



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

**BIOATIVIDADE DE PLANTAS PARA O CONTROLE DE
PARASITOS: ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO PARA
CONSERVAÇÃO DA VEGETAÇÃO DE RESTINGA**

ANA CÁSSIA MEDEIROS ARAUJO

São Luís/MA

2018

ANA CÁSSIA MEDEIROS ARAUJO

**BIOATIVIDADE DE PLANTAS PARA O CONTROLE DE
PARASITOS: ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO PARA
CONSERVAÇÃO DA VEGETAÇÃO DE RESTINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Livio Martins Costa Júnior.
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Jr.

São Luís/ MA

2018

ANA CÁSSIA MEDEIROS ARAUJO

**BIOATIVIDADE DE PLANTAS PARA O CONTROLE DE
PARASITOS: ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO PARA
CONSERVAÇÃO DA VEGETAÇÃO DE RESTINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Jr. (Coorientador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão

Dra. Naylene Carvalho Sales da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Dedico aos meus pais!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Maranhão, por toda a estrutura física que possibilitou a realização deste trabalho e, para muito além, por ser um espaço de construção profissional e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação por permitir meu aprimoramento profissional, estabelecimento de novas parcerias e novas amizades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, pela concessão de auxílio financeiro fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr, pela confiança, paciência e persistência ao longo de todos esses anos. Por ser um orientador que deixa a ciência mais leve, que se dedica ao máximo para a concretização das metas de seus orientandos, e que antes de tudo, é amigo.

Ao Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior, pela orientação, confiança ao apostar no risco de orientar alguém sem contato em sua linha de pesquisa, pela partilha de conhecimento e disponibilidade ao longo da realização deste trabalho.

À Profª Drª Cláudia Quintino da Rocha, por abraçar este trabalho e me ajudar de todas as formas possíveis na execução do mesmo. Pelas leituras, compartilhamentos e discussões de artigos; pelo incentivo, conversas e por ser um exemplo de determinação e dedicação ao próximo.

Ao Laboratório de Estudos Botânicos da UFMA e todos os integrantes pertencentes ao mesmo, por todos os momentos compartilhados nesta caminhada. Pela alegria, amizade, seriedade e dedicação aos trabalhos desenvolvidos no laboratório; pela torcida, e por todo o apoio durante a realização deste trabalho, principalmente nas coletas de campo. Agradeço de modo especial a Gustavo Lima pela parceria e por tamanha doação para que todas as coletas fossem realizadas e bem-sucedidas; sem dúvidas o resultado deste trabalho não seria o mesmo sem a sua colaboração.

Ao Laboratório de Controle de Parasitos da UFMA por todo o apoio na realização dos testes. Agradeço em especial à Carolina Rocha e Aldilene Lima, por dedicarem seus tempos já tão curtos para ajudarem em minha pesquisa, pela paciência para ensinar cada passo e por compartilharem comigo os seus conhecimentos.

Ao Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos da UFMA por toda estrutura e auxílio na elaboração dos extratos. Por confiarem tempo, espaço e estarem à disposição para quaisquer dúvidas.

Aos meus pais, Francisco e Maria Auxiliadora, por serem meus melhores guias na vida. Pelos valores e virtudes que transmitiram a mim, por me ensinarem a enfrentar desafios, por me incentivarem e construírem comigo cada novo passo. E neste mesmo parágrafo, agradeço aos meus irmãos Carla, Carol e Bruno, por dividirem todos os momentos comigo, pelas pessoas incríveis que são e pela força que me dão. Todas as minhas conquistas sempre serão frutos da força dessa família que tenho o privilégio de ter, admirar e me inspirar todos os dias.

A toda minha família, que sempre incentivou meus estudos e que sempre ajuda em tudo quanto necessário para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Em especial, agradeço à Flor Medeiros que mesmo sempre deixando claro que não estamos fazendo nada além de nossa obrigação, sempre participou ativamente de nossa educação, não medindo esforços para colaborar em nossa formação profissional.

A Reydon Rafael Reis, por estar ao meu lado durante toda esta jornada e torná-la mais leve, por fazer de meus objetivos os seus e dar o máximo de si para que eu consiga alcançá-los. Por fazer meus dias mais felizes através da amizade e do amor que a mim dedica.

À Águida Sousa, por dividirmos nossas experiências, pelas conversas, sorrisos e essa amizade de muitos anos. Também, a sua família que sempre torce por mim e compartilha a felicidade por minhas conquistas.

A José Ribamar Oliveira Filho, pela amizade, pelas discussões científicas, por sempre estar disponível para ajudar, pelo compartilhamento de metas, frustrações e alegrias acadêmicas.

A todos os amigos que fiz no PPGBio, por dividirem comigo todas as alegrias, desesperos, noites mal dormidas ou não-dormidas, auxílios e, principalmente pela união e torcida sincera. Agradeço ainda, à Dona Ana Lúcia por toda dedicação e compromisso com o Programa, além da solicitude e cuidado com que trata todos os alunos.

Além destes, agradeço a todos que se dedicam ao crescimento do Programa e a todos os professores que contribuíram diretamente e indiretamente na realização deste trabalho e na minha formação durante esta etapa. Em especial, agradeço aos professores que colaboraram na construção deste trabalho nas bancas de seminários, qualificação e defesa (Profª Dra. Catarina Miranda; Profª. Dra. Ana Lúcia Abreu; Profª Dra. Flávia do Nascimento e Dra. Naylene Carvalho).

A Deus, por tudo. Por estar ao meu lado em todas as circunstâncias, guiando-me pelos melhores caminhos. Por todas as pessoas que colocou em minha vida e todos os ensinamentos que me proporciona.

Muito obrigada!

RESUMO

Parasitos causam grandes perdas à pecuária na produção de ruminantes, destacando-se o nematódeo *Haemonchus contortus* e o carrapato *Rhipicephalus microplus* como principais agentes de doenças parasitárias nos países tropicais. As medidas convencionais de controle destes organismos são cada vez mais ineficazes, tornando iminente o desenvolvimento de novas estratégias. Investigação de recursos vegetais para este fim tem obtido resultados satisfatórios configurando-os como uma importante alternativa, no entanto espécies vegetais oriundas de ambientes ameaçados são pouco exploradas nestes estudos de bioprospecção. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antiparasitário de extratos de plantas da restinga sobre larvas de *H. contortus* e de *R. microplus* utilizando duas diferentes abordagens para a seleção das espécies a serem investigadas. Na primeira abordagem, foram considerados critérios pré-estabelecidos (dados vegetacionais) para a seleção de 19 espécies vegetais de uma restinga do nordeste brasileiro, situada no município de São José de Ribamar, no Estado do Maranhão (02°28'23" S, 044°03'13.8" W), cujas folhas foram coletadas e utilizadas na produção de extratos hidroetanólicos. Inicialmente, estes extratos foram diluídos em metanol 2% a uma concentração única de 1.200 µg/mL e testados *in vitro* por meio de Testes de inibição do desembainhamento larvar sobre larvas de *H. contortus*. Em seguida, os extratos que apresentaram eficiência igual ou maior que 50% foram submetidos a novos Testes de inibição do desembainhamento larvar, nas concentrações de 1200, 600, 300, 150 e 75 µg/mL, diluídos em metanol 2%. Para cada tratamento foram calculadas as concentrações inibitórias (CI₅₀) no software GraphPad Prism 6.0, com intervalo de confiança de 95% (IC95%). Oito extratos apresentaram efeito inibitório maior que 50% na triagem inicial. Na diluição seriada, *Terminalia lucida* destacou-se com a menor concentração inibitória (CI₅₀=53 µg/mL), seguida de *Conocarpus erectus* (CI₅₀= 340 µg/mL), *Indigofera microcarpa* (CI₅₀= 351 µg/mL) e *Paullinia pinnata* (CI₅₀= 368 µg/mL). Na segunda abordagem, selecionou-se uma espécie vegetal da restinga (*Ipomoea imperati*) com relatos de uso empírico no controle de doenças parasitárias de importância veterinária para investigação de eficácia *in vitro* sobre *R. microplus* e *H. contortus*. Extratos hidroetanólicos das folhas e do estolão de *I. imperati* foram analisados por técnicas cromatográficas e espectroscópicas para a detecção dos metabólitos secundários. Além disso, estes extratos foram avaliados *in vitro* em Testes de imersão larvar contra o carrapato *R. microplus* usando concentrações que variaram entre 5.0 e 25.0 mg/mL, diluídos em etanol a 70%; e em Testes de inibição do desembainhamento larvar contra *H. contortus*, nas concentrações de 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07 mg/mL, diluídos em metanol a 2%. A eficiência dos extratos foi demonstrada em cada teste, respectivamente, através de cálculos de concentração letal (CL₅₀) e de concentração inibitória (CI₅₀). Os extratos de *I. imperati* não apresentaram atividade relevante sobre *R. microplus*. Houve atividade significativa somente para o extrato das folhas de *I. imperati* sobre larvas de *H. contortus*, cujo efeito inibitório foi de CI₅₀=220 µg/mL. A presença de substâncias como procianidinas, kaempferol, isoquercitrina e rutina possivelmente contribuíram para o efeito anti-helmíntico observado para este extrato. Os resultados obtidos demonstram que a restinga contém espécies vegetais com potencial promissor no controle larvar de *H. contortus*.

Palavras-chave: restinga; anti-helmíntico; carrapaticida; *Terminalia lucida*; *Ipomoea imperati*.

ABSTRACT

Parasites cause great losses to livestock in the production of ruminants, especially the nematode *Haemonchus contortus* and the tick *Rhipicephalus microplus* in tropical countries. Conventional control measures of these organisms are increasingly ineffective, making the development of new strategies imminent. Investigation of vegetal resources for this purpose has obtained satisfactory results, however plant species from endangered environments are few explored in these bioprospecting studies. In this context, the objective of this work was to evaluate the antiparasitic potential of plant extracts from restinga on *H. contortus* and *R. microplus* larvae using two different approaches to the selection of the species to be investigated. In the first approach, pre-established criteria (vegetative data) were used for the selection of 19 plant species from a restinga of the Brazilian northeast, located in State of Maranhão (02° 28'23"S, 044° 03'13.8"W), whose leaves were collected and used in the production of hydroethanolic extracts. Initially, these extracts were diluted in 2% methanol at a unique concentration of 1.200 µg/mL and tested *in vitro* by larval exsheathment inhibition assays on *H. contortus* larvae. Then, the extracts that showed efficiency equal or greater than 50% were submitted to new inhibition tests at concentrations of 1200, 600, 300, 150 and 75 µg/mL, diluted in 2% methanol. For each treatment, the inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated in the GraphPad Prism 6.0 software, with a 95% confidence interval (95% CI). Eight extracts had an inhibitory effect greater than 50% in the initial screening. In the serial dilution, *Terminalia lucida* was distinguished with the lowest inhibitory concentration (IC₅₀=53 µg/mL), followed by *Conocarpus erectus* (IC₅₀=340 µg/mL), *Indigofera microcarpa* (IC₅₀=351 µg/mL) and *Paullinia pinnata* (IC₅₀=368 µg/mL). In the second approach, a restinga plant species (*Ipomoea imperati*) was selected with reports of empirical use in the control of parasitic diseases of veterinary importance for investigation of *in vitro* efficacy on *R. microplus* and *H. contortus*. Hydroethanolic extracts from the leaves and stolon of *I. imperati* were analyzed by chromatographic and spectroscopic techniques for the detection of secondary metabolites. In addition, these extracts were evaluated *in vitro* in larval immersion tests against *R. microplus* using concentrations ranging from 5.0 to 25.0 mg/mL diluted in 70% ethanol; and in larval exsheathment inhibition assays against *H. contortus* at concentrations of 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07 mg/mL, diluted in 2% methanol. The efficiency of the extracts was demonstrated in each test, respectively, by calculations of lethal concentration (LC₅₀) and inhibitory concentration (IC₅₀). The extracts of *I. imperati* showed no relevant activity on *R. microplus*. There was a significant activity only for the extract of *I. imperati* leaves on *H. contortus* larvae, whose inhibitory effect was IC₅₀=220 µg/mL. The presence of substances such as procyanidins, kaempferol, isoquercitrin, and rutin possibly contributed to the anthelmintic effect observed for this extract. The results obtained demonstrate that the restinga contains plant species with promising potential in the larval control of *H. contortus*.

Key-words: restinga; anthelmintic; acaricide; *Terminalia lucida*; *Ipomoea imperati*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

B.O.D. Incubadora para demanda bioquímica de oxigênio

CEUA - Comitê de Ética de Uso Animal

CID - Dissociação induzida por colisão

ESI – ionization por “electrospray”

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray

g – Grama

IC₅₀ – Concentração inibitória para 50% da população

IC_{95%} - Intervalo de confiança a 95%

IT – Ion-trap

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

L3 – Larvas de terceiro estágio

LC₅₀ – Concentração letal para 50% da população

MAR – Herbário do Maranhão

min – minutos

mL – Mililitro

MS/MS - Espectrometria de massas em tandem

PBS – Tampão Fosfato de Sódio

PTFE –Politetrafluoretileno

RH – umidade relativa

rpm – Rotações por minuto

UV – Ultravioleta

VIS - Visível

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Larvas dos parasitos causadores de doenças na produção pecuária. A: *Rhipicephalus microplus*; B: *Haemonchus contortus*.....17

CAPÍTULO 3

Figura 1. HPLC-UV chromatogram (254 nm) of *Ipomoea imperati* leaf (A) and stolon (B) hydroethanolic extracts.....65

Figura 2. Effect of the *Ipomoea imperati* leaf extract on *in vitro* artificial exsheathment of third-stage larvae (L₃) of *Haemonchus contortus*.....67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Plantas submetidas aos testes de inibição do desembainhamento de larvas L3 de *Haemonchus contortus*, coletadas em área de restinga do litoral brasileiro.....52

Tabela 2. Efeito anti-helmíntico *in vitro* de extratos hidroetanólicos de folhas de plantas do ecossistema de “restinga” sobre larvas L3 de *H. contortus*. Valores de IC₅₀ são apresentados para os extratos vegetais que apresentaram eficiência mínima de 50% na inibição do desembainhamento larvar de *H. contortus* na concentração de 1.200 µg/mL, com intervalos de confiança de 95% (IC 95%)......53

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Identification of compounds in *Ipomoea imperati* leaf and stolon hydroethanolic extracts by LC-ESI-IT/MS.....66

Tabela 2. Effective concentration of *Ipomoea imperati* leaf and stolon extracts required to inhibit exsheathment of 50% of the larval population of *Haemonchus contortus* (IC₅₀), with the 95% confidence interval.....68

Sumário

CAPÍTULO I.....	15
1. APRESENTAÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887) e <i>Haemonchus contortus</i> (Rudolphi, 1803): aspectos biológicos e importância econômica	17
2.2. Estratégias de Controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Haemonchus contortus</i>	19
2.3. Recursos vegetais como estratégia de controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Haemonchus contortus</i>	20
2.4. Importância da Bioprospecção para áreas de Restinga	21
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO II:	33
1. Introdução	36
2. Material e Métodos.....	38
2.1. Procedimentos de coleta.....	38
2.2. Preparo de extrato vegetal	39
2.3. Ensaio de Atividade Anti-helmíntica	39
2.3.1. Obtenção de larvas de terceiro estágio	39
2.3.2. Teste de inibição do desembainhamento larvar.....	39
2.4. Análise dos dados.....	40
3. Resultados	40
4. Discussão.....	41
Referências	46
CAPÍTULO III:	55
Antiparasitic activities of hydroethanolic extracts of <i>Ipomoea imperati</i> (Vahl) Griseb. (Convolvulaceae)	55
ABSTRACT	57
1. Introduction	60
2. Materials and methods	61
2.1. <i>Plant material</i>	61

2.2.	<i>Preparation of extracts</i>	61
2.3.	<i>Chemical characterization</i>	61
2.4.	<i>Biological assays</i>	63
2.4.1.	<i>Anthelmintic test</i>	63
2.4.2.	<i>Acaricidal test</i>	63
2.5.	<i>Statistical analysis</i>	64
3.	Results and Discussion.....	64
4.	Conclusions	69
	References.....	70
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

CAPÍTULO I

1. APRESENTAÇÃO GERAL

Ecossistemas costeiros desenvolvem-se em zonas fortemente ameaçadas pela antropização em grande parte do território mundial, estando sujeitos a intensas perturbações provocadas pela especulação imobiliária, turismo, introdução de espécies exóticas, entre outras (ROCHA et al., 2007; DENNISON, 2008; MARQUES; SILVA; LIEBSCH, 2015). Estas atividades geram drástica perda de biodiversidade através da supressão de grandes extensões de áreas naturais cuja importância é, muitas vezes, negligenciada (MARRONI; ASMUS, 2013; MARQUES; SILVA; LIEBSCH, 2015; AMARAL et al., 2016;).

Neste cenário, a bioprospecção pode se tornar uma importante ferramenta de proteção de ecossistemas pela descoberta de potencial econômico em recursos naturais que atendam às demandas de importantes mercados, substituindo ameaças à biodiversidade causadas pela perda de habitat por incentivos de conservação (FRISVOLD; DAY-RUBENSTEIN, 2008; SACCARO-JUNIOR, 2013).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) e o nematódeo *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) estão entre os parasitos mais prejudiciais à economia mundial, destacando-se potencialmente em países tropicais e subtropicais, onde encontram condições climáticas favoráveis ao seu estabelecimento (ESTRADA-PEÑA et al., 2006; O' CONNOR; WALKDEN-BROWN; KAHN, 2006; ALI et al., 2016). Estes parasitos representam um dos principais entraves ao setor pecuarista ocasionando danos aos animais que resultam em grandes perdas econômicas tanto pela redução da produtividade quanto pelos gastos com controle parasitário e tratamento animal (ESTRADA-PEÑA; SALMAN, 2013; ROEBER; JEX; GASSER, 2013; GRISI et al., 2014).

Ao longo dos anos, a principal estratégia de controle destes parasitos tem sido a utilização de produtos sintéticos (GETACHEW; DORCHIES; JACQUIET, 2007; SOUZA HIGA, 2015). No entanto, o longo período de uso, associado à aplicação incorreta tem resultado no desenvolvimento de resistência a vários compostos, tornando-os cada vez mais ineficazes em muitas regiões do mundo (GETACHEW; DORCHIES;

JACQUIET, 2007; SOUZA HIGA, 2015; VUDRIKO et al., 2016). Outra problemática relacionada à utilização de produtos químicos diz respeito à exposição ocupacional dos tratadores de animais, à permanência de resíduos em produtos animais e aos impactos gerados pela liberação destes produtos no meio ambiente (PISA et al., 2015; BEYNON et al., 2012; HAVERINEN; VORNANEN, 2016). Estas questões geraram a necessidade de viabilizar novas estratégias de controle, com efeitos menos deletérios à biodiversidade e à saúde humana (VERÍSSIMO, 2013).

Uma alternativa que vem sendo explorada na tentativa de reduzir ou substituir o uso destes antiparasitários sintéticos é o desenvolvimento de produtos naturais (CHAGAS et al., 2015; DE SOUZA CHAGAS et al., 2016). Há um número expressivo de estudos demonstrando resultados promissores no controle de *R. microplus* e *H. contortus* a partir da utilização de substâncias ativas de recursos vegetais (CRUZ et al., 2013; SPIEGLER et al., 2017).

Relatos de exploração de plantas oriundas da restinga para fins terapêuticos são escassos. O uso terapêutico de plantas deste ecossistema poderia favorecer a valorização da sua biodiversidade e, conseqüentemente, contribuir para conter o processo de degradação destes ambientes (BARRETT; LYBBERT, 2000; JOLY et al., 2011). Sendo assim, revelar espécies provenientes de um ecossistema ameaçado, que possam contribuir para o desenvolvimento econômico de um importante setor mundialmente, pode representar uma estratégia de priorização de conservação eficaz.

Diante disto, este trabalho se propôs a investigar o potencial antiparasitário de espécies vegetais da restinga no controle de *H. contortus* e *R. microplus*, parasitos mais prejudiciais à produção pecuária na região tropical. Sendo assim, esta dissertação constitui-se de dois manuscritos. O primeiro avaliou a atividade inibitória de extratos vegetais de espécies selecionadas em habitat natural de restinga, a partir de critérios pré-estabelecidos, sobre o desembainhamento larvar *in vitro* de *H. contortus*. O segundo manuscrito parte de uma abordagem etnoveterinária para investigar a atividade antiparasitária *in vitro* da espécie salsa-da-praia (*I. imperati*), que se desenvolve em restinga, sobre larvas de *H. contortus* e *R. microplus*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) e *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803): aspectos biológicos e importância econômica

A pecuária é uma das atividades de maior crescimento econômico nos países em desenvolvimento desempenhando um importante papel no Produto Interno Bruto (PIB) agrícola e representando meio de subsistência de quase um bilhão de pessoas no mundo (THORNTON, 2010; FAO, 2011; HERRERO et al., 2013). No entanto, o acometimento por doenças parasitárias em bovinos e ovinos gera um impacto financeiro significativo, acarretando em perdas substanciais na produtividade global (ROEBER; JEX; GASSER, 2013).

Em regiões tropicais e subtropicais, o carrapato *R. microplus* e o nematódeo gastrointestinal *H. contortus* (FIGURA 1) estão entre os principais agentes de doenças destes animais, propiciando importantes limitações ao desenvolvimento deste setor (QAMAR; MAQBOOL; AHMAD, 2011; ROEBER; JEX; GASSER, 2013; GRISI et al., 2014).

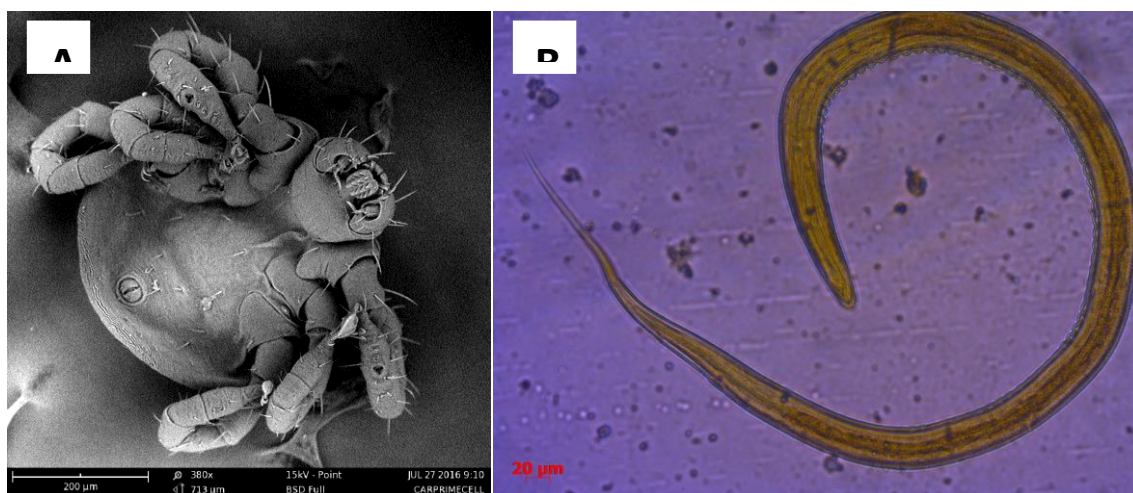


Figura 1: Larvas dos parasitos causadores de doenças na produção pecuária. A: *Rhipicephalus microplus*; B: *Haemonchus contortus*.

Rhipicephalus microplus é um carrapato monoxeno pertencente à família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). Apresenta predominância nas regiões tropicais e subtropicais

do mundo, tendo o bovino por hospedeiro preferencial (ESTRADA-PEÑA et al., 2006; ESTRADA-PEÑA; GARCÍA; SÁNCHEZ, 2006). Seu ciclo de vida é constituído por uma fase de vida livre, que inicia com a queda da fêmea ingurgitada do hospedeiro para a postura dos ovos, seguida da eclosão; e a fase parasitária, que inicia após a eclosão, com a infestação das larvas no hospedeiro permanecendo até a fertilização e preparação para oviposição (ESTRADA-PEÑA et al., 2006).

Infestações de *Rhipicephalus microplus* promovem uma série de danos aos bovinos em consequência do seu hábito hematofágico (JONSSON, 2006), causando perdas econômicas anuais no Brasil estimadas em 3,2 bilhões de dólares (GRISI et al., 2014). Estas perdas estão relacionadas a reduções no peso (JONSSON, 2006), na produtividade de leite (RODRIGUES; LEITE, 2013), qualidade do couro (MARQUES et al., 2000), custo com tratamento (GODOI; SILVA, 2009) e mortalidade de animais acometidos pela Tristeza Parasitária Bovina, cujos patógenos são transmitidos por este ectoparasito (GOMES; KOLLER; BARROS, 2011).

Haemonchus contortus é um nematódeo gastrointestinal pertencente à família Trichostrongylidae (LEIPER, 1912). Seu ciclo de vida inclui uma fase de vida livre, que vai desde a liberação dos ovos pelo hospedeiro até a ingestão de larvas de terceiro estágio infectante (L3) pelos animais, dando início à fase parasitária, que segue com o desembainhamento das larvas L3 no rúmen, sofrendo mais duas mudas até o estágio adulto (GETACHEW; DORCHIES; JACQUIET, 2007; ROEBER; JEX; GASSER, 2013). Distribui-se amplamente em áreas tropicais e subtropicais, cujas condições climáticas favorecem seu desenvolvimento (O' CONNOR; WALKDEN-BROWN; KAHN, 2006) infectando, mais frequentemente, ovinos e caprinos (GILLEARD, 2013). Este parasito alimenta-se do sangue do hospedeiro a partir do estágio L4, podendo provocar anemia de variada intensidade, sendo muitas vezes grave e, inclusive fatal em animais fortemente infectados (GETACHEW; DORCHIES; JACQUIET, 2007; GILLEARD, 2013). A infecção parasitária remete a sérios prejuízos financeiros em função da redução na produção de leite, carne e lã, má qualidade da pele e do couro, redução do peso e do crescimento e, ainda, perda em consequência da morte do animal (QAMAR; MAQBOOL; AHMAD, 2011; ROEBER; JEX; GASSER, 2013).

2.2. Estratégias de Controle de *Rhipicephalus microplus* e *Haemonchus contortus*

Carrapaticidas e anti-helmínticos sintéticos consistem no principal método utilizado no controle de carrapatos e nematódeos gastrointestinais, respectivamente. No entanto, a frequência e uso inadequado destes produtos têm favorecido o surgimento de populações resistentes a várias classes de pesticidas e anti-helmínticos em todo mundo, tornando-os cada vez mais ineficazes (GETACHEW; DORCHIES; JACQUIET, 2007; YESSINOU et al., 2016).

Além da resistência generalizada, existem outros problemas associados à utilização de produtos sintéticos como a persistência de resíduos em derivados alimentícios, oferecendo riscos à saúde humana (MORENO et al., 2008; DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; FAGNANI et al., 2011; TSIBOUKIS et al., 2013; CERQUEIRA et al., 2014), uma vez que são constituídos por compostos tóxicos associados a disfunções endócrinas e neurológicas (MUNÓZ-QUEZADA et al., 2013; BALTAZAR et al., 2014; GHISARI et al., 2015) e indução de processos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (EL- MAKAWY et al., 2006; MOLINARI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2010; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015). Também oferecem riscos à biodiversidade agindo sobre espécies não-alvo; por exemplo, o fipronil exerce efeitos citotóxicos, genotóxicos, comprometimento da função imunológica, redução do crescimento e do sucesso reprodutivo em aves e peixes (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015). Piretróides apresentam impactos sobre peixes causando-lhes efeitos neurotóxicos e cardiotoxicos (HAVERINEN; VORNANEN, 2016). Resíduos de lactonas macrocíclicas também exercem efeitos tóxicos sobre invertebrados aquáticos, colembolos, fauna do solo, e diversos outros organismos (BEYNON, 2012).

Estes efeitos prejudiciais oriundos do uso de produtos sintéticos geraram a necessidade de explorar estratégias de controle eficientes, mas menos nocivas à saúde humana e ambiental. Atendendo a estas demandas é possível encontrar alternativas, como o emprego de melhoramento genético pelo cruzamento de raças susceptíveis com raças resistentes a infestações, visando a obtenção de híbridos resistentes (AMARANTE et al., 2009; HÜE et al., 2014; JONSSON; PIPER; CONSTANTINOIU, 2014); o desenvolvimento de vacinas utilizando proteínas recombinantes (ex: Bm86 e BrRm-

MP4) expressas em leveduras e bactérias para redução de infestações por *R. Microplus* (DOMINGOS et al., 2013) e vacinas baseadas em antígenos extraídos de superfícies de células intestinais de *H. contortus* (BASSETO; AMARANTE, 2015; NISBET et al., 2016); emprego de fungos entomopatogênicos e nematófagos que apresentam isolados com potencial para infectar e comprometer a fisiologia do parasito (LARSEN, 2000; PERINOTTO et al., 2012; VERÍSSIMO, 2013); medicamentos fitoterápicos pautados na investigação de recursos vegetais que apresentem princípios ativos eficientes na eliminação dos parasitos (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011; PEIXOTO et al., 2015), entre outras.

2.3. Recursos vegetais como estratégia de controle de *Rhipicephalus microplus* e *Haemonchus contortus*

O Brasil detém parte significativa da biodiversidade do planeta que, no entanto, está cada vez mais comprometida, sofrendo intenso declínio e extinções, resultado de crescentes pressões antrópicas (ALEIXO et al., 2010). Uma das formas de assegurar a preservação da biodiversidade, parte da identificação de recursos genéticos que possam ser utilizados para fins comerciais (HEAL, 2004), representando um grande potencial para o país diante de seu vasto acervo natural (PIMENTEL et al., 2015). No entanto, os esforços em pesquisas para o seu conhecimento e utilização ainda são mínimos (BRAZ FILHO, 2010), justificando o número reduzido de exemplos de sucesso comercial de princípios ativos desta biodiversidade (JOLY et al., 2011).

A utilização de recursos vegetais em substituição aos pesticidas e drogas sintéticas tem representado uma importante alternativa no controle de parasitos (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011; PINO et al., 2013), por se tratar de substâncias com baixa contaminação ambiental e residual, rápida degradação e menor custo (BORGES; DE SOUSA; BARBOSA, 2011; CHAGAS, 2015; CORRÊA; SALGADO, 2011).

Investigações sobre o uso de extratos de plantas para o controle de parasitos têm sido intensificadas nos últimos anos e os resultados obtidos têm se mostrado promissores (ALONSO-DÍAZ et al., 2011; CASTRO et al., 2016). Entretanto, grande parte dos estudos conduzidos no Brasil estão concentrados em plantas já bastante conhecidas na medicina de uso popular, como *Zingiber officinale* Roscoe, *Cymbopogon martini* (Roxb.) J.F.Watson e *Mentha piperita* L. (KATIKI, et al., 2011; PEIXOTO et al., 2015; DE

SOUZA CHAGAS et al., 2016). Alguns estudos ainda investigam plantas exóticas invasoras, como a espécie *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), conhecida popularmente como “nim” e *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton (Asclepiadaceae) que demonstraram elevada eficácia no combate a *R. microplus* em baixas concentrações (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2010; LAZARO et al., 2012). Todavia, a presença destas espécies pode alterar a dinâmica dos ecossistemas invadidos, sendo prejudiciais ao equilíbrio ambiental (FABRICANTE; OLIVEIRA; SIQUEIRA FILHO, 2013; SILVA; SILVA-FORSBERG, 2015).

Por outro lado, alguns estudos têm explorado a eficácia de plantas nativas de biomas brasileiros no controle de *R. microplus* e *H. contortus*. Espécies endêmicas como *Lecythis lurida* (Miers) S.A. Mori (Lecythidaceae) e *Hesperozygis myrtoides* (A. St.-Hil. ex Benth.) Epling (Lamiaceae) ocorrentes em biomas como cerrado e floresta atlântica apresentaram efeito antiparasitário sobre *R. microplus* (PEREIRA et al., 2015) e *H. contortus* (CASTILHO et al., 2017), respectivamente. Ainda proveniente destes biomas, encontrou-se elevada eficácia para *Guarea kunthiana* A. Juss. sobre *R. microplus* (BARBOSA et al., 2013) e a investigação de espécies nativas com histórico de uso tradicional também obteve resultados relevantes para *Parkia platycephala* Benth. sobre *H. contortus* (OLIVEIRA et al., 2017). No entanto, há poucos registros de bioprospecção antiparasitária para a flora de áreas naturais do Brasil, embora seja o país que abriga a maior diversidade vegetal do planeta (BFG, 2015).

2.4. Importância da Bioprospecção para áreas de Restinga

A flora da restinga é formada por espécies oriundas, em sua maioria, de outros ecossistemas sendo, no entanto, peculiar devido a modificações estruturais e fisiológicas das espécies que permitem seu desenvolvimento em condições desfavoráveis, características de ecossistemas costeiros (LACERDA et al., 1993; BRITO et al., 1993; MAUN, 1994).

Cobrindo a maior parte das planícies costeiras brasileira, a restinga vem sendo extensivamente degradada em função do desenvolvimento de atividades antrópicas (ROCHA et al., 2007; MARQUES; SILVA; LIEBSCH, 2015). A exploração de recursos naturais e supressão da vegetação para o estabelecimento de ocupações, instalação de

construções, atividades agrícolas, introdução de espécies exóticas e contaminação por resíduos decorrentes destas atividades são os principais causadores da perda de habitat de restinga, implicando no intenso declínio de sua biodiversidade (ROCHA et al., 2007; CARIS et al., 2013; ROLLO et al., 2013; ARAUJO; SILVA; ALMEIDA JR, 2016).

Embora haja um número crescente de estudos sinalizando para a importância da conservação destas áreas (ROCHA et al., 2007; ARAUJO; SILVA; ALMEIDA JR, 2016), a lacuna de informações destes ambientes para regiões como Norte e Nordeste, que compreendem a maior faixa litorânea do país, dificultam o desenvolvimento de medidas protetivas (ALMEIDA JR; ZICKEL, 2009; SILVA et al., 2010; VICENTE et al., 2014). A bioprospecção por se tratar de uma atividade que visa à identificação de recursos naturais com potencial econômico (SACCARO-JUNIOR, 2013) pode impulsionar os esforços de preservação da restinga, uma vez que sua biodiversidade para este fim permanece pouco explorada.

A baixa diversidade da flora da restinga frente a outros ecossistemas brasileiros e a ausência de endemismos (SCARANO, 2002) são provavelmente os responsáveis pela ausência de interesse em estudos que identifiquem recursos genéticos em áreas de restinga. Entretanto, existem alguns levantamentos etnobotânicos com relatos de utilização de plantas deste ecossistema para diversos fins (LOPES; LOBÃO, 2013; PEDROLLO et al., 2016), representando um passo inicial na demonstração de sua importância e necessidade de conservação. Além destes, em número muito reduzido, existem estudos que testaram propriedades farmacológicas de recursos vegetais pertencentes às áreas de restinga, apresentando importantes resultados que mostram plantas com atividade carrapaticida (PONTES et al., 2007), anti-inflamatória (RAUH et al., 2011), antimicrobiana (RODRIGUES et al., 2012), antioxidante (FERREIRA et al., 2014) e inseticida (GONZALES et al., 2014).

Outro aspecto que merece atenção é que, embora a flora da restinga seja constituída, em maior parte, por espécies que ocorrem em mais de um bioma (ARAUJO; SILVA; ALMEIDA JR, 2016), há evidência para maiores teores de compostos em plantas provenientes da restinga (DONATO; MORRETES, 2007). Esta distinção foi atribuída a diferenças estruturais, possivelmente em função da influência dos fatores ambientais. Ainda nesse contexto, alguns estudos já comprovam que interações ecológicas alteram o padrão fitoquímico de espécies da restinga (FERREIRA et al., 2014) e, mesmo indivíduos

pertencentes a uma mesma área, apresentam diferentes perfis fitoquímicos, provavelmente, em função de diferentes condições ambientais (CORDEIRO et al., 2012). Estas informações demonstram que a restinga apresenta uma flora peculiar evidenciando a necessidade de mais estudos que investiguem seu potencial e culminem em medidas de conservação destas áreas, para assegurar uma fonte importante de recursos genéticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Investigar o potencial antiparasitário de plantas da restinga.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar espécies da flora da restinga com atividade inibitória sobre o desembainhamento larvar de *Haemonchus contortus*;
- Verificar a atividade anti-helmíntica de *Ipomoea imperati* de restinga sobre o desembainhamento larvar de *Haemonchus contortus*;
- Verificar a atividade carrapaticida de *Ipomoea imperati* de restinga sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*;
- Identificar compostos químicos presentes nos extratos de *Ipomoea imperati*.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, A. et al. Mudanças Climáticas e a Biodiversidade dos Biomas Brasileiros: Passado, Presente e Futuro. **Natureza & Conservação**, v. 8, n. 2, p. 194–196, 2010.
- ALI, A. et al. A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 7, p. 1240–1248, jul. 2016.
- ALMEIDA JR., E.B.; ZICKEL, C.S. Análise fitossociológica do estrato arbustivo-arbóreo de uma floresta de restinga no Rio Grande do Norte. **Agrária**, v. 7, n. 2, p. 286–291, 2012.
- ALONSO-DÍAZ, M.A. et al. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 360–364, 2011.
- AMARAL, A. C. Z. et al. Brazilian sandy beaches: characteristics, ecosystem services, impacts, knowledge and priorities. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 64, p. 5–16, 2016.
- AMARANTE, A. F. T. et al. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 273–289, 2009.
- ARAÚJO, A. C. M.; SILVA, A. N. F. DA; ALMEIDA JR, E. B. DE. Caracterização estrutural e status de conservação do estrato herbáceo de dunas da Praia de São Marcos, Maranhão, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 247–258, set. 2016.
- BALTAZAR, M. T. et al. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 85–103, out. 2014.
- BARBOSA, C. S. et al. *In vitro* activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, n. 3, p. 421–430, jan. 2013.
- BARRETT, C. B.; LYBBERT, T. J. Is bioprospecting a viable strategy for conserving tropical ecosystems? **Ecological Economics**, v. 34, n. 3, p. 293–300, 2000.
- BASSETO, C. C.; AMARANTE, A. F. T. Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 5, p. 517–525, 2015.
- BEYNON, S.A. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 1, p. 113–124, 2012.
- BFG—Brazilian Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085–1113, 2015.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D. DE; BARBOSA, C. DA S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89–96, 2011.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRITTO, I. C. et al. Flora fanerogâmica das dunas e lagoas de Abaeté, Salvador, Bahia. **Sitientibus**, v.11, p. 31-46, 1993.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. et al. Action of extract and oil neem in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 44–48, 2010.

CARIS, E. A. P. et al. Vegetation cover and land use of a protected coastal area and its surroundings, southeast Brazil. *Rodriguésia* v. 64, n. 4, p. 747-755, 2013.

CASTILHO, C. V. V. et al. *In vitro* activity of the essential oil from *Hesperozygis myrtooides* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 70-76, 2017.

CASTRO, K. N. DE C. et al. *In vitro* effects of *Pilocarpus microphyllus* extracts and pilocarpine hydrochloride on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 248–253, jun. 2016.

CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Detection of antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas Gerais State - Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 621-625, 2014.

CHAGAS, A. C. S. Medicinal plant extracts and nematode control. **CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources**, v. 10, n. 8, p. 1-8, maio 2015.

CORDEIRO, S. Z. et al. Volatile compounds of *Mandevilla guanabara* (Apocynoideae, Apocynaceae) from three restingas in Rio de Janeiro, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 102–107, dez. 2012.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, p. 500–506, 2011.

CRUZ, E. M. DE O. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, jul. 2013.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 12, p. 1402–1419, 6 maio 2011.

DENNISON, W. C. Environmental problem solving in coastal ecosystems: A paradigm shift to sustainability. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 77, p. 185-196, out. 2008.

DE SOUZA CHAGAS, A. C. et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427–432, abr. 2016.

DOMINGOS, A. et al. Approaches towards tick and tick-borne diseases control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 265–269, 2 abr. 2013.

DONATOS, A. M.; DE MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam.(Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 426–443, 2007.

EL- MAKAWY, A. et al. Genotoxic, teratological and biochemical effects of anthelmintic drug oxfendazole Maximum Residue Limit (MRL) in male and female mice. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, p. 139–156, 2006.

ESTRADA-PEÑA, A. et al. The Known Distribution and Ecological Preferences of the Tick Subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, n. 2–3, p. 219–235, fev. 2006.

ESTRADA-PEÑA, A.; GARCÍA, Z.; SÁNCHEZ, H. F. The Distribution and Ecological Preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, n. 4, p. 307–316, abr. 2006.

ESTRADA-PEÑA, A.; SALMAN, M. Current Limitations in the Control and Spread of Ticks that Affect Livestock: A Review. **Agriculture**, v. 3, n. 2, p. 221–235, 10 abr. 2013.

FABRICANTE, J. R.; OLIVEIRA, M. N. A.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Aspectos da ecologia de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em uma área de Caatinga alterada pelas obras do Projeto de Integração do Rio São Francisco em Mauriti, CE. **Rodriguésia**, v. 64, n. 3, p. 647-654, 2013.

FAGNANI, R. et al. Organophosphorus and carbamates residues in milk and feedstuff supplied to dairy cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 598–602, 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). *World Livestock 2011: Livestock in food security*. Rome, 2011. 115p.

FERREIRA, R. O. et al. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 617–625, nov. 2014.

FLECHTMANN, C. H. W. Ácaros de importância médico veterinária. 3. ed. São Paulo: Nobel, 192pp., 1990.

FRISVOLD, G.; DAY-RUBENSTEIN, K. Bioprospecting and Biodiversity Conservation: What Happens When Discoveries Are Made?. **Arizona Law Review**. v. 50, n. 2, p. 545-576., 2008.

GETACHEW, T.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Trends and Challenges in the Effective and Sustainable Control of *Haemonchus contortus* Infection in Sheep. Review. **Parasite**, v. 14, p. 3-14, 2007.

GHISARI, M. et al. Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 284, p. 292-303, 2015.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 103–118, jan. 2015.

GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology**, v. 140, p. 1506-1522, jun. 2013.

GODOI, C. R.; SILVA, E. F. P. Carrapato *Boophilus microplus* e impacto na produção animal-Revisão de literatura. **PUBVET**, v. 3, n. 22, 2009.

GOMES, A.; KOLLER, W. W.; BARROS, A. T. M. DE. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to acaricides in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1447–1452, 2011.

GONZALEZ, M. S. et al. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 413-418, 2014.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, abr. 2014.

HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Deltamethrin is toxic to the fish (crucian carp, *Carassius carassius*) heart. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 129, p. 36–42, maio 2016.

HEAL, G. Economics of biodiversity: an introduction. **Resource and Energy Economics**, v. 26, n. 2, p. 105–114, jun. 2004.

HERRERO, M. et al. The roles of livestock in developing countries. **Animal**, v. 7, n. s1, pp. 3-18, nov. 2013.

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

HÜE, T. et al. Comparison of tick resistance of crossbred Senepol × Limousin to purebred Limousin cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 2, p. 447–453, fev. 2014.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114–133, 2011.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 1–10, abr. 2006.

JONSSON, N. N.; PIPER, E. K.; CONSTANTINOIU, C. C. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 11, p. 553–559, nov. 2014.

KATIKI, L. M. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 103–108, 2011.

LACERDA, L. D.; DE ARAUJO, D. S. D.; MACIEL, N. C. Dry coastal ecosystems of the tropical Brazilian coast. **Ecosystems of the World**, p. 477–477, 1993.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v.120, p. 121–131, 2000.

LÁZARO, S.F. et al. Efeito do extrato aquoso do algodão de seda (*Calotropis procera* Aiton) sobre a eficiência reprodutiva do carrapato bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 14, n. 2, p. 302–305, 2012.

LOPES, L. C. M.; LOBÃO, A. Q. Etnobotânica em uma comunidade de pescadores artesanais no litoral norte do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, n. 32, 2013.

MARQUES, F. A. C.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, O. Lesões no couro bovino causadas pelos principais ectoparasitas nas regiões Noroeste do Estado do Paraná e Sudoeste do Estado do Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n. 1, p. 33–39, 2000.

MARQUES, M. C. M.; SILVA, S. M.; LIEBSCH, D. Coastal plain forests in southern and southeastern Brazil: ecological drivers, floristic patterns and conservation status. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 1, p. 1–18, mar. 2015.

MARRONI, E. V.; ASMUS, M. L. Historical antecedents and local governance in the process of public policies building for coastal zone of Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 76, p. 30–37, maio 2013.

MAUN, M.A. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal dune systems. **Vegetation**, v. 111, p. 59–70, 1994.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. New Ventures in the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Macrocyclic Lactones, Abamectin and Ivermectin. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, p. 37–45, abr. 2010.

MORENO, L. et al. Pattern of ivermectin (sheep) and doramectin (cattle) residues in muscular tissue from various anatomical locations. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 25, n. 4, p. 406–412, abr. 2008.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157–177, abr. 2013.

MUNÕZ-QUEZADA, M. T. et al. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: A systematic review. **NeuroToxicology**, v. 39, p. 158-168, 2013.

O'CONNOR L. J., WALKDEN-BROWN S. W., KAHN L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. (1/2), p. 1–15, aug. 2006.

OLIVEIRA, A.F. et al. Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. **Veterinary Parasitology**, v. 236, p. 121–127, 2017.

PEDROLLO, C. T. et al. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 111–124, jun. 2016.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 118–122, maio 2015.

PEREIRA, S. G. et al. Ação carrapaticida sobre *Rhipicephalus microplus* dos extratos, frações e compostos obtidos da espécie *Lecythis lurida* (Lecythidaceae). **Biotemas**, v. 28, n. 4, p. 119-130, dez. 2015.

PERINOTTO, W. M. S. et al. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 257–260, mar. 2012.

PIMENTEL, V. P. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. **Revista do BNDES**, n. 43, p. 41-89, 2015.

PINO, O. et al. Plant secondary metabolites as an alternative in pest management. I: Background, research approaches and trends. **Revista de Protección Vegetal**, v. 28, n. 2, p. 81, 2013.

PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68–102, jan. 2015.

PONTES, W. J. T. et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838, 2007.

QAMAR, M. F.; MAQBOOL, A.; AHMAD, N. Economic losses due to Haemonchosis in sheep and goats. *Sci. Int. (Lahore)*, v. 23, n. 4, p. 321-324, 2011.

RAUH, L. K. et al. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 390–397, nov. 2011.

ROCHA, C. F. D. et al. The remnants of restinga habitats in the Brazilian Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil: habitat loss and risk of disappearance. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 2, p. 263–273, 2007.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, out. 2013.

RODRIGUES, F. G. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p. 161, 2012.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 1-13.

ROLLO, T. C. et al. Vegetação de Restinga em Ilha Comprida: Condições de Conservação e Estudo Comparativo com outras Áreas de Proteção Ambiental do Estado de São Paulo – Brasil. **UNISANTA BioScience**, v. 2, n. 1, p. 52-65, 2013.

SACCARO-JUNIOR, N. L. A regulação do acesso a recursos genéticos no Brasil: sugestões para um novo cenário. **Sustentabilidade em Debate**, v. 4, n. 2, p. 194–214, 2013.

SAILLENFAIT, A.-M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J.-P. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, n. 3, p. 281–292, maio 2015.

SCARANO, F.R. Structure, function and floristic relationships of plants communities in stressful habitats marginal to Brazilian Atlantic Rainforest. **Annals of Botany**, v. 90, p. 517-524, 2002.

SILVA, A.F; SILVA-FORSBERG, M.C. Espécies exóticas invasoras e seus riscos para a Amazônia Legal. **Scientia Amazonia**, v.4, n.2, 2015.

SILVA, R. M. et al. The coastal restinga vegetation of Pará, Brazilian Amazon: a synthesis. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 4, p. 563-573, out.-dez 2010.

SOUZA HIGA, L. DE O. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, 2015.

SPIEGLER, V., LIEBAU, E., HENSEL, A. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. **Natural Product Reports**, v. 34, p. 627–643, 2017.

THORNTON, P. K. Livestock production: recent trends, future prospects. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2853–2867, 27 set. 2010.

TSIBOUKIS, D. et al. Anthelmintics residues in raw milk. Assessing intake by a children population. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, n. 1, p. 85–91, 2013.

VERÍSSIMO, C. J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 1, p. 14–23, 2013.

VICENTE, A.; ALMEIDA JR., E. B.; SANTOS-FILHO, F. S.; ZICKEL, C. S. Composição estrutural da vegetação lenhosa da restinga de Cabedelo, Paraíba. **Revista de Geografia (UFPE)**, v. 31, n. 1, 2014.

VUDRIKO, P. et al. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, dez. 2016.

YESSINOU, R. E. et al. Resistance of tick *Rhipicephalus microplus* to acaricides and control strategies. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 4, n. 6, p. 408-414, 2016.

CAPÍTULO II:

Screening de plantas da restinga na inibição do desembainhamento larvar
de *Haemonchus contortus*

Artigo a ser submetido ao periódico Veterinary Parasitology

**Screening de plantas da restinga na inibição do desembainhamento
larvar de *Haemonchus contortus***

Ana Cássia Medeiros Araujo^a, Eduardo Bezerra de Almeida Jr^b, Cláudia Quintino da Rocha^c, Carolina Rocha e Silva^d, José de Sousa Lima Neto^e, Lívio Martins Costa-Junior^{d*}

a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

b Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

c Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

d Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

e Universidade Federal do Piauí, Departamento de Farmácia, Laboratório de Geoquímica Orgânica, Teresina, Piauí, Brazil.

*Corresponding author.

Phone: +55 98 32729547

E-mail: livio.martins@ufma.br

RESUMO

Haemonchus contortus é um dos parasitos de maior importância econômica na produção de pequenos ruminantes promovendo perdas significativas ao setor pecuarista. Estratégias de controle baseadas em anti-helmínticos sintéticos vêm gerando insatisfações crescentes pelo desenvolvimento de resistência generalizada, impulsionando a busca por novas alternativas. Sendo assim, o presente estudo avaliou a eficácia anti-helmíntica de plantas da restinga sobre o desembainhamento larvar *in vitro* de *H. contortus*. Para isto, foram feitos extratos hidroetanólicos das folhas de 19 espécies vegetais coletadas em área de restinga brasileira. A eficácia anti-helmíntica destes extratos foi avaliada por meio do Teste de inibição do desembainhamento larvar, em concentração única de 1,2 mg/mL. Posteriormente, os extratos com eficácia maior que 50% foram avaliados em cinco concentrações variando entre 1,2 e 0,07 mg/mL, calculando-se a concentração inibitória média (CI₅₀) para cada um dos extratos. Extratos de *Terminalia lucida* (CI₅₀=53 µg/mL), *Conocarpus erectus* (CI₅₀=340 µg/mL), *Indigofera microcarpa* (CI₅₀=351 µg/mL), *Paullinia pinnata* (CI₅₀=368 µg/mL), *Himatanthus drasticus* (CI₅₀=432 µg/mL), *Chamaecrista ramosa* (CI₅₀=452 µg/mL), *Vismia guianensis* (CI₅₀=874 µg/mL) e *Chomelia obtusa* (CI₅₀=1070 µg/mL) apresentaram efeito inibitório sobre o desembainhamento larvar de *H. contortus*, indicando potencial promissor no controle *in vitro* deste nematódeo e necessidade de proteção do ecossistema de restinga, no qual estas espécies se desenvolvem.

Palavras-chave: extrato vegetal, anti-helmíntico, *Terminalia lucida*, conservação.

1. Introdução

A produção pecuária é uma das atividades agrícolas de maior importância econômica, representando meio de subsistência para quase um bilhão de pessoas e retorno financeiro avaliado em pelo menos 1 trilhão de dólares no cenário mundial (Thornton et al., 2010; Robinson et al., 2014). As projeções de crescimento da população mundial pressupõem demandas cada vez maiores por produtos pecuários (Herrero et al., 2013), no entanto, a crescente preocupação com problemas ambientais torna necessário encontrar meios de aumentar a produtividade sem comprometer a segurança alimentar e o meio ambiente (Wright et al., 2012).

A ocorrência de doenças parasitárias na produção de pequenos ruminantes constitui um dos principais fatores limitantes ao pleno desenvolvimento deste mercado, promovendo perdas significativas à indústria pecuária (Roeber et al., 2013). Entre os parasitos de maior importância econômica, destaca-se o nematódeo gastrointestinal *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobb, 1898 (Jackson et al., 2009). Com alta prevalência nas regiões tropical e subtropical (Emery et al., 2016), este endoparasita infecta mais frequentemente ovinos e caprinos (Gilleard, 2013), provocando a redução da produtividade em decorrência de anemia e, em casos mais severos, a morte do animal (Qamar et al., 2011).

Os anti-helmínticos sintéticos constituem a principal estratégia de controle destes organismos (Roeber et al., 2013), mas o uso destes produtos tem gerado insatisfações crescentes em muitas regiões do mundo. O surgimento de populações resistentes a vários compostos, persistência de resíduos nos produtos e alto custo dos tratamentos existentes (Getachew et al., 2007; Almeida et al., 2010), instituíram uma demanda urgente por novos métodos de controle de helmintos gastrointestinais.

Investigações sobre a eficácia de recursos vegetais no controle de *H. contortus* têm demonstrado resultados importantes, representando uma alternativa de controle mais sustentável do nematódeo (Spiegler et al., 2017). Entre os aspectos positivos, sugere-se o retardo no desenvolvimento de resistência, devido à variedade de substâncias com diferentes mecanismos de ação; a redução de riscos por resíduos em produtos animais (Chagas, 2015) e o baixo custo (Hoste; Torres-Acosta et al., 2011).

Grande parte dos estudos que investigaram o efeito anti-helmíntico de plantas contra *H. contortus* utilizaram critérios etnoveterinários para seleção de espécies (Ahmed et al., 2013; Kumarasingha et al., 2016); ou ainda, espécies ricas em componentes químicos com ação reconhecida para esta atividade, principalmente plantas ricas em taninos (Alonso-Días et al., 2011). Contudo, estas estratégias abrangem um número ínfimo de possibilidades diante da grande biodiversidade existente nas regiões tropicais. Em alternativa, a bioprospecção de espécies nativas, mesmo quando estas informações não estão disponíveis, potencializam as chances de descoberta de recursos vegetais promissores na ação antiparasitária (Kotze et al., 2009; Acharya et al., 2014; Cunha et al., 2014). Em contrapartida, estes achados poderão ser utilizados como estratégia de incentivo à proteção de áreas ameaçadas ao gerarem ganhos a um setor de alto impacto econômico (Frisvold; Day-Rubenstein, 2008).

A restinga compreende grande parte das planícies costeiras brasileiras e vem sendo extensivamente suprimida em função do intenso desenvolvimento de atividades antrópicas nestes ecossistemas (Marques et al., 2015; Araujo et al., 2016). Embora haja uma grande lacuna de informações referentes às propriedades terapêuticas de plantas da restinga, há evidências de maiores quantidades de compostos químicos em espécies coletadas neste ambiente (Donato; Morretes, 2007), além de evidências científicas para

algumas atividades farmacológicas (Ferreira et al., 2014; Gonzales et al., 2014; Faria et al., 2017). No entanto, os crescentes impactos neste ambiente intensificaram o declínio desta biodiversidade (Rocha et al., 2007; Caris et al., 2013). Considerando que a existência de recursos naturais oriundos destes ambientes possa representar um importante viés para a redução de perdas ocasionadas por *H. contortus* em uma atividade de grande influência econômica no cenário mundial, maximizando os esforços em conservação, o objetivo deste estudo foi identificar espécies da flora da restinga com potencial anti-helmíntico *in vitro* sobre o nematódeo de importância veterinária, *H. contortus*.

2. Material e Métodos

2.1. Procedimentos de coleta

Foram coletadas folhas sem injúrias considerando somente plantas nativas, perenes, não ameaçadas de extinção, com número mínimo de 15 indivíduos na área de estudo ou cobertura vegetal acima de 10 m² para espécies estoloníferas. A coleta foi realizada em uma área de restinga (02°28'23" S, 044°03'13.8" W) situada no município de São José de Ribamar, Maranhão, Brasil, no mês de dezembro de 2016 (estação seca). Esta área foi determinada por conter um extenso conjunto de informações referentes à composição florística, distribuição e cobertura vegetal das espécies (Lima et al., 2017; Lima; Almeida Jr., 2018), sendo uma das áreas em melhor estado de conservação do Maranhão.

Um material testemunho para cada espécie foi coletado e identificado, para garantir sua autenticidade e as exsicatas foram depositadas no acervo do Herbário do Maranhão (MAR), da Universidade Federal do Maranhão, Brasil.

2.2. Preparo de extrato vegetal

As folhas coletadas para cada espécie foram colocadas em estufa de circulação de ar forçada a 40°C para secagem. Em seguida, as folhas secas de cada espécie foram pulverizadas separadamente em moinho de facas (Moinho tipo Willye-TE-650/1), sendo o material resultante utilizado na preparação de extratos hidroetanólicos a 70% (v/v), a frio por maceração. A suspensão foi filtrada a cada 48 horas, reutilizando o resíduo acrescido da mesma quantidade de solvente até a obtenção de três extrações. Posteriormente, o filtrado foi concentrado pela remoção do solvente em rotaevaporador (Thangaraj, 2016).

2.3. Ensaio de Atividade Anti-helmíntica

2.3.1. Obtenção de larvas de terceiro estágio

As larvas de terceiro estágio (L3) foram obtidas a partir de coproculturas de fezes de ovinos infectados por uma cepa monoespecífica de *H. contortus* (Roberts; O'Sullivan, 1950). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme estabelecido pelo protocolo nº 231115018061/2011-01, no Comitê de Ética de Uso Animal-CEUA/UFMA. As fezes foram coletadas, maceradas, colocadas em copos e umedecidas com água. Então foram colocadas em estufa B.O.D. por 15 dias a 27 °C. Após esse período, as larvas foram coletadas pela técnica de Baermann (Ueno; Gonçalves, 1998).

2.3.2. Teste de inibição do desembainhamento larvar

O teste de inibição do desembainhamento larvar foi realizado sobre larvas de terceiro estágio (L3) de *H. contortus*, para avaliação do efeito dos extratos vegetais, conforme descrito por Bahuaud et al. (2006). Foi realizado um *screening* inicial, em que L3 de *H. contortus* foram tratadas com cada um dos extratos vegetais, em uma única concentração de 1.200 µg/mL, diluídos em metanol 2% (Demeler et al., 2010). As larvas

foram incubadas por 3 h a 22°C sendo, posteriormente, lavadas em tampão fosfato salino (PBS) e centrifugadas (3000 rpm) por três vezes. Em seguida, aproximadamente 1000 larvas foram submetidas ao processo de desembainhamento artificial pelo contato com solução de hipoclorito de sódio (2,0%, w/v) e cloreto de sódio (16,5%, w/v). A cinética de desembainhamento larvar foi monitorada nos intervalos de 0, 20, 40 e 60 min, em microscópio invertido (40x). Os extratos que apresentaram eficiência mínima de 50% na inibição do desembainhamento larvar foram posteriormente aplicados nas concentrações de 1.200, 600, 300, 150 e 75µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada concentração de cada extrato, utilizando metanol 2% como controle negativo.

2.4. Análise dos dados

Para cada extrato vegetal investigado, considerou-se para o cálculo de eficiência do *screening* inicial, a percentagem média de inibição do desembainhamento na concentração de 1.200 µg/mL. Para os extratos com eficiência maior que 50%, determinou-se a concentração necessária para inibir o desembainhamento larvar de 50% da população de *H. contortus* (CI₅₀) por Análise de Probit, usando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software), com intervalo de confiança de 95% (IC95%). O extrato foi considerado significativamente ($p < 0,05$) mais (ou menos) eficiente que outro quando não houve sobreposição entre os limites de confiança (95% CIs) dos valores da IC₅₀ (Roditakis et al., 2005).

3. Resultados

Foram testados 19 extratos hidroetanólicos referentes a 19 espécies (Tabela 1), dos quais oito não apresentaram atividade anti-helmíntica e três exibiram eficiência inferior a 30%. Somente oito extratos obtiveram mais de 50% de eficiência, correspondentes à *T. lucida* (100%), *C. erectus* (100%), *I. microcarpa* (100%), *H.*

drasticus (100%), *V. guianensis* (100%), *C. obtusa* (87,3%), *P. pinnata* (75%) e *C. ramosa* (71, 4%) (Tabela 2). Estes extratos foram utilizados em novos ensaios considerando diferentes concentrações que variaram entre 1.200 µg/mL e 75 µg/mL.

Na nova aplicação, o percentual de larvas desembainhadas no tempo de 60 min diferiu entre as concentrações testadas para todos os extratos em relação ao controle (87 a 100%), exibindo maior efeito de inibição da perda da bainha em L3 de *H. contortus* com o aumento da concentração dos extratos. No entanto, não foi observado efeito dose-dependente para os extratos de *T. lucida*, *I. microcarpa* e *C. ramosa*.

O extrato de *T. lucida* destacou-se com a menor CI₅₀ (53 µg/mL), diferindo significativamente dos demais extratos ($p < 0,05$), seguido dos extratos de *C. erectus* (CI₅₀=340 µg/mL), *I. microcarpa* (CI₅₀=351 µg/mL) e *P. pinnata* (CI₅₀=368 µg/mL).

4. Discussão

No presente estudo, extratos de espécies coletadas em restinga demonstraram atividade anti-helmíntica relevante na redução do desembainhamento de larvas L3 de *H. contortus*. A prevenção da perda da bainha nestas larvas prejudica o ciclo de vida do parasito em estágios iniciais evitando o estabelecimento de infecção no organismo hospedeiro (Hoste et al., 2012). Diversos estudos utilizaram esta peculiaridade para a avaliação de atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos vegetais por meio do “Teste de inibição do desembainhamento larvar” (Spiegler et al, 2017). Em grande parte destes, o contato com extratos vegetais inibiu o processo de desembainhamento de mais da metade da população larvar, similar ao observado no presente estudo (Bahuaud et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2008; Monteiro et al., 2011). Entretanto, estes estudos utilizaram como medida somente o percentual médio de desembainhamento. Uma das vantagens do Teste de inibição do desembainhamento larvar é que ele permite a realização de cálculos

de concentração efetiva, possibilitando comparações entre os resultados de extratos vegetais no mesmo ou entre diferentes estudos (Alonso-Díaz et al., 2011). Mas, poucas vezes este cálculo foi realizado.

Estudos que utilizaram esta medida como parâmetro de eficiência consideraram diferentes critérios na seleção da espécie vegetal a ser testada. Alonso-Díaz et al. (2011) utilizaram extratos de plantas com substâncias ativas reconhecidas no efeito de inibição, em maior parte, plantas taniníferas, obtendo maior atividade para *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. e *Brosimum alicastrum* Sw., com IC₅₀ de 212,9 µg/mL e 291,6 µg/mL, respectivamente. Plantas selecionadas com base em indicações etnoveterinárias resultaram em IC₅₀ variando entre 195 µg/mL e 331 µg/mL para duas espécies de Acácia (Zabré et al., 2017) e, entre 70 µg/mL e 80 µg/mL para diferentes extratos de *Parkia platycephala* Benth. (Oliveira et al., 2017a). Também foram testados extratos de plantas consumidas naturalmente por pequenos ruminantes, com valores de IC₅₀ entre 179,4 µg/mL e 253,5 µg/mL para espécies de Ericaceae (Moreno-Gonzalo et al., 2013) e de 684 µg/mL e 1.193 µg/mL para extratos de diferentes partes de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Brito et al., 2017). Estes valores são similares aos apresentados para quatro dos extratos mais ativos no presente estudo, cujas IC₅₀ compreendem valores inferiores a 370 µg/mL.

A exploração de habitats naturais na busca por espécies vegetais com efeito anti-helmíntico sobre *H. contortus* é pouco utilizada em estudos bioprospectivos (Kotze et al., 2009; Acharya et al., 2014; Cunha et al., 2014), no entanto os resultados obtidos ressaltam a importância desta estratégia, uma vez que os valores de IC₅₀ apresentados nestes estudos são inferiores aos demonstrados até aqui. Mengistu et al. (2016), por exemplo, evidenciaram efeito inibitório para extratos de dez plantas de uma região semiárida na

Etiópia, com maior atividade para os extratos de *Euclea racemosa* L. e *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell, para os quais não foi possível determinar a IC₅₀ por estarem abaixo do limite de detecção mínima do ensaio (CI₅₀<150µg/mL).

Da mesma forma, o presente estudo demonstrou atividade para oito extratos, com maior efeito de inibição para *T. lucida* com IC₅₀ de 53µg/mL. Somente obtiveram CI₅₀ menor que 100µg/mL, estudos que testaram frações de taninos e combinações entre frações de taninos e flavonoides, o que potencializou o efeito de inibição (Klongsiriwet et al., 2015; Quijada et al., 2015).

Estas diferenças na intensidade da resposta anti-helmíntica entre as diversas espécies já estudadas podem ser ocasionadas por variações na classe e teor dos metabólitos secundários (Oliveira et al., 2017b). Um dos fatores que afeta a biossíntese destas substâncias é o local de crescimento da planta (Monteiro et al., 2011). Em habitats naturais há uma gama de estressores bióticos e abióticos que podem impulsionar a produção de metabólitos (Mazid; Mohammad, 2011). Plantas que conseguem se desenvolver em ambientes condicionados a fatores adversos ao desenvolvimento da vegetação, como elevada luminosidade e salinidade, intensidade de ventos, retenção de umidade e nutrientes, característicos da Restinga (Brito et al., 1993; Maun, 1994), apresentam maior síntese e concentração de bioativos. Isto poderia possibilitar sua sobrevivência (Donato; De Morretes, 2007) e potencializar as chances de encontrar espécies com propriedade anti-helmíntica promissora (Kotze et al., 2009), como obtido para *T. lucida* neste estudo.

Destaca-se que, embora as restingas sejam amparadas pela legislação brasileira, sendo classificadas como “Áreas de Preservação Permanente” (Brasil, 2012) é evidente a intensa perda de habitat em decorrência de atividades antrópicas (Rocha et al., 2007;

Araujo et al., 2016). Para a área de estudo relata-se a ocorrência de queimadas, lixo, animais pastadores e tráfego de veículos, além da especulação imobiliária responsável por grandes remoções vegetais (Lima et al., 2017). Perturbações antrópicas podem gerar perdas de diversidade genética (Caris et al., 2013) e, mais gravemente, comprometer o funcionamento do habitat prejudicando seu restabelecimento (Marques et al., 2015). Isto significa que a ausência de medidas de proteção efetivas poderá implicar na perda de áreas que podem fornecer recursos com propriedades terapêuticas relevantes, muitos destes, ainda desconhecidos.

Não há conhecimento de investigação de atividade anti-helmíntica sobre *H. contortus* para as plantas utilizadas no presente estudo, com exceção de *P. pinnata*. Spiegler et al. (2016) utilizaram extrato hidroetanólico da raiz desta espécie em testes de inibição da migração larvar e testes de eclosão de ovos de L3 de *H. contortus*. No entanto, nenhuma diferença em relação ao controle negativo foi observada. Já o presente estudo obteve eficácia anti-helmíntica elevada ($IC_{50}=368 \mu\text{g/mL}$) no teste de inibição do desembainhamento larvar. Reitera-se, porém, que tanto a parte da planta quanto o teste utilizado diferem entre os estudos, inviabilizando comparações (Chagas, 2015).

Estudos fitoquímicos indicam a presença de compostos fenólicos entre os constituintes químicos de extratos de *Conocarpus erectus* (Nascimento et al., 2016), *Indigofera microcarpa* (Lima et al., 2003), *Paullinia pinnata* (Zamble et al., 2006), *Vismia guianensis* (Oliveira et al., 2017b) e *Chomelia obtusa* (Barros et al., 2008). Estas substâncias apresentam atividade reconhecida sobre larvas L3 de *H. contortus* em diversos estudos (Bahuaud et al., 2006; Hoste et al., 2012; Son-De-Fernex et al., 2012).

Existe uma grande lacuna de informações quanto ao potencial terapêutico da flora da restinga, provavelmente devido à baixa diversidade frente a outros ecossistemas

(Scarano, 2002). No entanto, a importância do conjunto de características ambientais para a possível síntese e/ou potencialização de agentes ativos nas espécies vegetais deste ecossistema, já discutidas neste trabalho reforça a necessidade de valorização destas áreas diante da crescente perda de biodiversidade a qual está submetida. Além disso sugere-se a criação de estratégias de uso sustentável destes recursos e de ações mais eficazes na priorização de conservação desta área, que pode resguardar espécies com implicações significativas para o avanço de setores economicamente importantes.

Declaração de interesse

Autores declaram não haver conflito de interesse.

Agradecimento

Esta pesquisa foi realizada com o apoio financeiro da FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) e do CNPq (Conselho Nacional Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). A.C.M. Araújo recebeu bolsa de pós-graduação da FAPEMA e C. R. Silva recebeu uma bolsa de pós-graduação da CAPES (Coordenação para o Melhoramento do Pessoal de Educação Superior, Brasil). Os autores também agradecem ao CNPq pela bolsa para L.M. Costa-Júnior, ao Dr. JRS Martins, pela doação de cepa de *R. microplus* e a Gustavo Lima, Luciana Belfort e Ingrid Santana pela colaboração nas coletas de campo.

Referências

- Acharya, J., Hildreth, M.B., Reese, R.N., 2014. *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 201, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.008>
- Ahmed, M., Laing, M.D., Nsahlai, I.V., 2013. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep. *Journal of Helminthology* 87, 174–179. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1200020X>
- Almeida, F.A., Garcia, K.C.O.D., Torgerson, P.R., Amarante, A.F.T., 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitology International* 59, 622–625. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.09.006>
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology* 153, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.042>
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 181, 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.052>
- Araujo, A.C.M.; Silva, A.N.F.; Almeida JR, E.B, 2016. Caracterização estrutural e status de conservação do estrato herbáceo de dunas da Praia de São Marcos, Maranhão, Brasil. *Acta Amazonica* 46, 247–258.
- Bahuaud, D., De Montellano, C.M.-O., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545. <https://doi.org/10.1017/S0031182005009509>
- Barros, M.P. de, Santin, S.M. de O., Costa, W.F. da, Vidotti, G.J., Sarragiotto, M.H., Souza, M.C. de, Bersani-Amado, C.A., 2008. Chemical constituents and anti-inflammatory and antioxidant activities evaluation of the leaves extracts of *Chomelia obtusa* Cham. &Schltdl.(Rubiaceae). *Química Nova* 31, 1987–1989.
- Brasil. Lei n. 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis n^{os} 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis n^{os} 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória n^o 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.
- Brito, D.R.B.; Costa Júnior, L.M.; Garcia, J.L.; Lopes, S.G.; Santos, G.C.O; Sousa, J.V.S., 2017. *In vitro* action of *Mimosa caesalpinifolia* ketone extract on *Haemonchus*

contortus and *Trichostrongylus colubriformis*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina 38, 1963-1972. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1963>

Britto, I.C.; Queiroz, L P.; Guedes, M.L.S.; Oliveira, N.C.; Silva, L.B., 1993. Flora fanerogâmica das dunas e lagoas de Abaeté, Salvador, Bahia. Sitientibus 11, 31-46.

Caris, E.A.P., Kurtz, B.C., Cruz, C.B.M., Scarano, F.R., 2013. Vegetation cover and land use of a protected coastal area and its surroundings, southeast Brazil. Rodriguésia 64, 747–755.

Chagas, A., 2015. Medicinal plant extracts and nematode control. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 10, 1-8. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510008>

Cunha, M.P.V., Alves Neto, A.F., Suffredini, I.B., Abel, L.J.C., 2014. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos brutos de plantas da Floresta Amazônica e Mata Atlântica brasileira sobre *Haemonchus contortus*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 66, 374–380. <https://doi.org/10.1590/1678-41626313>

Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J., Samson-Himmelfstjerna, G., 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for detection of resistance to ivermectin into gastro intestinal nematoids of ruminants. Veterinary Parasitology 174, 58-64.

Donato, A.M., Morretes, B.L., 2007. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam.(Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. Brazilian Journal of Pharmacognosy 17, 426–443.

Emery, D.L., Hunt, P.W., Le Jambre, L.F., 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? International Journal for Parasitology 46, 755–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>

Faria, R.X., Souza, A.L.A., Lima, B., Tietbohl, L.A.C., Fernandes, C.P., Amaral, R.R., Ruppelt, B.M., Santos, M.G., Rocha, L., 2017. Plants of Brazilian restingas with tripanocide activity against *Trypanosoma cruzi* strains. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 49, 473–483. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9733-9>

Ferreira, R.O., Junior, A.R. de C., da Silva, T.M.G., Castro, R.N., da Silva, T.M.S., de Carvalho, M.G., 2014. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. Revista Brasileira de Farmacognosia 24, 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.005>

Frisvold, G., Day-Rubenstein, K, 2008. Bioprospecting and Biodiversity Conservation: What Happens When Discoveries Are Made?. Arizona Law Review 50, 545-576.

Getachew, T., Dorchie, P., Jacquet, P., 2007. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. Parasite 14, 3–

14. <https://doi.org/10.1051/parasite/2007141003>

Gilleard, J.S., 2013. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology* 140, 1506–1522. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001145>

Gonzalez, M. S., Lima, B. G., Oliveira, A. F. R., Nunes, D. D., Fernandes, C. P., Santos, M. G., Tietbohl, L. A. C., Mello, C. B., Rocha, L., Feder, D. 2014. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24, 413–418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.05.001>

Herrero, M., Grace, D., Njuki, J., Johnson, N., Enahoro, D., Silvestri, S., Rufino, M.C., 2013. The roles of livestock in developing countries. *Animal* 7, 3–18. <https://doi.org/10.1017/S1751731112001954>

Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology* 186, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.042>

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology* 180, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.035>

Jackson, F., Bartley, D., Bartley, Y., Kenyon, F., 2009. Worm control in sheep in the future. *Small Ruminant Research* 86, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.015>

Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H., 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.06.001>

Kotze, A.C., O’Grady, J., Emms, J., Toovey, A.F., Hughes, S., Jessop, P., Bennell, M., Vercoe, P.E., Revell, D.K., 2009. Exploring the anthelmintic properties of Australian native shrubs with respect to their potential role in livestock grazing systems. *Parasitology* 136, 1065. <https://doi.org/10.1017/S0031182009006386>

Kumarasingha, R., Preston, S., Yeo, T.-C., Lim, D.S.L., Tu, C.-L., Palombo, E.A., Shaw, J.M., Gasser, R.B., Boag, P.R., 2016. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors* 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1458-9>

Lima, A.K. de, Amorim, E.L.C. de, Aquino, T.M. de, Lima, C.S. de A., Pimentel, R.M. de M., Higino, J.S., Albuquerque, U.P. de, 2003. Pharmacognostical study of *Indigofera microcarpa* Desv. (Fabaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 39, 373–379. Lima, G.P., Almeida Jr., E.B., 2018. Diversidade e similaridade florística de uma restinga

ecotonal no Maranhão, nordeste do Brasil. *Interciência* 43, 275-282.

Lima, G.P., Lacerda, D.M.A., Lima, H.P., Almeida Jr., E.B., 2017. Caracterização fisionômica da Restinga da Praia de Panaquatira, São José de Ribamar, Maranhão. *Revista Brasileira de Geografia Física* 10, 1910-1920.

Marques, M.C.M., Silva, S.M., Liebsch, D., 2015. Coastal plain forests in southern and southeastern Brazil: ecological drivers, floristic patterns and conservation status. *Brazilian Journal of Botany* 38, 1–18.

Maun, M.A., 1994. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal dune systems. *Vegetation* 111, 59-70.

Mazid, M., Khan, T.A., Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3, 232-249.

Mengistu, G., Hoste, H., Karonen, M., Salminen, J.-P., Hendriks, W.H., Pellikaan, W.F., 2017. The *in vitro* anthelmintic properties of browse plant species against *Haemonchus contortus* is determined by the polyphenol content and composition. *Veterinary Parasitology* 237, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.020>

Monteiro, M.V.B., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Machado, L.K.A., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Campello, C.C., Ribeiro, W.L.C., Mesquita, M. de A., 2011. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 182, 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.010>

Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste, H., Ferre, I., 2013. *In vitro* effect of heather (Ericaceae) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 197, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.010>

Nascimento, D.K.D., Souza, I.A.D., Oliveira, A.F.M.D., Barbosa, M.O., Santana, M.A.N., Pereira Júnior, D.F., Lira, E.C., Vieira, J.R.C., 2016. Phytochemical Screening and Acute Toxicity of Aqueous Extract of Leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus in Swiss Albino Mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88, 1431–1437. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150391>

Oliveira, A.F., Costa Junior, L.M., Lima, A.S., Silva, C.R., Ribeiro, M.N.S., Mesquita, J.W.C., Rocha, C.Q., Tangerina, M.M.P., Vilegas, W., 2017a. Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. *Veterinary Parasitology* 236, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.005>

Oliveira, A.H., de Oliveira, G.G., Carnevale Neto, F., Portuondo, D.F., Batista-Duharte, A., Carlos, I.Z., 2017b. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. *Journal of Ethnopharmacology* 195, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.030>

Qamar, M.F., Maqbool, A., Ahmad, N., 2011. Economic losses due to haemonchosis in sheep and goats. *Sci Int (Lahore)* 23, 321–324.

Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2015. Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 6346–6354. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00831>

Roberts, F.H.S., O'Sullivan, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for Strongyles infection the gastro-intestinal tract of cattle., 1950. *Australian Agriculture Research* 1, 99-192.

Robinson, T.P., Wint, G.R.W., Conchedda, G., Van Boeckel, T.P., Ercoli, V., Palamara, E., Cinardi, G., D'Aietti, L., Hay, S.I., Gilbert, M., 2014. Mapping the Global Distribution of Livestock. *PLoS ONE* 9, e96084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096084>

Rocha, C.F.D., Bergallo, H.G., Van Sluys, M., Alves, M.A.S., Jamel, C.E., 2007. The remnants of restinga habitats in the Brazilian Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil: habitat loss and risk of disappearance. *Brazilian Journal of Biology* 67, 263–273.

Roditakis E., Roditakis N. E., Tsagkarakou, A., 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Management Science* 61, 577-582.

Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective. *Parasites & vectors* 6, 153.

Scarano, F.R. 2002. Structure, function and floristic relationships of plants communities in stressful habitats marginal to Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany* 90, 517-524

Spiegler, V., Liebau, E., Hensel, A., 2017. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Natural Product Reports* 34, 627–643. <https://doi.org/10.1039/C6NP00126B>

Spiegler, V., Peppler, C., Werne, S., Heckendorn, F., Sendker, J., Liebau, E., Agyare, C., Hensel, A., 2016. Anthelmintic activity of a traditionally used root extract from *Paullinia pinnata*. *Planta Medica* 81, S1–S381. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1596924>

Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Valles-de la Mora, B., Capetillo-Leal, C.M., 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology* 131, 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.05.010>

Thangaraj, P., 2016. Extraction of Bioactive Compounds, in: *Pharmacological Assays of*

Plant-Based Natural Products. Springer International Publishing, Cham, pp. 11–13. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26811-8_3.

Thornton, P.K., 2010. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2853–2867. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>

Ueno, H.; Gonçalves, P.C. (Eds.) 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency, Tokyo, 144 p.

Wright, I.A., Tarawali, S., Blümmel, M., Gerard, B., Teufel, N., Herrero, M., 2012. Integrating crops and livestock in subtropical agricultural systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 1010–1015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4556>

Zabré, G., Kaboré, A., Bayala, B., Katiki, L.M., Costa-Júnior, L.M., Tamboura, H.H., Belem, A.M.G., Abdalla, A.L., Niderkorn, V., Hoste, H., Louvandini, H., 2017. Comparison of the *in vitro* anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. *Parasite*. 24, 1-11. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017044>

Zamble, A., Carpentier, M., Kandoussi, A., Sahpaz, S., Petrault, O., Ouk, T., Hennuyer, N., Fruchart, J.C., Staels, B., Bordet, R., Duriez, P., Bailleul, F., Martin- Nizard, F., 2006. *Paullinia pinnata* extracts rich in polyphenols promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47, 599–608.

Tabela 1: Plantas submetidas aos testes de inibição do desembainhamento de larvas L3 de *Haemonchus contortus*, coletadas em área de restinga do litoral brasileiro.

Nome da planta	Família	Forma de vida	Voucher
<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel	Apocynaceae	Árvore	MAR6882
<i>Maytenus erythroxyla</i> Reissek	Celastraceae	Arbusto	MAR9164
<i>Conocarpus erectus</i> L.	Combretaceae	Arbusto	MAR8252
<i>Terminalia lucida</i> Hoffmanns. ex Mart. & Zucc.	Combretaceae	Árvore	MAR8546
<i>Andira surinamensis</i> (Bondt) Splitg. ex Amshoff	Fabaceae	Árvore	MAR8553
<i>Chamaecrista ramosa</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby	Fabaceae	Arbusto	MAR9195
<i>Canavalia rosea</i> (Sw.) DC.	Fabaceae	Herbácea	MAR9178
<i>Enterolobium timbouva</i> Mart.	Fabaceae	Árvore	MAR6918
<i>Indigofera microcarpa</i> Desv.	Fabaceae	Erva	MAR8488
<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.	Fabaceae	Árvore	MAR10234
<i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Pers.	Hypericaceae	Arbusto	MAR8174
<i>Eugenia biflora</i> (L.) DC	Myrtaceae	Arbusto	MAR8366
<i>Ouratea hexasperma</i> (A.St.-Hil.) Baill	Ochnaceae	Árvore	MAR8246
<i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S.F. Blake	Polygalaceae	Liana	MAR9191
<i>Chomelia obtusa</i> Cham. & Schltdl.	Rubiaceae	Arbusto	MAR8490
<i>Matayba guianensis</i> Aubl.	Sapindaceae	Arbusto	MAR8257
<i>Paullinia pinnata</i> L.	Sapindaceae	Liana	MAR8112
<i>Manilkara triflora</i> (Allemão) Monach.	Sapotaceae	Arbusto	MAR8096
<i>Smilax</i> sp.	Smilacaceae	Liana	MAR9184

Tabela 2: Efeito anti-helmíntico *in vitro* de extratos hidroetanólicos de folhas de plantas do ecossistema de “restinga” sobre larvas L3 de *H. contortus*. Valores de IC₅₀ são apresentados para os extratos vegetais que apresentaram eficiência mínima de 50% na inibição do desembainhamento larvar de *H. contortus* na concentração de 1.200 µg/mL, com intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

Nome da planta	Família	Eficiência (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	CI95%	R ²
<i>Terminalia lucida</i>	Combretaceae	100	53 a	47 - 59	0.94
<i>Conocarpus erectus</i>	Combretaceae	100	340 b	324 - 356	0.99
<i>Indigofera microcarpa</i>	Fabaceae	100	351 b c	141 - 875	0.97
<i>Paullinia pinnata</i>	Sapindaceae	75	368 b c	293 - 462	0.85
<i>Himatanthus drasticus</i>	Apocynaceae	100	432 b	343 - 545	0.84
<i>Chamaecrista ramosa</i>	Fabaceae	71.4	452 c	379 - 539	0.88
<i>Vismia guianensis</i>	Hypericaceae	100	874 d	757 - 1.011	0.86
<i>Chomelia obtusa</i>	Rubiaceae	87.3	1.070 d	916 - 1.250	0.83
<i>Inga laurina</i>	Fabaceae	25	*	*	*
<i>Maytenus erythroxyla</i>	Celastraceae	22.2	*	*	*
<i>Ouratea hexasperma</i>	Ochnaceae	10.4	*	*	*
<i>Andira surinamensis</i>	Fabaceae	0	*	*	*
<i>Canavalia rosea</i>	Fabaceae	0	*	*	*
<i>Eugenia biflora</i>	Myrtaceae	0	*	*	*
<i>Enterolobium timbouva</i>	Fabaceae	0	*	*	*
<i>Manilkara triflora</i>	Sapotaceae	0	*	*	*
<i>Matayba guianensis</i>	Sapindaceae	0	*	*	*
<i>Securidaca diversifolia</i>	Polygalaceae	0	*	*	*
<i>Smilax</i> sp.	Smilacaceae	0	*	*	*

Efficiency (%): percentual médio de inibição do desembainhamento com extrato na concentração de 1.200 µg/mL. IC₅₀: concentração efetiva para 50% da população larvar de *H. contortus*. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas (P<0.05). * Não foi possível determinar a CI₅₀ devido a eficiência obtida estar abaixo de 50%. R²: coeficiente de determinação.

Destaques

- Plantas de ecossistema ameaçado tiveram efeito anti-helmíntico testado.
- Espécies da flora da restinga apresentaram propriedades anti-helmínticas *in vitro* contra *H. contortus*.
- *Terminalia lucida* apresentou potencial promissor no controle do nematódeo.

CAPÍTULO III:

Antiparasitic activities of hydroethanolic extracts of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb. (Convolvulaceae)

Artigo submetido ao periódico Journal of Ethnopharmacology

Antiparasitic activities of hydroethanolic extracts of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb. (Convolvulaceae)

Ana Cássia Medeiros Araujo^a, Eduardo Bezerra de Almeida Jr.^{b*}, Cláudia Quintino da Rocha^c, Aldilene da Silva Lima^d, Carolina Rocha e Silva^d, Marcelo Marucci Pereira Tangerina^e, José de Sousa Lima Neto^f, Lívio Martins Costa-Junior^d

a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

b Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

c Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

d Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

e Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Vicente, São Paulo, Brazil.

f Universidade Federal do Piauí, Departamento de Farmácia, Laboratório de Geoquímica Orgânica, Teresina, Piauí, Brazil.

*Corresponding author.

Phone: +55 (98) 3272-8542

E-mail: ebaj25@yahoo.com.br (E. B. de Almeida Jr.)

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Ipomoea imperati*, popularly known as “salsa” in Brazil, is widely used in tropical areas to treat several pathological conditions such as inflammation, pain and parasitic diseases. Although pharmacological studies have demonstrated analgesic, anti-inflammatory, and antinociceptive properties, the effect of this plant against parasitic species has not been investigated even being used for this purpose in the Brazilian northeastern.

Aim of the study: This study aimed to evaluate the anthelmintic and acaricide potential of a hydroethanolic extract of *I. imperati* leaves and stolons.

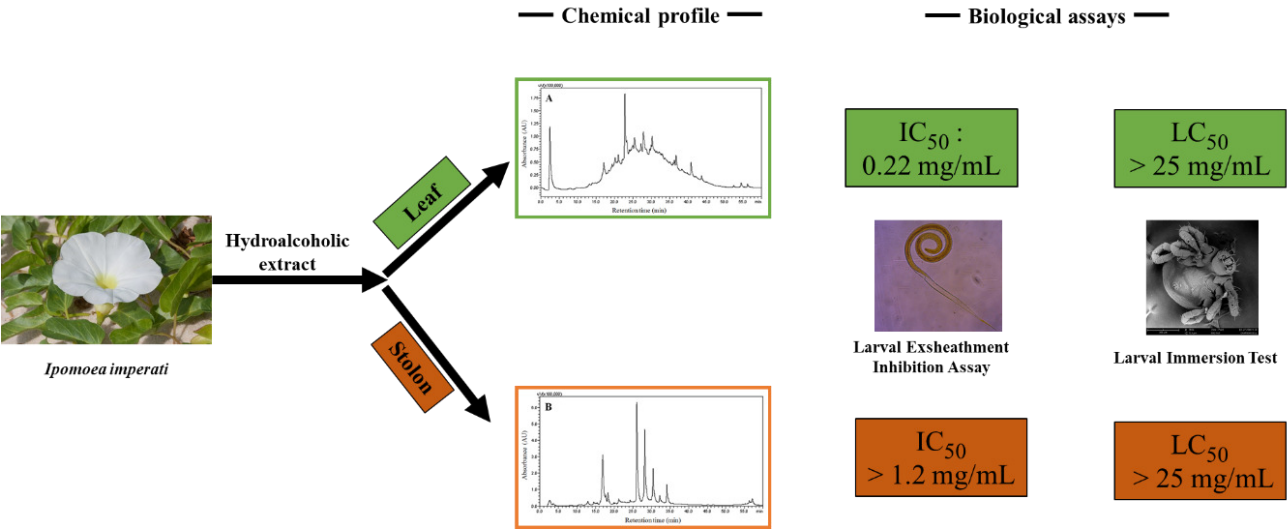
Materials and Methods: To obtain the hydroethanolic extract, *I. imperati* leaves and stolons were crushed and subjected to maceration in ethanol 70% (v/v), after which the solvent was removed using a rotary evaporator. The chromatographic profile of the extract was obtained by UV Spectrum high-performance liquid chromatography and compounds were identified by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Identification of the compounds present in the extract was achieved by comparing their retention times and UV spectra with data in the literature. Furthermore, the extract was used to evaluate anthelmintic and acaricidal activities *in vitro*. Anthelmintic activity was evaluated by larval exsheathment inhibition assays using *Haemonchus contortus* larvae and five concentrations of each extract ranging from 0.07 to 1.2mg / mL. Acaricide activity was evaluated via larval immersion of *Rhipicephalus microplus* larvae in eight concentrations of each extract ranging from 5.0 to 25.0 mg / mL. Live and dead larvae were counted after 24 hours. The median inhibitory concentration (IC₅₀) for *H. contortus* larvae and the median lethal concentration (LC₅₀) for *R. microplus* larvae were calculated for both extracts.

Results: Twelve compounds were observed in the hydroethanolic extract of leaves, with a predominance of the aglycone form of flavonoids and tannins. This extract was effective against *H. contortus* larvae, presenting an average inhibitory concentration of 0.22 mg/mL, but showed no activity toward *R. microplus* larvae. The stolon hydroethanolic extract presented 11 compounds, with phenolic acids and glycosylated flavonoids prevailing. This extract showed low activity toward *R. microplus* larvae (efficiency: 37.5%) and no effect on inhibiting *H. contortus* larval exsheathment at the concentrations tested.

Conclusion: None evidence of acaricide activity was observed for any of the tested extracts. However, demonstrate the *in vitro* anthelmintic activity of an hydroethanolic extract of *I. imperati* leaves.

Keywords: salsa, anthelmintic, acaricide, tannins, flavonoids.

Graphical abstract



1. Introduction

Parasitic infestations impose major limitations to the development of livestock, resulting in substantial losses in global productivity (Roeber et al., 2013). The tick *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) and the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobb, 1898 are among the main parasites infecting cattle and sheep, respectively (Qamar et al., 2011; Grisi et al., 2014). These parasites are prominent in tropical and subtropical areas (O' Connor et al., 2006; Ali et al., 2016) and cause damage to animals that leads to significant economic loss due to the reduction in productivity as well as to the expense of parasitic control (Qamar et al., 2011; Estrada-Peña and Salman, 2013; Grisi et al., 2014).

The use of plants derived from traditional knowledge as a palliative resource of treatment for such infestations is very common in developing countries (Qadir et al., 2010; Pavela et al., 2016). Although many plants have already been scientifically validated, there are still many species that have not yet been investigated, mainly in tropical areas where there is a great diversity of available flora (Athanasiadou et al., 2007, Zaman et al., 2017).

Ipomoea of the family Convolvulaceae is notable due to its abundant species richness, comprising between 600 and 700 species that are largely concentrated in the Americas (Austin and Huáman, 1996). Many of these species are used empirically in the treatment of several pathological conditions, but relevant properties have only been investigated for a few of these species (Meira et al., 2012). An important species used in traditional medicine is *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb., popularly known as "salsa", "campainha branca" or "salsa da praia" in Brazil (or "beach morning glory" in other countries), names also used for other species of *Ipomoea* [e.g. *I. pes-caprae* (L.) R.Br., *I. asarifolia* (Desr.) Roem. & Schult] (Jardim et al., 2005). A perennial herb that is stoloniferous and halophytic, with a white gamopetalous corolla and oblong leaves, *I. imperati* occurs most frequently in the area near the sea, occupying coastal dunes (Lonard and Judd, 1999; Costa Neto et al., 2000; Ferreira and Miotto, 2009; Felger et al., 2012). Rural communities in the Maranhão State, Brazil, have used this plant for antiparasitic purposes, in tick control and diarrhea treatment in ruminants (Costa Jr, personal communication). Based on pharmacological studies, the important therapeutic potential of this species involves antinociceptive (Paula-Zurron et al., 2010), anti-oxidative, anti-ulcerogenic (Miyahara et al., 2011), anti-spasmodic and anti-inflammatory (Paula et al., 2003; Cai et al., 2014) properties.

In the face of the reports of indications of popular use for parasitic control and the lack of experimental verification regarding antiparasitic property of this species, the present study aims to investigate differences in the chemical composition and effectiveness of extracts of different parts of *I. imperati* against the tick *R. microplus* and the nematode *H. contortus*.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Leaves and stolons of *I. imperati* were collected in an area of Restinga (02°28' 23"S, 44°03'13"W), located in the municipality of São José de Ribamar, State of Maranhão, Brazil, in December 2016 (dry season). The plant was herborized and identified, and a sample (voucher specimen - MAR 9180) is deposited at the Herbarium of Maranhão (MAR), located in Federal University of Maranhão, Brazil (Almeida Jr., 2015).

2.2. Preparation of extracts

The plant material (leaves and stolons) was dried in air circulation oven (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) at 40°C and crushed in a knife mill (Tecnal). After, the resulting material of each plant part was separately subjected to maceration for seven days in 70% (v/v) ethanol. The solution was filtered every 48 hours, and the residue was re-extracted using the same amount of solvent. This procedure was repeated to obtain three extractions. The solvent was removed by evaporation using a rotary evaporator to obtain the hydroethanolic extract (Thangaraj, 2016).

2.3. Chemical characterization

The samples were filtered through a 0.22-µm PTFE filter and dried. The dry extract was diluted to 10 mg / mL in high-performance liquid chromatography (HPLC) solvent. Aliquots of 20 µL were injected directly into an UV Spectrum HPLC (UV-HPLC) with detection at 254 nm. A Shimadzu model HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used, consisting of a solvent delivery module with a double-plunger reciprocating pump and UV-VIS detector (SPA-10A); a Luna 5-µm C18 100 A (150 µm x 4.6 µm) column was used. The A and B elution solvents were 2% acetic acid in water and methanol, respectively, according to the following gradient: 5% at 100% of B in 60 min. The flow rate was 1 mL / min, and the column

temperature was 20°C. Data were collected and processed using LC Solution software (Shimadzu).

The extracts were analyzed using a Shimadzu Prominence liquid chromatography system with two Shimadzu LC-20AD automatic injector (SIL-20A HT) pumps. A C18 Shim-pack XR-ODS (2 mm x 30 mm, 2.2 μ m) column was used in the analyses. The mobile phase was acidified ultrapure water (0.05% HCOOH) and HPLC grade methanol, also acidified (0.05% HCOOH), at a flow rate of 0.25 mL / min, with the methanol gradient increasing as follows: 2% methanol in 0-2 min; 10% in 5 min; 20% in 7 min and 100% in 30 min. The injection volume was 5.0 μ L. The LC was coupled to a mass spectrometer (Amazon X, Bruker, Massachusetts, USA) equipped with electrospray ionization (ESI) and an ion-trap (IT) type analyzer in negative mode, under the following conditions: 5 kV capillary voltage, capillary temperature 220°C, entrainment gas (N₂) flow 8 L / min, nitrogen nebulizer pressure at 10 psi. The acquisition range was m/z 100-1000, with two or more events. Standards at 50 ppm were included.

Direct flow infusion of the samples was performed with a Thermo Scientific LTQ XL linear ion trap analyzer equipped with an electrospray ionization (ESI) source, in negative mode (Thermo, San Jose, CA, USA). A stainless-steel capillary tube at 280°C, spray voltage of 5.00 kV, capillary voltage of -90 V, tube lens of -100 V and 5 μ L / min flow were applied. Full scan analysis was recorded in m/z ranging from 100-1000. Multiple-stage fragmentations (ESI-MSⁿ) were performed using the collision-induced dissociation (CID) method against helium for ion activation. The first event was a full-scan mass spectrum to acquire data on ions in that m/z range. The second scan event was an MS/MS experiment performed by using a data-dependent scan of [M-H]⁻ molecules from the compounds of interest at a collision energy of 30% and an activation time of 30 ms. Product ions were then subjected to further fragmentation under the same conditions until no more fragments were observed. Identification of the different compounds in the chromatographic profiles of the hydroethanolic extracts was performed by comparing their retention times and UV spectra with literature data.

2.4. Biological assays

The experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Animal Ethics Committee of Federal University of Maranhão and were approved by this committee under protocol number 23115018061/2011-11.

2.4.1. Anthelmintic test

Third-stage larvae (L₃) were obtained from a donor sheep with a monospecific experimental infection of *H. contortus* isolated from a naturally infected goat. The assay for larval exsheathment inhibition was performed as previously described by Bahuaud et al. (2006). Five concentrations were prepared for each of the two extracts (leaves and stolons): 1.2, 0.6, 0.3, 0.15 and 0.07 mg / mL, all diluted in 2% methanol. The negative control was 2% methanol. Briefly, the L₃ larvae were incubated in the different concentrations for 3 h at 22°C, after which the larvae were washed with phosphate-saline buffer (PBS) and centrifuged (3000 rpm) three times. Approximately 1000 larvae/tube were subjected to artificial exsheathment by contact with sodium hypochlorite (2.0%, w/v) and sodium chloride (16.5%, w/v). Four replicates were performed per concentration. The kinetics of larval exsheathment in the different experimental treatments was then monitored at 0, 20-, 40- and 60-min intervals by microscopic observations (40×).

2.4.2. Acaricidal test

Engorged *R. microplus* females susceptible to all known synthetic chemical acaricides (Porto Alegre strain) were collected from calves experimentally infested with and without recent contact with chemical acaricides. The engorged females collected were washed in water and maintained in the laboratory at 27°C and ≥80% relative humidity (RH) until oviposition was completed. The 14 to 21-day-old larvae resulting from those eggs were used for the larval immersion test.

The larval immersion test was performed according to the method of Klafke et al. (2006). The extracts (leaves and stolons) were diluted in 70% ethanol at eight concentrations ranging from 5.0 to 25.0 mg / mL. A 1-mL aliquot of each concentration was transferred to 1.5-mL tubes, and approximately 500 tick larvae were placed in each tube; 70% alcohol was used as the control. Immediately after addition of the larvae, the tube was closed, and the mixture was vigorously agitated. After 10 min, the larvae were transferred to a filter paper to dry. After drying, approximately 100 larvae were transferred to a clean dry filter paper (8.5 × 7.5 cm) that

was folded and closed with clips. The packets were incubated at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and $\geq 80\%$ RH for 24 h. Dead and live larvae were counted. Four replicates were performed for each concentration.

2.5. Statistical analysis

The inhibitory concentration (IC_{50}) of *H. contortus* larval exsheathment and the lethal concentration (LC_{50}) for *R. microplus* larvae for both extracts were calculated in GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) with respective 95% confidence intervals (95% CIs). The extracts were considered significantly ($p < 0.05$) more (or less) efficient than another extract when there was no overlap between the 95% CIs of the LC_{50} or IC_{50} values (Roditakis et al., 2005).

3. Results and Discussion

The present study evaluated the antiparasitic effects of separately prepared hydroethanolic extracts of *I. imperati* leaves and stolons against larvae of the nematode *H. contortus* and of the tick *R. microplus*. The leaf and stolon extracts of *I. imperati* showed different chromatographic profiles (Figure 1). The *I. imperati* leaf extract exhibited 12 secondary compounds, with various flavonoid aglycones and condensed tannins (Table 1), as evidenced by overlapping peaks and low resolution in reverse phase (Figure 1A). Eleven secondary compounds were found in the stolon extract, with a predominance of phenolic acids and glycosylated flavonoids (Table 1) and high resolution in reverse phase (Figure 1B). The compounds found in the *I. imperati* leaf extract confirm the results obtained by Jardim et al. (2005), whose preliminary phytochemical screening also showed the presence of tannins and flavonoids. However, the secondary compounds present in the leaves and stolons of *I. imperati* were identified for the first time in the present study. Chemical characterization of plant extracts is fundamental for understanding pharmacological effects and for the validation or discovery of biologically active compounds (Dias et al., 2012).

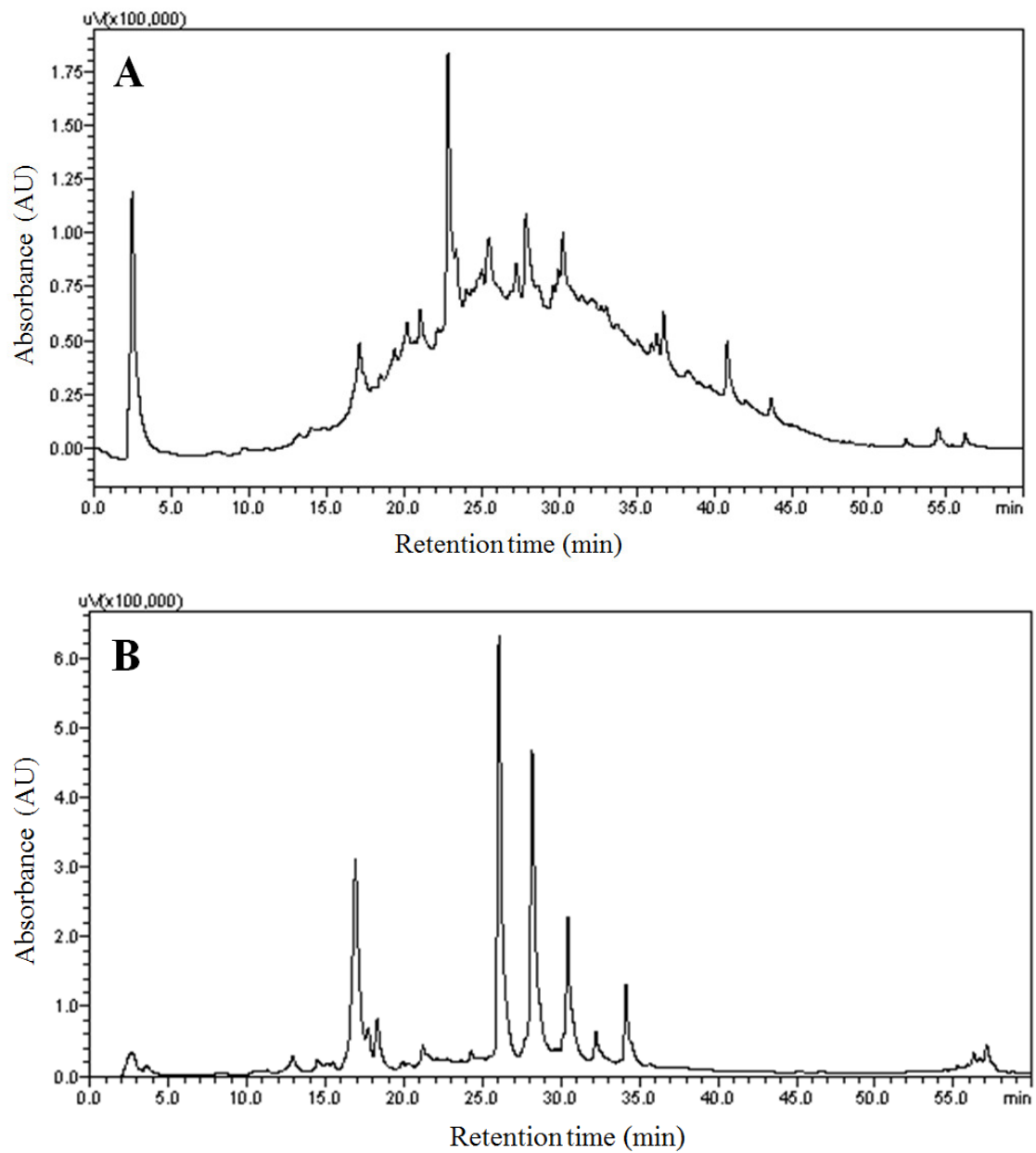


Figure 1. HPLC-UV chromatogram (254 nm) of *Ipomoea imperati* leaf (A) and stolon (B) hydroethanolic extracts.

Table 1. Identification of compounds in *Ipomoea imperati* leaf and stolon hydroethanolic extracts by LC-ESI-IT/MS.

	[M-H]	MS ⁿ fragments	Compound
<i>Ipomoea imperati</i> (leaves)	285	267; 241; 227	Kaempferol
	283	268	Acacetin
	447	429; 357	Isoorientin
	433	301; 271; 151	Quercetin-xyloside
	297	267; 161	3',7-Dimethoxy-3-hydroxyflavone
	463	301	Isoquercitrin
	431	313; 283	Isovitexin
	595	433; 301	Peltatoside
	594	355; 149	Pelargonin (antocianin)
	609	447;301;285	Rutin
	575	423; 289	Procyanidin A-type Dimer
	491	476; 329; 215	Iristectorin A
<i>Ipomoea imperati</i> (stolons)	173	155;111	Shikimic acid
	191	173; 93	Quinic acid
	207	199;162	3,4-Dimethoxycinnamic acid
	297	211; 161	3-hydroxy-3',4-dimethoxyflavone
	353	191;173	Chlorogenic acid
	431	287; 165	Kaempferol-rhamnopyranoside
	315	299	Isochlorogenic Acid A
	594	594; 450; 354	Pelargonin (antocianin)
	593	285; 227	Kaempferol-Glucoside-Rhamnoside
	415	254	Daidzin

Anthelmintic activity was evaluated by a larval exsheathment inhibition assay to determine the potential of the extract to inhibit sheath loss in third-stage larvae (L₃) of *H. contortus*. Preventing sheath loss in *H. contortus* larvae breaks the larval life cycle (Bahuaud et al., 2006) and does not allow establishment of an infection in the host (Hoste et al., 2012). This test is a sensitive tool for detecting anthelmintic activity in plant extracts and enables comparisons with other species (Alonso-Díaz et al., 2011). In the present study, the

hydroethanolic extract of *I. imperati* leaves showed satisfactory results in larval exsheathment inhibition, with a linear reduction in exsheathed larvae with increasing dose (Figure 2) and an IC_{50} of 0.22 mg/mL (Table 2). Similar values are demonstrated for Alonso-Díaz et al. (2011) for the tropical plants *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. and *Brosimum alicastrum* Sw. that presented inhibitory concentrations (IC_{50}) of 0.21 mg / mL and 0.29 mg / mL, respectively. Other tropical plants evidence total inhibition of the larval exsheathment in 0.3 mg/mL (Oliveira et al., 2011) and 1.2 mg/mL (Son-De-Fernex et al., 2012).

In contrast, all *H. contortus* larvae were able to exsheath, even at the highest concentration tested, in the *I. imperati* stolon extract, demonstrating the difference between these extracts (Table 2). Extracts of several plant species are rich in phenolic compounds that inhibit nematode exsheathment (Moreno-Gonzalo et al., 2013; Mengistu et al., 2017). However, few studies have reported different activities among parts of the same plant (Brito et al., 2017).

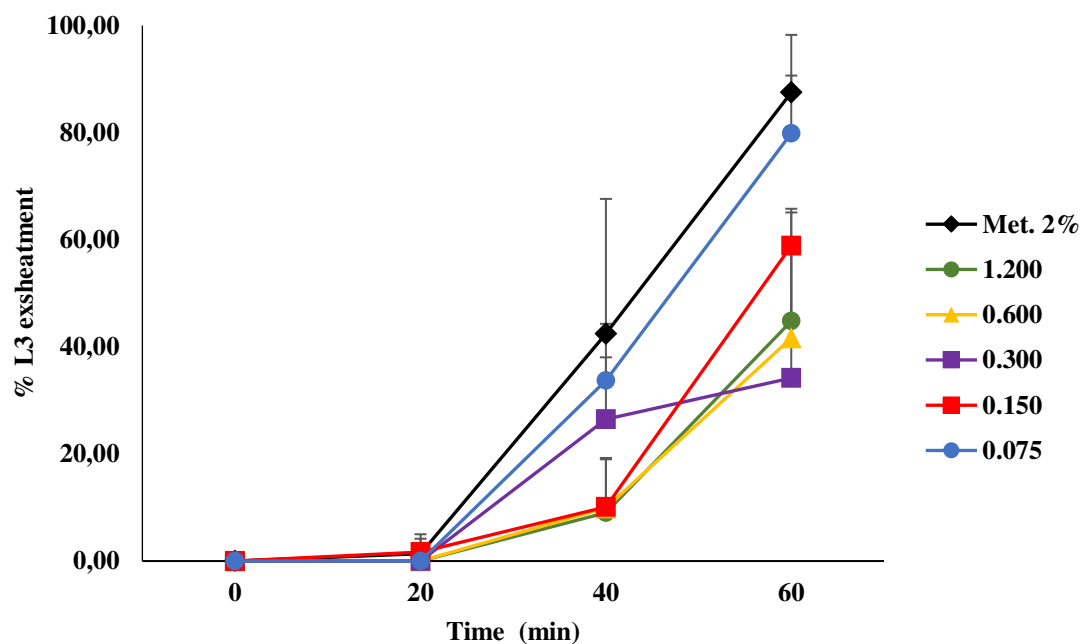


Figure 2. Effect of the *Ipomoea imperati* leaf extract on *in vitro* artificial third-stage larvae (L₃) of *Haemonchus contortus*.

Table 2. Effective concentration of *Ipomoea imperati* leaf and stolon extracts required to inhibit exsheathment of 50% of the larval population of *Haemonchus contortus* (IC₅₀), with the 95% confidence interval.

Species	Plant part	IC ₅₀ (mg/mL)	IC95%	R ²
<i>Ipomoea imperati</i>	Leaf	0.22	0.18 – 0.26	0.84
	Stolon	> 1.2	*	*

*=Unable to determine because the IC₅₀ values are below the minimal detection limit of the assay.

The results of screening for compound identification show primarily nonpolar compounds in the leaf extract and polar compounds in the stolon extract (Table 1). A higher nonpolar content can positively influence anthelmintic activity effectiveness (Karamaj et al., 2010). This is due to the abundance of lipids in the cuticle of nematodes, providing greater transcuticular permeation capacity to less polar substances, resulting in stronger anthelmintic activity (Zhou et al., 2014). Thus, the nonpolar profile of the leaf extract might have contributed to enhance penetration and consequent activity in the larval exsheathment assay.

Another marked difference between the extracts is the presence of tannins (procyanidin A-type dimer) in the *I. imperati* leaf extract, but with no evidence of such molecules in the stolon extract (Table 1). Several studies have reported the anthelmintic effect of certain plants due to the presence of tannins among the chemical constituents of extracts, observing a reduction in or absence of biological activity in extracts due to the addition of compounds such as polyethylene glycol or polyvinyl polypyrrolidone that counteract tannins/phenolics (Bahuaud et al., 2006; Minho et al., 2008; Alonso-Díaz et al., 2008; Azando et al., 2011; Son-De-Fernex et al., 2012; Oliveira et al., 2017). The action of tannins is mainly revealed by larval exsheathment inhibition (Spiegler et al., 2017), which may be responsible for the nematocidal activity observed for the *I. imperati* leaf extract. The influence of tannins in inhibiting sheath loss in L₃ of *H. contortus* has been attributed to the strong similarity with amino acids (proline and hydroxyproline) present in the proteins that compose the structure (Hoste et al., 2012). Formation of such a complex would promote ultrastructural modifications in the sheath, preventing exchange between the environment and larval tissue and causing asphyxia or toxicity (Brunet et al., 2011).

Structural differences such as condensed tannin polymer size and major tannin type (procyanidins and prodelphinidins) interfere with anthelmintic activity (Quijada et al., 2015). In addition to the procyanidins found in the leaf extract, which is less active on nematodes, we

found a large amount of flavonoids with recognized anthelmintic potential, such as kaempferol, isoquercitrin (derived of quercetin), and rutin compounds (Table 1) (Barrau et al., 2005; Lasisi and Kareem, 2011; Akkari et al.; 2016). A synergistic anthelmintic effect between tannin and flavonoids has been reported (Klongsiriwet et al., 2015; Mengistu et al., 2017) and maybe responsible for the anthelmintic activity of the *I. imperati* leaf extract in the present study.

Although other species of *Ipomoea* are used as antihelminth treatment (Meira et al., 2012; Zia-Ul-Haq et al., 2012; Malakar and Choudhury, 2015), few studies have demonstrated bioactivity. Indeed, the *in vitro* effectiveness of *I. imperati* has only been shown in a study on *H. contortus* larvae, and only *Ipomoea staphylina* and *Ipomoea carnea* have been investigated for anthelmintic activity against earthworms (Firdous and Gosh, 2014; Dhembare and Kakad, 2015). These data signify the importance of this genus in worm control, which should encourage the exploration of new species, preferably those that already have a history of use in popular medicine.

Regarding *R. microplus* tick assays, the *I. imperati* stolon extract presented low activity (35.7%) at 25 mg / mL. We suggest that this minor activity is due to compounds derived from cinnamic acid (quinic acid and 3,4-dimethoxycinnamic acid) (Table 2), which has been associated with acaricide effects (Zhang et al.; 2015).

4. Conclusions

This study is the first to assess the anthelmintic and acaricidal activities of *I. imperati*. Data reported give no evidences to support the acaricidal property of *I. imperati* in controlling *R. microplus*. But, confirm promising potential of *I. imperati* leaves hydroethanolic extract against *H. contortus*. This effect could be due to its secondary compounds presents in this extract, such as procyanidin, kaempferol, isoquercitrin and rutin.

Author contributions

ACMA, LMCJ, CQR and EBAJ designed the study and conducted the research as well analyzed data and wrote the manuscript. ACMA and CQR prepared the extracts of the plant. CQR, MMPT and JSLN performed the characterization and identification of the chemical compounds. ACMA, LMCJ, ASL and CRS performed the antiparasitic assays and data analysis. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported through grants from FAPEMA (Maranhão State Research Foundation, Brazil) and CNPq (The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development). A.C.M. Araújo and A.S. Lima received a postgraduate scholarship from FAPEMA. C.R. Silva received a postgraduate scholarship from CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil). The authors would also like to thank CNPq for a fellowship to L.M. Costa-Júnior, Dr. JRS Martins for donating the *R. microplus* strain and Gustavo Lima for collaboration during field collections.

References

- Akkari, H., B'Chir, F., Hajaji, S., Rekik, M., Sebai, E., Hamza, H., Darghouth, M.A., Gharbi, M., 2016. Potential anthelmintic effect of *Capparis spinosa* (Capparidaceae) as related to its polyphenolic content and antioxidant activity. *Vet Med (Praha)*. 61, 308-316.
- Ali, A., Parizi, L.F., Ferreira, B.R., Vaz Junior, I.S., 2016. A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis*. *Cienc. Rural*. 46, 1240–1248.
- Almeida Jr., E.B., 2015. Herbário do Maranhão, Maranhão (MAR). *Unisantia Bioscience* 4, 129-132. Edição Especial.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniniferous plants. *Vet. Parasitol.* 153, 313–319.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 181, 360-364.
- Athanasiadou, S., Githiori, J., Kyriazakis, I., 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal* 1, 1392–1400.
- Austin, D. F., Huáman, Z. 1996. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. *Taxon* 45, 3-38.
- Azando, E.V., Hounzangbé-Adoté, M. S., Olounladé, P.A., Brunet, S., Fabre, N., Valentin, A., Hoste, H., 2011. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 180, p. 292-297.

- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 131, 531–538.
- Brito, D.R.B.; Costa Júnior, L.M., Garcia, J.L., Lopes, S.G., Santos, G.C.O., Sousa, J.V.S., 2017. *In vitro* action of *Mimosa caesalpinifolia* ketone extract on *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Semin Cienc Agrar.* 38, 1963-1972.
- Brunet, S.; Fourquaux, I.; Hoste, H., 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol. Int.* 60, 419–424.
- Cai, C., Chen, Y., Zhong, S., Ji, B., Wang, J., Bai, X., Shi, G., 2014. Anti-Inflammatory Activity of N-Butanol Extract from *Ipomoea stolonifera* in *Vivo* and *in vitro*. *PLoS ONE* 9, e9593.
- Costa Neto, S.V., Santos, J.U.M.; Bastos, M.N.C., Amaral, D.D., Lobato, L.C.B., 2000. Composição florística das formações herbáceas da restinga do Crispim, Marapanim – Pará. *Bol. Mus. Paraense Emilio Goeldi, Bot.* 16, 163-209.
- Dhembare, A.J., Kakad, S.L., 2015. Evaluation of anthelmintic activity of *Ipomoea carnea* Jacq leaf extract. *Pharm Lett.* 7, 262-265.
- Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U., 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2, 303-336.
- Estrada-Peña, A., Salman, M., 2013. Current Limitations in the Control and Spread of Ticks that Affect Livestock: A Review. *Agriculture* 3, 221–235.
- Felger, R. S., Austin, D.F., Devender, T.R.V., Sánchez-Escalante, J.J., Costea, M., 2012. Convolvulaceae of Sonora, Mexico. I. *Convolvulus*, *Cressa*, *Dichondra*, *Evolvulus*, *Ipomoea*, *Jacquemontia*, *Merremia*, and *Operculina*. *J. Bot. Res. Inst. Texas.* 6, 459-527.
- Ferreira, P. P. A., Miotto, S. T. S., 2009. Sinopse das espécies de *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Biocienc.* 7, 440-453.
- Firdous, S. M., Gosh, S., 2014. Effect of aqueous extract of *Ipomoea staphylina* on indian earthworm. *Asian J Pharm Clin Res.* 7, 162-164.

- Grisi, L., Leite R.C, Martins J.R, Barros A.T, Andreotti R., Cançado P.H, León A.A, Pereira J.B, Villela H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 23, 150–156.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-de-Montellano, C., Manolaraki, S., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet. Parasitol.* 186, 18-27.
- Jardim, M.A.G., Silva, J.C., Costa-Neto, S.V., 2005. Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodoal, Município de Maracanã, Estado do Pará, Brasil - Resultados preliminares. *Rev.Bras. Farm.* 86, 117-118.
- Kamaraj, C., Rahuman, A.A., Bagavan, A., Mohamed, M.J., Elango, G., Rajakumar, G., Zahir, A.A., Santhoshkumar, T., Marimuthu, S., 2010. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Parasitol. Res.* 106, 1071-1077.
- Klafke, G. M., Sabatini, G.A., Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller R.J., Schumaker, T.T., 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 142, 386–390.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H., 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 5, 127-134.
- Lasisi, A. A., Kareem, S. O., 2011. Evaluation of anthelmintic activity of the stem bark extract and chemical constituents of *Bridelia ferruginae* (Benth) Euphorbiaceae. *Afr. J. Plant Sci.* 5, 469-474.
- Lonard R.I, Judd F.W., 1999. The biological flora of coastal dunes and wetlands. *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb. *J. Coast. Res.* 15, 645–652.
- Malakar, C., Choudhury, P.P.N., 2015. Pharmacological potentiality and medicinal uses of *Ipomoea aquatica* Forsk: A review. *Asian J Pharm Clin Res.* 8, 60-63.
- Meira, M., Silva, E.P., David, J.M., David, J.P., 2012. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Rev. bras. farmacogn.* 22, 682-713.

- Mengistu, G., Hoste, H., Karonen, M., Salminen, J.P., Hendriks, W.H.; Pellikaan, W.F., 2017. The *in vitro* anthelmintic properties of browse plant species against *Haemonchus contortus* is determined by the polyphenol content and composition. *Vet. Parasitol.* 15, 110-116.
- Minho, A.P., Bueno, I.C., Gennari, S.M., Jackson, F., Abdalla, A. L., 2008. *In vitro* effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 144-148.
- Miyahara, M.R.M., Imamura, P.M.; Freitas, J.C., Leonor, S.J., Baffa, O., Kinoshita, A., Paula-Zurron, A.C.B., 2011. Anti-oxidative and anti-ulcerogenic activity of *Ipomoea imperati*. *Rev. bras. farmacogn.* 21, 978-985.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L. M., Hoste, H., Ferre, I., 2013. *In vitro* effect of heather (Ericaceae) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 197, 235-243.
- O'Connor L. J., Walkden-Brown S. W., Kahn L. P., 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet. Parasitol.* 142, 1–15.
- Oliveira, A.F.; Costa Junior, L.M.; Lima, A.S.; Silva, C.R.; Ribeiro, M.N., Mesquista, J. W., Rocha, C.Q., Tangerina, M. M., Vilegas, W., 2017. Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. *Vet. Parasitol.* 236, 121-127.
- Oliveira, L.M.B. de, Bevilaqua, C.M.L., Macedo, I.T.F., Morais, S.M. de, Monteiro, M.V.B., Campello, C.C., Ribeiro, W.L.C., Batista, E.K.F., 2011. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20, 155–160.
- Paula, A.C., Hayashi, L.S., Freitas, J.C., 2003. Anti-inflammatory and antispasmodic activity of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb (Convolvulaceae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 105-112.
- Paula-Zurron, A.C.B., Petraglia, N.M.M., Aur, C.R., Moura, S.H.P., Imamura, P.M., Freitas, J.C., Catanzaro-Guimarães, S.A., 2010. Antinociceptive activity of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb., Convolvulaceae. *Rev. bras. farmacogn.* 20, 180-185.
- Pavela, R., Canale, A., Mehlhorn, H., Benelli, G., 2016. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: A review. *Res. Vet. Sci.* 09, 1-9.
- Qamar, M.F., Maqbool, A., Ahmad, N., 2011. Economic losses due to *Haemonchosis* in sheep and goats. *Sci Int (Lahore).* 23, 321-324.

- Qadir, S., Dixit, A. K., Dixit, P., 2010. Use of medicinal plants to control *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Vet World*. 3, 515-518.
- Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2015. Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6346-54.
- Roeber, F., Jex, A. R., Gasser, R. B., 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasit Vectors*. 6, 1-13.
- Roditakis E., Roditakis N. E., Tsagkarakou, A., 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Manag. Sci.* 61, 577-582.
- Spiegler, V., Liebau, E., Hensel, A., 2017. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Nat. Prod. Rep.* 4, 627-643.
- Son-De Fernex, E., Alonso-Diaz, M.A., Valles-De La Mora, B., Capetillo-Leal, C. M., 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp Parasitol.* 131, 413-418.
- Thangaraj, P., 2016. Extraction of Bioactive Compounds, in: *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*. Springer International Publishing, Cham, pp. 11–13. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26811-8_3.
- Zaman, M.A., Z. Iqbal, Z., Sindhu, Z.U.D, Abbas, R.Z., Qamar, M.F., 2017. An overview of plants with acaricidal and anthelmintic properties. *s. Int. J. Agric. Biol.* 19, 957–968.
- Zhang, B., Lv, C., Li, W., Cui, Z., Chen, D., Cao, F., Miao, F., Zhou, L., 2015. Ethyl cinnamate derivatives as promising high-efficient acaricides against *Psoroptes cuniculi*: synthesis, bioactivity and structure-activity relationship. *Chem. Pharm. Bull.* 63, p. 255-262.
- Zhou, X., Deng, J.N., Hummel, B.D., Woods, D.J., Collard, W. T., HU, S.X., Zaya, M.J., Knauer, C.S., Thompson, D.P., Merritt, D.A., Lorenz, J.K., Marchiondo, A.A., 2014. Development of an *in vitro* Screen for Compound Bioaccumulation in *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 100, 848-855.
- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., Feo, V. D., 2012. *Ipomoea hederacea* Jacq.: A Medicinal Herb with Promising Health Benefits. *Molecules* 17, 13132-13145.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve por proposta identificar espécies provenientes da restinga com atividade contra o parasito de interesse pecuário, *H. contortus*. Além disto, visou investigar as propriedades anti-helmíntica e carrapaticida de uma planta de restinga utilizada por produtores rurais no controle do carrapato *R. microplus* e do nematódeo *H. contortus*, a *I. imperati*. Foram identificadas oito espécies de restinga com atividade antiparasitária sobre larvas de *H. contortus*. Além disso, evidências de atividade anti-helmíntica foram fornecidas para *I. imperati*, mas não foi confirmada atividade carrapaticida para o extrato hidroetanólico desta espécie sobre *R. microplus*. Os resultados desta pesquisa apresentam novas possibilidades para o controle alternativo de *H. contortus* demonstrando que as restingas brasileiras, ainda pouco exploradas em estudos de bioprospecção, são uma importante fonte de recursos terapêuticos e podem contribuir potencialmente no controle parasitário, o que reforça a necessidade de conservação destas áreas naturais. Ressalta-se que estes dados devem ser utilizados como subsídios para estudos mais conclusivos, os quais poderão validar a utilização destas espécies para a formulação de um bioproduto.