Press, 1991, 983p.
- AMIN, M. R.; HOQUE, M. E.; SAYED, M. A. *In vitro* anthelmintic efficacy of some indigenous medicinal plants against gastrointestinal nematodes of cattle. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v.7, n.1, p.57-61, 2009.

- ANDRADE, F. D. et al. Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico da raiz da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. No controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.10, p.942-946, 2014.
- ANUALPEC - **Anuário da Pecuária Brasileira**. Editora: São Paulo, Argos, FNP Consultoria e Comercio, p.277. 2006.
- AROSEMENA, N. A. et al. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revista Medicina Veterinária**, v.11, n.1, p.873-876, 1999.
- ATHANASIADOU, S. et al. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, v.1, n.9, p.1392-1400, 2007.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n.4, p. 631-639, 2004.
- BARRÈRE, V. et al. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistance *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **International journal Parasitology**, v.62, n.5, p.464-470, 2013.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade**. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p.57-67, 2003.
- BATISTA, L. M. et al. Atividade ovicida e larvicida in vitro das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v.9, n.2, p.67-73, 1999.
- BARTRAM, D. J. et al. The role of combination anthelmintic formulation in the sustainable control of sheep nematode. **Veterinary Parasitology**, v.186, n.4, p.151-158, 2012.
- BATRAN, S. A. S.; GENGAHI, S.; SHABRAWY, O. A. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, n.2, p.236-242, 2006.
- BELOIN, N. et al. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Curcubitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.2, p.49-55, 2005.
- BIZIMENYERA, E. S. et al. *In vitro* activity of *Peltophorum africanus* Sond. (Fabacea) extracts on the eggs hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus columbriformis*. **Veterinary Parasitology**, v.142, n.4, p.336-343, 2006.
- BLAKE, N.; COLES, G. Flock cull due to anthelmintic-resistant nematodes. **The Veterinary Record**, v.161, n.1, p.36, 2007.
- BORGES, C. C. L. Atividade in vitro de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitologia Latinoamericana**, v.58, n.4, p.142-147, 2003.

BOTURA, M. B.; et al. In vivo anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v.177, n.2, p.104-110, 2011.

BRACA, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.79, n.2, p.123-125, 2008.

BRASIL. **Lei nº 10,831 de 23 de dezembro 2003**. Dispõe sobre o sistema orgânico de produção agropecuária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 dez. 2003. Seção 1, pág.8.

BRITO-JÚNIOR, L. et al. Estudo comparativo da ação anti-helmíntica da batata de purga (*Operculina hAMILTONII*) e do melão de são caetano (*Momordica charantia*) em caprinos (*Capra hircus*) naturalmente infectados. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.4, p.797-802, 2011.

BRITO, A. R. M. S. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo**. Campinas: UNICAMP, 1994, 124p.

BRITO-JUNIOR, L. et al. Estudo comparativo da ação anti-helmíntica da batata de purga (*Operculina hAMILTONII*) e do melão de são caetano (*Momordica charantia*) em caprinos (*Capra hircus*) naturalmente infectados. **Ciências e agrotecnologia**, v.35, n.4, p.797-802, 2011.

BROM, R. V. D.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VALLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.209, n.1, p. 278-280, 2015.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.154, n.1, p.167-170, 2008.

_____. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CARLINI, E. A. Screening farmacológico de plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Biologia**, v.32, n.2, p.265-274, 1972.

CEZAR, A. S.; BIANCHIN, J. B. C. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2083-2091, 2008.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. **Manual Prático: metodologia de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília: EMBRAPA, 2011, 153p.

CHAGAS, A. C. S. et al. *Haemonchus contortus*: a multiple resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, v.62, n.1, p.1-6, 2013.

CHAN, L. L. et al. Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*) fed rats is associated with increased lipid oxidative enzyme activities and uncoupling protein expression. **British Journal of Nutrition**, v.135, n.11, p.2517-2523, 2005.

CHEN, Q.; LI, E. T. Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*) fed rats is associated with lower tissue triglyceride and higher plasma catecholamine's. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.1, p.747-754, 2005.

CHUN, L. J. et al. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. **Journal Clinical Gastroenterology**, v.43, n.4, p.342-349, 2009.

CLIMENI, B. S. O. C. et al. Hemoncose ovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.11, n.11, 2008.

COELHO, W. A. C. et al. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.589-599, 2010.

COLES, G. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, n.2, p.35-44, 1992.

_____. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.136, n.4, p.167-185, 2006.

COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; PILATI, C. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.1, p.31-38, 2000.

CORDEIRO, L. N. et al. Efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.4, p.421-426, 2010.

COSTA, J. G. M. et al. Antibacterial activity of *Momordica charantia* (Curcubitaceae) extracts and fractions. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v.2, n.1, p.45-51, 2010.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.65-71, 2011b.

_____. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido Brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, n.7, p.563-568, 2009.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2, p.403-411, 2009.

CUNNICK, J. E. et al. Induction of tumor cytotoxic immune cells using a protein from the bitter melon (*Momordica charantia*). **Cellular Immunology**, v.126, n.2, p.278-289, 1990.

DAS, P.; SINHABADU, S. P.; DAM, P. Screening of Anthelmintic Effects of Indian Plant Extracts: A Preliminary Report. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.12, n.3, p.299-301, 2006.

ELOFF, J. N.; McGAW, L. J. Methods for Evaluating Efficacy of Ethnoveterinary Medicinal Plants. In: KATERERE, D. R.; LUSEBA, D. **Ethnoveterinary Botanical Medicine: Herbal medicine for animal health**. Editora Boca Raton: Taylor & Francis, 2010, 450p.

FELLOWES, R. et al. Classical neurotransmitters in the ovijector of *Ascaris suum*: localization and modulation of muscle activity. **Parasitology**, v.121, n.3, p.325-336, 2000.

FERREIRA, L. E. et al. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v.134, n.3, p.327-332, 2013.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 502p.

FONTANA, R. J. Acute liver failure due to drugs. **Semin Liver Disease**, v.28, n.2, p.175-189, 2008.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.12, p.1391-1402, 2013.

FORTES, F. S. et al. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.183-187, 2013.

FRED-JAIYESIMI, A. A.; ADEPOJU, A.; EGBEBUNMI, O. Anthelmintic activities of chloroform and methanol extracts of *Buchholzia coriacea* Engler seed. **Parasitology Research**, v.109, n.2, p.441-444, 2011.

FRIEDMAN, S. L.; ARTHUR, M. J. P. Reversing hepatic fibrosis. **Science & Medicine**, v.8, n.4, p.194-205, 2002.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GAYOTTO, V. A. F. A. **Doenças do fígado e vias biliares**. Rio de Janeiro: Atheneu. 2001, 664p.

GIRÃO, E. S. et al. **Avaliação de plantas medicinais com efeito anti-helmíntico para caprinos**. EMBRAPA, n.78, p.1-9, 1998.

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, n.4, p.308-320, 2006.

GOMES, R. V. R. S. et al. Ação antiparasitária *in vitro* dos extratos etanólicos de *Oeperculina hamiltonii* (batata de purga) e *Momordica charantia* (melão de são caetano) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos do semi-árido paraibano. **Acta Veterinária Brasília**, v.4, n.2, p.92-99, 2010.

_____. Análise fitoquímica de extratos botânicos utilizados no tratamento de helmintoses gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 172-177, 2011.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Commonw Sci and Indust Organization**, v.12, n.1, p.50-62, 1939.

GRADE, J. T. et al. Anthelmintic efficacy and dose determination of *Albizia anthelmintica* against gastrointestinal nematodes in naturally infected Ugandan sheep. **Veterinary Parasitology**, v.157, n.4, p.267-274, 2008.

GROVER, J. K.; YADAV, S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, n.1, p.123-132, 2004.

HAMISSOU, M. et al. Antioxidative properties of bitter gourd (*Momordica charantia*) and zucchini (*Cucurbita pepo*). **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.25, n.9, p.641-7, 2013.

HEIMERDINGER, A. et al. Extrato alcoólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle de *Boophilus microplus* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.1, p.37-39. 2006.

HERNÁNDEZ-VILLEGAS, M. M. et al. *In vivo* anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. **Veterinary Parasitology**, v.189, n.4, p.284-290, 2012.

HEUVEL, M. J.; FIELDER, C. R. J.; KOUNDAKJIAN, G. J. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. **Chemical Toxicology**, v.28, n.7, p.469-483, 1990.

HOLT, M. P., CHENG, L., JU, C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. **Journal of Leukocyte Biology**, v.84, n.6, p.1410-1421, 2008.

HOSTE, H. et al. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v.22, n.6, p.253-261, 2006.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.2, p.144-154, 2011.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.19, n.1, p.97-108, 2008.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v.130, n.20, p.442-446, 1992.

_____. A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongilosis: comparison with fecal cultures. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.48, n.1, p.63-71, 1984.

HUSSAIN, S.; SHARMA, V.; SAXENA, A. K. Fruit part of *Momordica charantia* possesses remarkable *in vitro* anticancer efficiency against eight human cancer cells. **International Journal of Plant Sciences**, v.8, n.1, p.140-143, 2013.

HUSNA, R. N. et al. Acute Oral Toxicity Effects of *Momordica charantia* in Sprague Dawley Rats. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v.3, n.4, p.408-410, 2013.

ISHOLA, I. O.; AKINYEDE, A. A.; SHOLARIN, A. M. Antidepressant and anxiolytic properties of the methanolic extract of *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) and its mechanism of action. **Drug Research**, v.64, n.7, p.368-76, 2014.

JILKA, C. et al. *In vivo* antitumor activity of the bitter melon (*Momordica charantia*). **Cancer Research**, v.43, n.11, p.5151-5155, 1983.

KAMINSKY, R. et al. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, v.103, n.4, p.931-939, 2008.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.186, n.2, p.70-78, 2012.

KŘÍZOVÁ-FORSTOVÁ, V. et al. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: The consequences and potential risks. **Research in Veterinary Science**, v.91, n.3, p.333-341, 2011.

KUMAR D. S. et al. A medicinal potency of *Momordica charantia*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.1, n.2, p.95-100, 2010.

KUNSA, B.; ABEBE, G. Multi antielmintic resistance of goat farm in Hawassa (South Ethiopia). **Tropical Animal Health and Production**, v.41, p.655-662, 2009.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulina, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v.18, n.7, p.885-936, 1988.

LAHLOU, M. Potencial of *Origamum compactum* as a cercricides in Marrocos. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.96, n.1, p.587-593, 2002.

LANUSSE, C. E. **Farmacologia dos compostos anti-helmínticos**. In: CHARLES, T. P. Controle de nematóides gastrintestinais em ruminantes. Juiz de Fora: Terezinha Padilha, 1996. p.1-44.

LANUSSE, C. E.; ALVARES, L. I.; LIFSCHITZ, A. L. Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica. In: CAVALTANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. (Org.). **Doenças Parasitárias de Caprinos e Ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa, 2009. p.549-595.

LEE-HUANG, S. et al. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. **Gene**, v.161, n.2, p.151-156, 1995.

LEIMANN, F. V. et al. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science and Engineering**, v.29, n.2, p.430-46, 2009.

LIVEIRA, P. A. et al. Eficácia de diferentes fármacos no controle parasitário em ovinos. **Science and Animal Health**. v.2, n.2, p.126-136, 2014.

LOOMIS, T. A.; HAYES, A. W. **Loomis's Essentials of Toxicology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1996, 282p.

MABEKU, L. B. K. et al. Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.3, p.598-606, 2007.

MACEDO, I. T. F. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globules* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F. et al. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.173, n.2, p.93-98, 2010.

_____. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.3, p.223-227, 2011.

_____. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, v.190, n.4, p.504-509, 2012.

MADA, S. B. et al. Hepatoprotective Effect of Momordica charantia Extract against CCl₄Induced Liver Damage in Rats. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.4, n.3, p.368-380, 2014.

MBAKA, G. O. et al. Acute and sub-chronic toxicity studies of the ethanol extract of the leaves of *Sphenocentrum jollyanum* (Menispermaceae). **Agriculture and Biology Journal of North America**, v.1, n.3, p. 265-272, 2010.

MARTIN, R. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**. v.154, n.1, p.11-34, 1997.

MATOS F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa universitária da Universidade Federal do Ceará, 1997. 141p.

MATTOS, M. J. T. et al. Influência do parasitismo por nematódeos sobre o perfil hematológico de caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p.133-135, 2005.

MAX, R. A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.2, p.138-143, 2010.

- 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.
- MONTEIRO, M. V. B. et al. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.182, n.4, p.259-263, 2011.
- MWAMBETE, K. D. The *in vitro* antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: A Tanzania medicinal plant. **Africa Health Sciences**, v.9, n.1, p.34-39, 2009.
- NEE, M. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Cucurbitaceae.Rodriguésia. **Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v.58, n.3, p.703-707, 2007.
- NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.3, p.330-338, 2009.
- NETO, H.C.C.F.; SANTOS, B.F. Fármacos usados em animais de laboratório anestésicos e analgésicos. In: CEUA-FIOCRUZ. **Manual de utilização de animais/ FIOCRUZ**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2008. Cap.5, p.22-23.
- NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; MOLENTO, M. B. **Determinação da Eficácia Antihelmíntica em Rebanhos Ovinos: Metodologia da Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário**. São Paulo: EMBRAPA Pecuária Sudeste, 2009. 27p.
- NIJVELDT, R. J. et al. 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.
- OLIVEIRA, L. M. B. et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.159, n.1, p.55-59, 2009.
- PALACY, C. et al. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affect-ed sheep and genotypic evaluation of the parasite. **Veterinary journal**, v.183, n.1, p.68-74, 2010.
- PATEL, R. et al. Analgesic and antipyretic activities of *Momordica charantia* Linn. Fruits. **Journal Advanced Pharmaceutical Technology Research**, v.1, n.4, p.415-418, 2010.
- PAUL, A.; RAYCHAUDHURI, S. S. Medicinal uses and molecular identification of two *Momordica charantia* varieties – a review. **Electronic Journal of Biology**, v.6, n.2, p.43-51, 2010.
- PEREIRA, B. S. et al. Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.3, p.311-316, 2010.
- PITCHAKARN, P. et al. Induction of G1 arrest and apoptosis in androgen-dependent human prostate cancer by Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf. **Cancer Letters**, v.306, n.2, p.142-150, 2011.

PONGTHANAPISITH, V. et al. Antiviral Protein of *Momordica charantia* L. Inhibits Different Subtypes of Influenza A. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, n.1, p.2-6, 2013.

PRASHANTHI, R.; MOHAN, N.; SIVA, G. V. Wound healing property of aqueous extract of seed and outer layer of *Momordica charantia* L. on albino rats. **Indian Journal Sciences Technology**, v.5, n.1, p.1936-1940, 2012.

PRESIDENTE, P. J. A. Methods for the detection of resistance to anthelmintics. In: ANDERSON, N., WALLER, P. J. **Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs**. Australia: CSIRO, 1985. p.13-27.

RADHAKRISHNAN, R. et al. Neuropharmacological actions of *Portulaca oleraceae* L. v. sativa (Hawk). **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.2, p.171-176, 2001.

RAJESH, M.G.; LATHA, M.S. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.99-104, 2004.

RAMAIAH, S. K.; APTE, U.; MEHENDALE, H. M. Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v.29, n.8, p.1088-1095, 2001.

RAMAN, A.; LAU, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Phytomedicine**, v.2, n.4, p.349-362, 1996.

RASTOGI, T. et al. Comparative Studies on Anthelmintic Activity of *Moringa Oleifera* and *Vitex Negundo*. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v.2, n.2, p.181-182, 2009.

REPAB. Règlement Européen des Productions Animales Biologiques. **Cahier des Charges concernant le mode de production Biologique des Animaux**. Direction des politiques économiques et internationale, Ministère de l'Agriculture et la Pêche, France. 2007.

RIBEIRO, W. L. C. et al. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v.135, n.1, p.24-29, 2013.

ROBBINS, L. S.; ANGELL, M. **Patologia Básica**. México: Saunders Company, 1973. p.467-499.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, n.1, p.99-102, 1950.

RODRIGUES, E. R.; PEDRAZZI, A. H. P.; BASTOS, J. K. Acute preclinical toxicity study of *Zanthoxylum naranjillo* extract. **Phytotherapy Research**, v.12, n.7, p.512-516, 1998.

RODRIGUES et al. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Caderno de Pesquisa**, v.17, n.2, p.69-76, 2010.

RUSSAIN, M. A.; SURESH, D. K.; GUPTA, R. M. Hepatoprotective activity of ethanolic extract fractions of *Momordica charantia* fruit, against alcohol induced hepatotoxic rats. **Advances In Pharmacology And Toxicology**, v.15, n.1, p.43-48, 2014.

SANGSTER, N. C.; SONG, J.; DEMELER, J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. **Parasitology**, v.131, n.1, p.179-190, 2005.

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.7, n.1, p.139-144, 2012.

SANTOS, J. M. L. et al. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.199, n.4, p.160-164, 2013.

SARGISON, N. D. et al. Failure of moxidectin to control benzimidazole-, levamisole- and ivermectin-resistant *Trichostrongylus axei* in a sheep flock. **The Veterinary Record**, v.156, n.4, p.105-109, 2005.

SAULAI, M. et al. Life-trait evolution of a parasite strongyle nematode in response to host resistance: an experimental approach using *Haemonchus contortus* in black belly lambs. **Genetic Selection Evolution**, v.33, n.1, p.525-544, 2001.

SCHMOURLO, G. et al. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.563-568, 2005.

SCOTT, I.; POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; SMITH, G.; ADLINGTON, B.; MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus axei* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v.198, n.1, p. 166-171, 2013.

SEN, S. et al. In vitro anthelmintic and antioxidant potential of fruits of *Momordica charantia*: A comparative study. **Indian Journal Health Sciences**, v.7, n.2, p.113-117, 2014.

SHAHADAT, H. M. et al. Comparative efficacy of korolla (*Momordica charantia*) extract and Ivermec® pour on with their effects on certain blood parameters and body weight gain in indigenous chicken infected with *Ascaridia galli*. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v.6, n.2, p.153-158, 2008.

SHANKER, N. K. R. P. et al. An evaluation of toxicity of *Taxus baccata* Linn. (Talispatra) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.1, p.69-73, 2002.

SHETTY, A. K. et al. Effect of bitter melon (*Momordica charantia*) on glycaemic status in streptozotocin induced diabetic rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.60, n.1, p.109-112, 2005.

SIMON, M. K. et al. The anthelmintic effect of aqueous methanol extract of *Combretum molle* (R. Br. x. G. Don) (Combretaceae) in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.187, n.2, p.280-284, 2012.

SOKAR, Z. et al. Toxic effect of *Herniaria cinerea* DC. On the stomach, intestine, lung, and kidney of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.3, p.149-153, 2003.

SOUSA, J. P. B. et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.85-93, 2007.

SOUZA, M. F. et al. Gastrointestinal parasites of sheep, municipality of Lajes, Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.1, p.71-73, 2012.

SUBRAMANIAM, J.; MURUGAN, K.; KOVENDAN, K. Larvicidal and pupicidal efficacy of *Momordica charantia* leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). **Journal Biopesticides**, v.5, n.1, p.163-169, 2012.

SURESH, K. G.; SHETTY, A. K.; SALIMATH, P. V. Modulatory effect of bitter gourd (*Momordica charantia* Linn.) on alterations in kidney heparin sulfate in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, n.2, p.276-83, 2008.

SUTHERLAND, I. A. et al. Multiple species of nematodes resistant to ivermectin and a benzimidazole-levamisole combination on a sheep farm in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.56, n.2, p.67-70, 2008.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.183-194, 2002.

THENMOZHI, A. J.; SUBRAMANIAN, P. Antioxidant Potential of *Momordica charantia* in Ammonium Chloride-induced Hyperammonemic Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, n.1, p.1-7, 2011.

TJOKROPANOTO, R.; NATHANIA, M. Y. Anthelmintic effect of ethanol extract of pare leaf (*Momordica charantia* L.) against female *Ascaris suum* worm *in vitro*. **Journal Medika Planta**, v.1, n.4, p.33-39, 2011.

TRAVERSA, D. et al. First report of multiple drug resistance in trichostrongyles affecting sheep under field conditions in Italy. **Parasitology Research**, v.101, n.6, p.1713-1716, 2007.

TUMKIRATIWONG, P. Reproductive toxicity of *Momordica charantia* ethanol seed extracts in male rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.12, n.10, p.695-704, 2014.

UENO, H. et al. **Coprocultura quantitativa para larvas de Strongyloidea em nematódeos gastrintestinais de caprinos**. Salvador: UFBA, 1997. 19p.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokio: Japan International Cooperation, 1998. 143p.

UPEYO, B. et al. Effects of feeding willow (*Salix* spp.) upon death of established parasites and parasite fecundity. **Animal Feed Science and Technology**, v.164, n.2, p.8-20, 2011.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. **O setor de agroquímicos**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.24, p.69-96, 2006.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.187, n.2, p.209-216, 2012.

VIEIRA, L. S. Alternativas para o controle da verminose gastrointestinal dos pequenos ruminantes. **Circular Técnica** 29 on line ISSN 0100-9915. EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. 10p.

_____. Fitoterápicos no Controle de Endoparasitoses de Caprinos e Ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1. n.2, p.37-43, 2007.

_____. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.2, p.49-56, 2008.

VIEIRA, L. S. et al. **Panorama do controle de endoparasitoses em pequenos ruminantes**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 2010, 37p.

_____. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, n.2, p.355-361, 2014.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE A. C. R. Resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.3, p.112-117, 1998.

VILLALBA, J. J. et al. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. **Journal of Animal Science**, v.88, n.6, p.2189-2198, 2010.

VIRDI, J. et al. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.1, p.107-111, 2003.

WAGHORN, T. S. et al. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.54, n.6, p.271-277, 2006.

WATANABE, T. et al. Molecular mechanisms of portal vein tolerance. **Hepatology Research**, v.38, n.5, p.441-449, 2008.

WILLIAMS, C. D.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. Role of caspase-1 and interleukin- 1 β in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.247, n.3, p.169-178, 2010.

WOOD, I. B. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v.58, n.3, p.181-213, 1995.

WRIGLEY, J. et al. Resistance to a triple combination of broad-spectrum anthelmintics in naturally acquired *Ostertagia circumcincta* infections in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v.54, n.1, p.47-49, 2006.

YANG, K. et al. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v.21, n.9, p.1655-60, 2000.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.59, n.3, p.113-22, 2004.

YOSHIHARA, E.; MINHO, A. P.; YAMAMURA, M. H. Anthelmintic effect of condensed tannins in gastrointestinal nematodes of sheep (*Ovis aries*). **Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.3935-3950, 2013.

YUE, C.; COLES, G.; BLAKE, N. Multi resistant nematodes on a Devon farm. **The Veterinary Record**, v.153, n.19, p.604, 2003.

ZAHRA, K. et al. Hepatoprotective role of extracts of *Momordica charantia* L. in acetaminophen-induced toxicity in rabbits. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v.22, n.2, p.273-277, 2012.

ANEXO A – Ficha produzida pelo Herbário Dardano de Andrade Lima (MOSS) após identificação botânica da *Momordica charantia*.

	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO HERBÁRIO "DARDANO DE ANDRADE-LIMA" - MOSS	
14089	<i>Momordica charantia</i> L.	
Família: Cucurbitaceae		
Determinador(es): Sousa, L.deO.F. de		Data: 2013
Local da Coleta: Brasil, Rio Grande do Norte, Mossoró, loteamento Parque Universitário. 5°11'15" S, 37°20'39" W		
Obs.: trepadeira herbácea, heliófila; folha membranácea discóides, verde; cálice verde; corola amarela; n.v. melão-de-são-caetano.		
Coletor(es): Coelho, A.C.; Souza, Z.A.A. de		3
Data: 9 VII 2013		

ANEXO B – Aprovação do comitê de ética no uso de animais em pesquisa da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA (CEUA-UFRSA).



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROJETO ENCAMINHADO A CEUA-UFRSA

Parecer N° 04/2014 PROCESSO N° 23091.005376/2013-67

Data de Entrada: 06/12/2013

Aprovado: 24/04/2014

1. Pessoal Responsável:
Silvia Maria Mendes Alid

2. Título do Projeto:

Avaliação de nanoencapsulados de Operculina hamiltonii e Momordica charantia no controle de nematôdeos gastrintestinais de caprinos.

3. Considerações:

Após apreciação pelos membros, a comissão julgou que os esclarecimentos solicitados via memorando CEUA 17/2013 foram satisfatórios e de acordo com as especificações da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRSA. A comissão julgou que o projeto tem relevância científica e verificou os animais serão submetidos a estresse ou sofrimento mínimos. O procedimento de eutanásia está de acordo com a Resolução n. 714 de 20 de junho de 2002 do CFMV. Todo o procedimento de manipulação dos animais bem como o abate serão realizados com acompanhamento técnico especializado e com o uso de material adequado e os procedimentos serão acompanhados por um membro da CEUA na data sugerida pela pesquisadora.

4. Parecer final:

FAVORÁVEL à aprovação do projeto

Mossoró, 24 de abril de 2014.

Atenciosamente,

Emanuelle Fontenele Rabelo
Profª Emanuelle Fontenele Rabelo
Presidente
Comissão de Ética no uso de animais
CEUA/UFRSA

Emanuelle Fontenele Rabelo
Presidente CEUA