

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANDRESSA RADTKE BAUNGRATZ

**EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE HELMINTOS  
GASTROINTESTINAIS DE OVINOS E CAPRINOS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS  
2019

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANDRESSA RADTKE BAUNGRATZ

**EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE HELMINTOS  
GASTROINTESTINAIS DE OVINOS E CAPRINOS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS

2019

ANDRESSA RADTKE BAUNGRATZ

**EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE HELMINTOS  
GASTROINTESTINAIS DE OVINOS E CAPRINOS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Macedo

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Martins Costa  
Maia

DOIS VIZINHOS

2019

B349e      Baungratz, Andressa Radtke.  
              Extrato de própolis verde no controle de helmintos  
              gastrointestinais de ovinos e caprinos: estudos *in vitro* e *in vivo*.  
              / Andressa Radtke Baungratz – Dois Vizinhos, 2019.  
              115 f.: il.

                 Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Vicente de Paulo Macedo.  
                 Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fabiana Martins Costa Maia.  
                 Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica  
                 Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em  
                 Zootecnia, Dois Vizinhos, 2019.  
                 Bibliografia p.86-111.

                 1. Plantas medicinais. 2. Anti-helmínticos. 3. Ovinos.  
                 4. Caprinos I. Macedo, Vicente de Paulo, orient. II. Maia,  
                 Fabiana Martins Costa, coorient. III. Universidade Tecnológica  
                 Federal do Paraná – Dois Vizinhos. IV. Título

CDD: 636.3



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Dois Vizinhos  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Título da Dissertação nº 115**

### **EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE OVINOS E CAPRINOS**

**Andressa Radtke Baungratz**

Dissertação apresentada às quatorze horas do dia sete de março de dois mil e dezenove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, Linha de Pesquisa – Produção e Nutrição Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho .....

Banca examinadora:

---

**Dr. Vicente de Paulo Macedo**

**UTFPR - DV**

---

**Dra. Katia Atoji Henrique**

**UTFPR - DV**

---

**Dra. Luciana Pereira Machado**

**UFFS - Realeza**

---

**Coordenador do PPGZO**

**Assinatura e carimbo**

\*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter me dado saúde e força para enfrentar os obstáculos e vencer os desafios até o presente momento.

Aos meu pais, Nelson e Enaide, que estiveram sempre ao meu lado não medindo esforços para que tudo isso fosse possível, com vocês aprendi que a vida possui inúmeros valores que não encontramos a venda em lugar algum, e permitem nos tornar a pessoa que somos hoje.

Ao meu namorado Tiago, pelo companheirismo e acima de tudo respeito, obrigada por me incentivar a ser uma pessoa melhor a cada dia, por me ensinar a entender meus erros e falhas e permitir buscarmos juntos novos acertos sempre.

Ao meu orientador professor Dr. Vicente de Paulo Macedo, pela confiança durante todos esses anos de trabalho e aprendizado, por me ensinar não somente conhecimentos técnicos, mas também sobre os inúmeros tropeços e recompensas da vida. Obrigada pela amizade e pelo reconhecimento!

À minha coorientadora, professora Dra. Fabiana Martins Costa Maia, por toda a ajuda no que diz respeito à própolis, pela paciência e disponibilidade em conversar sempre que se fez necessário.

Aos pesquisadores do IAPAR, Dr. João Ari Gualberto Hill e Dr. André Finkler da Silveira, por permitirem a realização deste trabalho e por todo o auxílio despendido. Obrigada pela amizade que construímos e pela experiência de profissionalismo repassada.

À professora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, pelo auxílio com as análises químicas e demais procedimentos. Obrigada por abrir as portas da Central de Análises para que o pontapé inicial deste trabalho fosse dado. Aos bolsistas estagiários do laboratório Matheus Calegari e Anaclara Prasniewski e demais técnicos e alunos por todo o auxílio com as análises químicas.

Ao professor Dr. Marcelo Beltrão Molento por me receber em seu laboratório e repassar todo seu conhecimento. Obrigada por todo o auxílio com os testes em laboratório e por despertar ainda mais o senso crítico nesta pesquisa. À doutoranda Carla Dolenga, por todo o apoio no período no laboratório de Parasitologia Veterinária e pela amizade que construímos!

À professora Dra. Luciana Machado Pereira, pela prestatividade e auxílio com as análises sanguíneas. À estagiária do laboratório Jucemara Medel de Medeiros por todo auxílio quanto a realização das análises.

À todos os funcionários do IAPAR pela ajuda com a condução do experimento, aos funcionários e servidores da UTFPR-DV pela disponibilidade de auxílio sempre que necessário, professores e alunos que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos estagiários do GEOVICAPRI pela ajuda sempre que necessária, obrigada por terem abraçado a iniciativa deste trabalho junto conosco!

Aos professores, técnicos e estagiários dos laboratórios de Anatomia Animal, Fisiologia Vegetal, e Bromatologia da UTFPR-DV, pela disponibilidade na utilização de equipamentos e realização de análises.

Ao PPGZO, principalmente a secretária Carine Giaretta, pela dedicação e disponibilidade em auxiliar sempre que se foi necessário. Demais professores e funcionários, obrigada por todo apoio.

À todos os amigos, familiares e colegas de pós-graduação, que compreenderam a ausência em alguns momentos para que a realização deste se tornasse possível. Pelo apoio, por cada palavra amiga e por me ouvirem falar de própolis durante toda a realização deste projeto.

À CAPES, pelo auxílio financeiro destinado à realização deste trabalho.

*Muito obrigada!*

(...) Tem aquela história da criança que sonhava em ser astronauta, mas ouviu a vida inteira: você deveria ser mais pé no chão! Você está sonhando muito alto! A realidade é mais pesada do que você imagina... Mas só quem mira a lua sabe que o sonho começa aonde a gravidade termina. Quem tenta impor seus limites nos cerca com a própria limitação, e por isso que ela ria, da falta de imaginação. Às vezes não é preciso habitar o espaço inteiro, basta que respeitem o seu. E hoje quando ela olha a terra lá de cima não se sente superior... Ela é do tamanho que escolheu!!! Não dá pra deixar uma opinião qualquer nos impedir de chegar aonde a gente quer. E desde que não prejudique ninguém, suas escolhas são suas! Mas se alguém duvidar de onde chega o seu potencial, mande um cartão postal... da lua!

*Voz ao verbo nº 101 – Allan Dias Castro*



## RESUMO

BAUNGRATZ, Andressa Radtke. Extrato de própolis verde no controle de helmintos gastrointestinais de ovinos e caprinos: estudos *in vitro* e *in vivo*. 115 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

O uso indiscriminado de anti-helmínticos químicos sem o devido conhecimento do manejo a ser adotado bem como as características do produto e do animal a ser tratado podem ocasionar a resistência parasitária, a qual pode ser diminuída quando se faz a adoção de métodos de controle alternativos, utilizando produtos de origem natural. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a potencialidade da utilização da própolis verde sobre ovos e larvas de helmintos gastrointestinais de ovinos (*in vitro*) e sua eficácia anti-helmíntica em caprinos (*in vivo*). Primeiramente, o percentual de ácidos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante da própolis verde utilizada foram determinados a fim de estabelecer quais os principais compostos químicos presentes e suas respectivas quantidades. Os efeitos do fitoterápico sobre ovos e larvas de helmintos gastrointestinais de ovinos avaliados por meio de testes que predisseram percentuais de eclodibilidade de ovos e inibição da migração larval dos helmintos. Em uma segunda etapa, os efeitos do extrato de própolis verde foram observados diretamente sobre os animais. Cabras Boer foram divididas em três grupos experimentais, sendo: T1 – tratamento com glicerina (animais recebendo glicerina bidestilada líquida), T2 – extrato de própolis verde (0,3g/kg PV) e T3 – anti-helmíntico químico – monepantel. Ambos grupos experimentais receberam os produtos teste no dia sete do período experimental, coletas de material fecal para análises de ovos por grama de fezes (OPG) e coprocultura foram realizadas até o dia 60. A coloração da mucosa ocular foi determinada em todos os dias de coleta, pelo método Famacha. Foram colhidas amostras de sangue para realização de hemograma e perfil bioquímico sérico. O teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) foi realizado com o objetivo de predizer o grau de redução na contaminação por helmintos para os diferentes produtos. A própolis utilizada apresentou uma vasta composição química, compostos como taninos e diferentes fenólicos garantiram a atividade anti-helmíntica da mesma. Elevada atividade antioxidante foi observada pela técnica de capacidade antioxidante de redução férrica. Não foi observada eclodibilidade de ovos quando utilizada a concentração de 99,99 mg mL<sup>-1</sup> do fitoterápico, a mesma concentração inibiu mais de 97% da migração de larvas. Os valores de OPG e Famacha foram melhores para o monepantel quando comparado à própolis verde. O anti-helmíntico químico apresentou 64% de redução da contaminação no TRCOF. Conforme os resultados de hemograma, a própolis teve efeito positivo sobre o sistema imune dos animais, diminuindo a possível ocorrência de processos inflamatórios ou ainda sua intensidade. As infecções de ambos tratamentos apresentaram maiores proporções de *H. contortus* em relação às demais espécies de helmintos. A própolis foi eficiente no controle de nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes, ao passo que controlou ovos e larvas de helmintos.

**Palavras-chave:** Fitoterapia. *Haemonchus contortus*. Resistência anti-helmíntica.

## ABSTRACT

BAUNGRATZ, Andressa Radtke. Green propolis extract in the control of gastrointestinal helminths of sheep and goats: in vitro and in vivo studies. 115 s. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Federal University of Technology - Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

The indiscriminate use of chemical anthelmintics without proper knowledge of the management to be adopted as well as the characteristics of the product and animal to be treated can cause parasitic resistance, which can be reduced when adopting alternative control methods, using products of natural origin. This work aimed to evaluate the potentiality of the use of green propolis on eggs and larvae of gastrointestinal helminths of sheep (in vitro) and their anthelmintic efficacy in goats (in vivo). First, the percentage of phenolic acids, flavonoids and the antioxidant activity of green propolis used were determined in order to establish the main chemical compounds present and their respective amounts. The effects of the herbal remedy on eggs and larvae of the gastrointestinal helminths of sheep evaluated by means of tests predicted percentages of egg hatchability and inhibition of larval migration of helminths. In a second step, the effects of the green propolis extract were observed directly on animals. Boer goats were divided into three experimental groups: T1 – glycerin treatment (animals receiving liquid double - distilled glycerin), T2 - green propolis extract (0,3g / kg PV) and T3 - anthelmintic chemical - monepantel. Both experimental groups received the test products on the seventh day of the experimental period, fecal material samples for analysis of eggs per gram of feces (EPG) and coproculture were carried out until the 60th. The ocular mucosa coloration was determined on all days of collection by the Famacha method. Blood samples were collected for hemogram and serum biochemical profile. The FEC reduction test (FECRT) was performed with the objective of predicting the degree of reduction in helminth contamination for the different products. The propolis used presented a great chemical composition, compounds such as tannins and different phenolics guaranteed the anthelmintic activity of the same. High antioxidant activity was observed by the technique of antioxidant capacity of iron reduction. No egg hatchability was observed when the concentration of 99.99 mg mL<sup>-1</sup> of the herbal product was used, the same concentration inhibited more than 97% of the larvae migration. The values of EPG and Famacha were better for monepantel when compared to green propolis. The chemical anthelmintic showed a 64% reduction in FECRT contamination. According to the hemogram results, propolis had a positive effect on the immune system of the animals, reducing the possible occurrence of inflammatory processes or even their intensity. Infections of both treatments presented higher proportions of *H. contortus* in relation to other species of helminths. Propolis was efficient in controlling gastrointestinal nematodes of small ruminants, while controlling eggs and larvae of helminths.

**Keywords:** Phytotherapy. *Haemonchus contortus*. Anti-helminth resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - A: Exemplar de *Baccharis dracunculifolia*, popular vassourinha. Fonte: BAGATINI, 2005. B: Amostra de própolis verde in natura. C: Amostra de própolis verde após processo de liofilização. Fonte: Arquivo pessoal (2018). ..... 29

**Figura 2** - Perfil cromatográfico da própolis verde determinado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Picos identificados conforme padrões fornecidos: A: ácido cafeico; B - ácido cumárico; C - ácido ferúlico; D - canferol; E - pinocembrina; F – crisina; G – galangina. Fonte: OLDONI, 2018. .... 31

**Figura 3** - Procedimentos para realização do teste de eclodibilidade de ovos (TEO). A: Amostra do pool de fezes sendo filtradas em peneiras de diferentes aberturas ( $\mu\text{m}$ ). B: Recuperação dos ovos de helmintos retidos na peneira de menor abertura (25  $\mu\text{m}$ ). C: Ovos de helmintos sendo contabilizados para posterior inclusão nas placas. D: Ovos e larvas (L1) observadas posterior período de incubação do material. Fonte: Arquivo pessoal (2018). .... 36

**Figura 4** - Aparatos utilizados para o TIML, confeccionados a partir de seringas descartáveis com volume de 5 e 3 mL, anéis de borracha para castração (ovinos, caprinos e bezerras) e malha de nylon com abertura de 25  $\mu\text{m}$ . Fonte: Arquivo pessoal (2018). .... 38

**Figura 5** - A: Larvas (L3) incubadas com o extrato de própolis verde em diferentes concentrações. B: Placas incubadas em B.O.D. expostas a uma fonte de luz. C: Larvas (L3) observadas após a migração – controle. D: Larvas (L3) observadas após a migração – extrato de própolis verde. Fonte: Arquivo pessoal (2018). .... 38

**Figura 6** - Médias de eclodibilidade (TEO) para ovos sob efeito do extrato de própolis em diferentes concentrações e controles negativos (H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O+DMSO, DMSO). Nota: Barras de erro indicam o desvio padrão da média (DP) não sendo vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas é 0 (zero) ou muito próximo deste. .... 41

**Figura 7** - Curva dose-resposta obtida através do teste de eclodibilidade de ovos (TEO) para diferentes doses de extrato de própolis verde em log (x). Nota: Barras de erro indicam o erro padrão da média (EPM) não sendo vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas é 0 (zero) ou muito próximo deste. .... 44

**Figura 8** - Curva dose-resposta obtida através do teste de inibição da migração larval (TIML) para diferentes doses de extrato de própolis verde em log (x). Nota: Barras de erro indicam o erro padrão da média (EPM) não sendo vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas é 0 (zero) ou muito próximo deste. .... 46

**Figura 9** - Dados meteorológicos determinados durante o período experimental in vivo de julho a setembro de 2018. Fonte: SIMEPAR, 2018. .... 55

**Figura 10** - Comportamento das médias de ovos por grama de fezes (OPG) dos tratamentos avaliados durante as coletas experimentais. Nota: no dia considerado D1, os grupos experimentais apresentaram OPG média de 687,88..... 64

**Figura 11** - População de larvas (L3) de cada um dos grupos avaliados, nos diferentes dias experimentais (01, 07, 14, 30 e 60). A – Tratamento com glicerina; B – Tratamento extrato de própolis verde (0,3g/kg PV); C – Tratamento anti-helmíntico químico – monepantel (0,1 mL/kg PV). Nota: As coproculturas foram realizadas com amostras do grupo avaliado, sendo uma amostra por grupo..... 67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Caracterização química da própolis verde e respectivos conteúdos fenólico e flavonoide totais.....	30
<b>Tabela 2</b> - Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de diferentes amostras de própolis.....	34
<b>Tabela 3</b> - Eclodibilidade de ovos (TEO) de nematódeos gastrintestinais sob efeito do extrato de própolis verde e valores de DL <sub>50</sub> de ambos os produtos avaliados.....	41
<b>Tabela 4</b> - Inibição de migração de larvas (TIML) de nematódeos gastrintestinais sob efeito do extrato de própolis verde e valores de DL <sub>50</sub> de ambos os produtos avaliados.....	45
<b>Tabela 5</b> - Composição química e digestibilidade in vivo dos ingredientes da dieta fornecida aos animais durante o período experimental.....	57
<b>Tabela 6</b> - Relação do grau Famacha com a coloração da conjuntiva ocular e o valor de hematócrito.....	58
<b>Tabela 7</b> - Valores de referência para eritrograma e leucograma de caprinos, segundo diferentes autores.....	60
<b>Tabela 8</b> - Valores de referência para parâmetros bioquímicos de caprinos, conforme literatura.....	61
<b>Tabela 9</b> - Pesos iniciais e finais (kg) médios seguidos por valores de mediana, mínimo e máximo dos tratamentos avaliados durante todo o período experimental. ....	62
<b>Tabela 10</b> - Escores de condição corporal (ECC) médios seguidos por valores de mediana, mínimo e máximo dos tratamentos avaliados durante todo o período experimental.....	62
<b>Tabela 11</b> - Média valores de Famacha $\pm$ erro padrão da média (EPM) nos diferentes grupos avaliados. ....	62
<b>Tabela 12</b> - Média ovos por grama de fezes (OPG) $\pm$ erro padrão da média (EPM) nos diferentes grupos avaliados e dias de coleta.....	63
<b>Tabela 13</b> - Percentual de redução de OPG (R%) de ambos produtos avaliados e intervalo de confiança (IC) após tratamento anti-helmíntico.....	65
<b>Tabela 14</b> - Percentual do número total de larvas de helmintos identificados nas coproculturas de ambos os produtos avaliados após tratamento anti-helmíntico, por gênero de helminto.	66

**Tabela 15** - Média valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), proteína plasmática total (PPT), leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos, relação neutrófilos/linfócitos, proteínas totais, albumina, globulina, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT)  $\pm$  erro padrão da média (EPM) nos diferentes grupos avaliados. .... 71

**Tabela 16** - Média valores de monócitos, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), ureia, glicose, fibrinogênio e aspartato aminotransferase (AST)  $\pm$  erro padrão da média (EPM) nos diferentes dias de coleta. .... 72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis
ADDs	derivados de amino-acetonitrilo
ANOVA	análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AST	aspartato aminotransferase
B.O.D.	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cfa	clima subtropical úmido
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência
Cn	controle
D0	dia zero
D14	dia quatorze
D30	dia trinta
D60	dia sessenta
D7	dia sete
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ECC	escore de condição corporal
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EEP	extrato etanólico de própolis
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPM	erro padrão da média
ETS	<i>electron transport system</i>
FA	fosfatase alcalina
FDA	fibra detergente ácido
FDN	fibra detergente neutro
FRAP	<i>ferric reducing antioxidant power</i>
GGT	gamaglutamiltransferase

IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
IC	intervalo de confiança
L1	larvas de primeiro estágio
L3	larvas infectantes de terceiro estágio
mbar	milibares
MM	matéria mineral
MO	matéria orgânica
MS	matéria seca
NRC	<i>National Research Council</i>
OPG	ovos por grama de fezes
PB	proteína bruta
pH	potencial Hidrogeniônico
PPT	proteína plasmática total
PR	Paraná
RDW	<i>red cell distribution width</i>
RN	Rio Grande do Norte
rpm	rotações por minuto
SIMEPAR	Sistema Meteorológico do Paraná
SNK	teste de comparação de médias Student-Newman-Keuls
SRD	sem raça definida
SRL	sem referência na literatura
T1	tratamento 1
T2	tratamento 2
T3	tratamento 3
TEO	teste de eclodibilidade de ovos
TIML	teste de inibição da migração larval
Trat	tratamento
TRCOF	teste de redução de contagem de ovos nas fezes
UR	umidade relativa
VCM	volume corpuscular médio
WAAVP	Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária



## LISTA DE SÍMBOLOS

%GL	grau Gay Lussac
$\mu^3$	micro ao cubo
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrometro
$\mu\text{mol}$	micromol
$\frac{1}{2}$	um meio
$\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$	dimetilsulfóxido
$\text{CH}_3\text{OH}$	metanol
$\text{DL}_{50}$	<i>lethal dose</i>
EAG	equivalentes em ácido gálico
EQ	equivalente de quercetina
$\text{Fe}^{2+}$	ferro ferroso
$\text{Fe}^{3+}$	ferro férrico
fL	fentolitro
g/dL	grama por decilitro
$\text{H}_2\text{O}$	água
$\text{H}_3\text{PO}_4$	ácido fosfórico
Kg	quilograma
$\log(x)$	logaritmo de um número qualquer
m/m	concentração massa por massa
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetros
mmol	milimol
N:L	relação neutrófilo:linfócito
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	carbonato de sódio
$\text{NaClO}$	hipoclorito de sódio
nm	nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
P.A.	para análise

PV	peso vivo
TPTZ	solução do complexo férrico 2,4,6-tripiridiltriazina
R%	percentual de redução
v/v	concentração volume por volume
W	watts
$\times 10^6$	1000.000 (mega)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
2.1 Própolis verde .....	21
2.2 Atividade biológica da própolis verde .....	22
2.3 Atividade anti-helmíntica da própolis verde .....	22
<b>3 EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE OVOS E LARVAS DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE OVINOS</b> .....	25
RESUMO .....	25
ABSTRACT .....	26
3.1 INTRODUÇÃO .....	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.2.1 Própolis verde .....	29
3.2.1.1 Produção do extrato de própolis verde .....	29
3.2.3 Caracterização química da própolis verde .....	30
3.2.3.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) .....	30
3.2.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais .....	31
3.2.3.3 Determinação da Atividade antioxidante .....	32
3.2.3.3.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS .....	32
3.2.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical DPPH .....	32
3.2.3.3.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) .....	33
3.2.4 Avaliação anti-helmíntica <i>in vitro</i> .....	35
3.2.4.1 Atividade ovicida .....	35
3.2.4.2 Atividade larvicida .....	37
3.2.5 Análise estatística .....	39
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.3.1 Caracterização química da própolis verde .....	39
3.3.2 Avaliações anti-helmínticas sobre ovos e larvas .....	40
3.4 CONCLUSÕES .....	50
<b>4 PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE CAPRINOS</b> .....	51
RESUMO .....	51
ABSTRACT .....	52
4.1 INTRODUÇÃO .....	53
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	55
4.2.1 Animais .....	55
4.2.2 Própolis verde liofilizada .....	57
4.2.3 Avaliação da conjuntiva ocular – método Famacha® .....	57

4.2.4 Exames parasitológicos e coproculturas.....	58
4.2.5 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) .....	58
4.2.6 Hemograma e perfil bioquímico .....	59
4.2.7 Análise estatística.....	61
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
4.3.1 Avaliações de contaminação e resistência anti-helmíntica .....	62
4.3.2 Contaminação por helmintos e sua relação com padrões hematológicos .....	70
4.4 CONCLUSÕES.....	84
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>112</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Considerada como o principal problema sanitário na ovinocultura e caprinocultura brasileira, as infecções por helmintos gastrointestinais acometem inúmeros animais, ocasionando diferentes entraves na atividade de produção (LÔBO et al., 2009). Diminuição no ganho de peso, redução da fertilidade das fêmeas, aumento da mortalidade e gastos elevados com medicamentos são exemplos das perdas econômicas ocasionadas (SUTHERLAND; SCOTT, 2010).

Ovinos e caprinos são acometidos pelos mesmos gêneros de parasitas, sendo os mais comuns e de elevado potencial de patogenicidade *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus* sp. e *Strongyloides papillosus* (KAPLAN, 2013). Além de altas taxas de disseminação enquanto população, estas classes de helmintos apresentam mecanismos de resistência anti-helmíntica muito bem desenvolvidos, garantida por meio de alelos com resistência simultânea a drogas com diferentes modos de ação (ROMERO et al., 2007; ROMERO et al., 2013; ANZIANI; MUCHIUT, 2014; ANZIANI; FIEL, 2015).

Realizado com a utilização de anti-helmínticos sintéticos, o controle da helmintose gastrointestinal em pequenos ruminantes apresenta inúmeros problemas, seja ocasionado pelos mecanismos de resistência dos helmintos ou ainda pela administração dos produtos de forma errônea, com superdosagens e sem o conhecimento das dinâmicas biológica e epidemiológica da infecção. Ademais, problemas com ocorrências de resíduos em alimentos e principalmente no meio-ambiente fazem da busca por novos métodos de controle da verminose uma necessidade (ATHANASIADOU et al., 2008).

Dentre as alternativas investigadas para utilização no controle de parasitos gastrointestinais, o uso de plantas bioativas é bem-conceituado (OLIVEIRA et al., 2011). Os compostos responsáveis pelas atividades biológicas das plantas são conhecidos por metabólitos secundários, sendo identificados em algumas espécies vegetais e ainda desconhecidos em outras (ATHANASIADOU et al., 2008).

Dentre os metabólitos secundários com atividade anti-helmíntica, destacam-se os grupos químicos saponinas, alcaloides, proteínas, taninos, lignina, alguns polifenóis e glicosídeos (GITHIORI, et al., 2006, HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011, RÍOS-DE-ÁLVAREZ, et al., 2012). Alguns compostos fenólicos, como os flavonoides,

e ácidos gálico, elágico e cafeico também possuem tal potencial (MONDAL, et al., 2015).

Fitoterápico muito utilizado na medicina humana (TORETI et al., 2013; SILVA-CARVALHO et al., 2015), a própolis vem sendo empregada na nutrição e sanidade animal. Produzida pelas abelhas, é uma mistura composta por ácidos e ésteres aromáticos, aldeídos, cetonas, álcoois, aminoácidos, terpenóides, flavonoides, entre outros (MENEZES, 2005). Suas propriedades estão relacionadas à composição química, que pode variar conforme características geográficas do local onde é produzida, a flora utilizada pelas abelhas, diferentes épocas do ano, espécie da abelha, dentre outros fatores (PEREIRA et al., 2002).

A própolis pode apresentar distintos grupos químicos, os quais garantem uma vasta eficácia ao produto final (MARCUCCI, 1995; HUANG et al., 2014). Sua coloração pode variar desde amarelo, tons de castanho, marrom/escuro, verde e até vermelha (TORETI et al., 2013). Conhecida como “própolis do Brasil”, a própolis verde é produzida em apenas alguns estados do Brasil - Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Sua coloração verde é devido à espécie botânica utilizada para sua produção, *Baccharis dracunculifolia*, popularmente chamada de alecrim-do-campo, que lhe garante uma composição química rica em Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) e drupanina (ácido 3-prenil p-cumárico), derivados do ácido p-cumárico, ácidos clorogênico e benzóico, e compostos flavonoides (SALATINO et al., 2005, SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

Os estudos com extratos de plantas concentram-se em identificar as propriedades anti-helmínticas e testar a toxicidade dos compostos *in vitro*, identificar mecanismos de ação, avaliar eficiência do composto *in vivo* e por fim avaliar a viabilidade em propriedades rurais (GITHIORI, et al., 2006; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011).

Sendo assim, embasado na hipótese de que a própolis verde apresenta efeito positivo sobre o controle de helmintos gastrointestinais, diminuindo ou ainda controlando os níveis de infecção sem efeitos adversos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a potencialidade da utilização da própolis verde sobre ovos e larvas de helmintos gastrointestinais de ovinos (*in vitro*) e sua eficiência helmíntica (*in vivo*).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Própolis verde

Produzida pelas abelhas, a própolis surge a partir de uma mistura de material resinoso, gomoso ou balsâmico de botões de flores, sépalas/pétalas, folhas, caules e cascas de árvores. Quando na colmeia, as abelhas passam a utilizar tal material misturando-o a secreções e enzimas (GUISALBERTI, 1979; GONZÁLES; ORZAES, 1997).

A própolis pode apresentar elevada variação na sua composição de acordo com as características geográficas e climáticas do local onde é coletada. A flora predominante utilizada para produção da própolis pelas abelhas também interfere diretamente no produto final, lhe atribuindo assim, variações significativas em diferentes amostras analisadas (BANKOVA, 2005). Além disso, a época sazonal da colheita também pode ocasionar alterações nos teores de compostos bioativos do produto (TOUZANI et al., 2018).

De forma geral, contém mais de duzentos compostos químicos já identificados. Flavonoides e ácidos fenólicos são os de maior atividade biológica, sendo assim, mais estudados. Os compostos flavonoides englobam substâncias como galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina. Os ácidos fenólicos compreendem os ácidos cafeico, ferúlico, cinâmico e cumárico. Além destes, aldeídos aromáticos, cumarinas, ácidos orgânicos, ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, álcoois, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e diidrochalconas, terpenoides e proteínas (TORETI et al., 2013).

Outro composto fenólico encontrado exclusivamente na própolis verde e com várias propriedades biológicas é o artepillin C (CARRÃO, 2015). O artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) também conhecido por artepilina, é um constituinte encontrado somente em amostras de própolis verde, devido a composição botânica utilizada para sua produção. Este, é um dos constituintes majoritários do produto (PIANTINO, 2004; DE AGUIAR, 2012; SALGUEIRO, 2016; VEIGA et al., 2017).

A fim de ser comercializada nacional e internacionalmente, deve atender alguns padrões pré-estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), um exemplo destes é apresentar um teor de fenólicos totais de no mínimo 5% (m/m) (BRASIL, 2001).

## 2.2 Atividade biológica da própolis verde

Os antioxidantes apresentam como principal função a capacidade em inibir biomoléculas (proteínas, lipídios e açúcares) de ocasionar danos oxidativos por meio de radicais livres, impedindo assim doenças de caráter coronário, câncer, envelhecimento celular e demais (RICE-EVANS; BURDON, 1994; VISIOLI, BELLOMO; GALLI, 1998; LEOPOLDINI et al., 2004). A própolis possui tal atividade devido aos compostos fenólicos, que atuam inibindo reações ocasionados pelos radicais livres (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Estudos indicam que a atividade antioxidante da própolis é superior à de vitaminas E e C (RICE-EVANS et al., 1996; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009).

Dentre os métodos utilizados para a determinação da capacidade antioxidante a maioria é realizada *in vitro*. Captura de radicais ABTS e DPPH e poder redutor do ferro (FRAP) são os mais empregados para determinar a atividade antioxidante em matrizes de diferentes naturezas (KUMAR, 2015).

Os métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS utilizam o princípio de descoloração da amostra após o procedimento para avaliação e quantificação do seu poder antioxidante, enquanto que o método de poder redutor do ferro (FRAP) avalia o potencial do produto pela redução do ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) para ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) (KUMAR, 2015).

As variáveis que indicam atividade antioxidante, representados por ABTS, DPPH e FRAP também são comumente avaliadas em amostras de própolis, e apresentam diferenças conforme as características de onde o material foi produzido e coletado.

Estudos sugerem que a estação do ano e período de produção e colheita da própolis alteram de forma quali e quantitativa as fitomoléculas presentes no produto. Excelente fitoterápico, pesquisas que envolvam a caracterização química do mesmo e suas reais propriedades devem ser realizadas, a fim de incrementar a exploração do produto (FIGUEIREDO et al., 2015).

## 2.3 Atividade anti-helmíntica da própolis verde

Pesquisas utilizando própolis no controle de helmintos gastrointestinais vem demonstrando resultados positivos, seja em estudos envolvendo animais (PRINCIPAL et al., 2002; CASTAGNARA et al., 2007; LOUREIRO, 2007; KRYCHAK-FURTADO, 2011; HEINZEN et al., 2012; MORSY et al., 2013; MORSY et al., 2016) ou ainda diretamente sobre ovos e larvas de helmintos gastrointestinais (BATISTA, 2016).



Os principais testes utilizados para determinação da ação de qualquer produto sobre ovos e larvas, *in vitro*, são os testes de eclodibilidade de ovos (TEO) e inibição da migração larval (TIML). A partir dos resultados apresentados, é possível prever percentuais de eclodibilidade de ovos e inibição da capacidade das larvas em migrarem, além de calcular valores de  $DL_{50}$ , indicando qual a concentração necessária de determinado produto para que ocorra a mortalidade de pelo menos 50% da população em estudo. Sendo assim, quanto maior for o percentual de inibição encontrado, mais potente foi o produto avaliado (POWERS et al., 1982; COLES et al., 2006).

Compostos químicos como fenólicos e flavonoides e suas variações – como os taninos, são encontrados em própolis de ambas origens e colorações (TORETI et al., 2013), garantindo diferentes propriedades farmacológicas à mesma, a exemplo da atividade anti-helmíntica.

O ácido elágico atua na captura de elétrons de diferentes sistemas biológicos, inclusive no transporte de elétrons (ETS). Os elagitaninos (classe de taninos hidrolisáveis) atuam diretamente sobre helmintos pela inibição da fosforilação oxidativa, quando ocorre rompimento no fluxo de elétrons (VATTEM; SHETTY, 2005; MONDAL et al., 2015).

Os taninos são compostos fenólicos considerados metabólitos secundários (MONTEIRO et al., 2005) que atuam sobre os ovos e larvas por meio da fosforilação oxidativa, tendo capacidade de interagir com proteínas constituintes dos ovos e larvas, que são vitais para o desenvolvimento e função biológica dos helmintos (ATHANASIADOU et al., 2001; MOLAN; FARAJ, 2010; MOLAN, 2014).

Os taninos hidrolisáveis podem apresentar atividade anti-helmíntica por meio da precipitação de proteínas, interagindo com ovos e larvas por meio de interações não-covalentes ou covalentes. Elevada atividade oxidativa também confere mecanismos de controle de helmintos aos taninos, quando os produtos resultantes dessa oxidação se ligam por meio de ligações covalentes. Mecanismo de hidrólise, quando ovos e larvas interagem com os produtos resultantes da hidrólise também apresentam capacidade de controlar ovos e larvas (KATIKI et al., 2013; ENGSTRÖM et al., 2016).

Conforme Engström et al. (2016) os taninos hidrolisáveis ligam-se à superfície da casca do ovo dos helmintos impedindo que proteínas responsáveis pela incubação e revestimento do mesmo atuem. Além disso, funções vitais como troca de oxigênio

entre interior e exterior do ovo também são dificultadas, uma vez que o tanino passa a revestir a casca do ovo e impede estes mecanismos.

Sobre as larvas, os taninos interrompem o processo de extravasamento, inibindo o estabelecimento de larvas infectantes no hospedeiro e assim, a infecção (BRUNET et al., 2007; ALONSO-DÍAZ et al., 2008). Possuem capacidade de deformar a superfície do corpo dos helmintos, ocasionando principalmente degenerações de células musculares (HOSTE et al., 2006; WILLIAMS et al., 2014; BRUNET et al., 2011). Pesquisas sugerem que caso as lesões sejam oriundas dos taninos, estes podem ter produzido toxicidade celular no momento em que bloquearam a troca metabólica com o meio ambiente (BATISTA, 2016).

### 3 EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE OVOS E LARVAS DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE OVINOS

#### RESUMO

A utilização maciça de anti-helmínticos químicos é responsável pela geração de mecanismos de resistência de helmintos gastrointestinais de pequenos ruminantes, sendo necessário o desenvolvimento de novos produtos para o controle dos nematódeos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi a avaliação do extrato de própolis verde (*in vitro*) sobre ovos e larvas de helmintos gastrointestinais de ovinos. A viabilidade da utilização dos produtos foi avaliada por meio de percentuais de eclodibilidade de ovos e inibição da migração larval dos helmintos. A própolis utilizada para a produção do extrato apresentou composição rica em flavonoides, como pinocembrina, crisina, canferol e galangina e fenólicos, principalmente ácidos cafeico e cumárico. Sua capacidade antioxidante foi confirmada pela técnica de avaliação da capacidade antioxidante de redução férrica. Não foi observada eclodibilidade do número total de ovos incubados utilizando concentração de 99,99 mg mL<sup>-1</sup>. A DL<sub>50</sub> do teste de inibição da migração larval foi de 7,309 mg mL<sup>-1</sup>. Dessa forma, conclui-se que a própolis verde apresentou efeito positivo sobre o controle de larvas e ovos de helmintos gastrointestinais de ovinos, garantida pelos taninos e flavonoides, no entanto, os valores encontrados para as DL<sub>50</sub> de ambos testes ainda são elevados quando comparadas a de produtos químicos já consolidados.

**Palavras chave:** Fitoterápico. Resistência anti-helmíntica. Verminose.

## ABSTRACT

The massive use of chemical anthelmintics is responsible for the resistance mechanisms of gastrointestinal helminths of small ruminants, and the development of new products for the control of nematodes is necessary. In this context, the objective of the present work was the evaluation of the green propolis extract (in vitro) on eggs and larvae of gastrointestinal helminths of sheep. The viability of the use of the products was evaluated by percentage of egg hatchability and inhibition of larval migration of helminths. The propolis used to produce the extract had a composition rich in flavonoids, such as pinocembrin, chrysin, kaempferol, and galangin and phenolics, mainly caffeic and coumaric acids. Its antioxidant capacity was confirmed by the technique of evaluation of the antioxidant capacity of iron reduction. No hatchability was observed for the total number of eggs incubated using a concentration of 99.99 mg mL<sup>-1</sup>. The LD<sub>50</sub> of the larval migration inhibition test was 7.309 mg mL<sup>-1</sup>. Thus, it is concluded that green propolis had a positive effect on the control of larvae and eggs of sheep gastrointestinal helminths, guaranteed by tannins and flavonoids, however, the values found for the LD<sub>50</sub> of both tests are still high when compared to chemicals already well-established.

**Keywords:** Phytotherapeutic. Anthelmintic resistance. Nematode parasites.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de anti-helmínticos químicos, principalmente pela não adoção do tempo de carência para novas aplicações do produto ocasionam a formação de cepas resistentes de helmintos (FONSECA et al., 2014). Além disso, a falta de conhecimento sobre a biologia dos helmintos e o real grau de parasitismo dos animais são notórios e interferem na adoção de métodos eficazes para o controle.

A resistência parasitária pode ser definida como o aumento significativo na habilidade de determinada população de parasitos sobreviverem a diferentes doses de um componente químico, que até então era eficiente na eliminação da maior parte do número de indivíduos de uma população susceptível (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008).

Visando determinar o grau de resistência pelos parasitos a diferentes produtos, testes *in vitro* vêm sendo desenvolvidos com frequência. Mais rápidos, econômicos e menos trabalhosos se comparados àqueles que necessitam do acompanhamento dos animais para sua realização (DEMELENER et al., 2012), apresentam demais vantagens como a capacidade de anularem possíveis efeitos ocasionados pela interferência do hospedeiro no estabelecimento da infecção, especialmente se tratando de ovinos, e pela variação na farmacodinâmica das drogas no organismo animal (CHAGAS et al., 2011).

Baseiam-se na incubação de diferentes estágios de vida livre de parasitos em uma série de concentrações de anti-helmínticos e/ou extratos de plantas, observando os efeitos ocasionados sobre os organismos (FORTES; MOLENTO., 2013).

O teste de eclodibilidade de ovos (TEO) surgiu como alternativa para identificação de populações resistentes aos benzimidazóis, é recomendado pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WAAVP) e pode ser adaptado para a avaliação de demais produtos e princípios ativos (COLES et al., 1992; TAYLOR et al., 2002). Seu objetivo é avaliar a capacidade dos produtos em inibir a eclosão dos ovos de helmintos, por meio da interrupção do desenvolvimento blastular do embrião e de enzimas associadas ao processo de eclosão (NERY et al., 2009).

Os efeitos ocasionados sobre larvas de helmintos podem ser determinados pelo teste de inibição da migração larval (TIML) (D'ASSONVILLE et al., 1996). Com o objetivo de avaliar a resistência a grupos químicos que possuam como sítio de atuação a musculatura somática dos parasitos, atuando sobre vias estimuladoras e

inibitórias, o TIML avalia a capacidade migratória de larvas de terceiro estágio (L3) após o período de incubação com determinado tratamento (BORGES, 2014).

O desenvolvimento de novos produtos de caráter anti-helmíntico pela indústria farmacêutica vem sendo considerado um processo de elevados custos e relativamente lento (CHAGAS et al., 2008). A alternativa da utilização de compostos considerados naturais para tal objetivo é cada vez mais forte e incentivada pela pesquisa científica, servindo como ferramenta de controle ou até mesmo prolongando a vida útil dos químicos já utilizados (SILVA, 2007).

Diferentes compostos químicos, considerados como metabólitos secundários de plantas são conhecidos por suas propriedades anti-helmínticas, a exemplo de saponinas, alcaloides, proteínas, taninos, lignina, alguns polifenóis e glicosídeos (GITHIORI et al., 2006, HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011, RÍOS-DE-ÁLVAREZ et al., 2012).

A própolis, devido a sua ampla composição química é considerada um produto com elevado potencial de utilização. Estudos indicam que sua atividade biológica esteja relacionada principalmente a presença de compostos como os ácidos fenólicos (ABREU et al., 2006; CUNHA et al., 2009; DUTRA et al., 2011; CUNHA, 2013, BATISTA et al., 2016) taninos (DUTRA et al., 2014), flavonoides (SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2013), cumarinas e benzofenonas (DA CUNHA et al., 2016) e terpenos de diferentes classes (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, ácidos graxos, esteroides e saponinas) (BANKOVA; POPOVA, 2007; DUTRA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi a determinação da composição química da própolis verde e o efeito do extrato (*in vitro*) da mesma sobre ovos e larvas de helmintos gastrointestinais de ovinos.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Própolis verde

As amostras de própolis verde utilizadas são classificadas como tipo convencional para exportação, oriundas da polinização de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) (Asteraceae) no município de Nepomucemo, Minas Gerais-Brasil, dos meses de novembro de 2016 a maio de 2017. As amostras foram limpas, maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido e mantidas sob refrigeração a -5°C sem interferência de luminosidade até sua utilização (Figura 1).



**Figura 1** - A: Exemplar de *Baccharis dracunculifolia*, popular vassourinha. Fonte: BAGATINI, 2005. B: Amostra de própolis verde *in natura*. C: Amostra de própolis verde após processo de liofilização. Fonte: Arquivo pessoal (2018).

#### 3.2.1.1 Produção do extrato de própolis verde

Os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram produzidos segundo metodologia descrita por Oldoni et al. (2015). Foram pesadas 32 gramas de própolis macerada e adicionados 400 mL da mistura extratora etanol: água (80:20 v/v) e então extraídos sob aquecimento em banho termostatizado a 70°C por 45 minutos e o material homogeneizado a cada 10 minutos. Com o objetivo de garantir um bom rendimento da extração, o procedimento foi repetido utilizando 200 mL de etanol: água (80:20 v/v).

Após a extração, o material foi filtrado com auxílio de bomba vácuo e papel filtro qualitativo, sendo obtido o extrato etanólico de própolis (EEP). Este, foi rotoevaporado a uma temperatura de 60°C por 25 minutos (100 rpm, 175 mbar). O material obtido após a rotoevaporação foi acondicionado em recipientes plásticos e mantido em freezer (-5°C) por um período de 48 horas, para posterior liofilização. No liofilizador, o material foi mantido a uma temperatura de -50°C e período igual ao anterior.

### 3.2.3 Caracterização química da própolis verde

#### 3.2.3.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides nas amostras de própolis foi realizada utilizando um Cromatógrafo a Líquido (VARIAN – 900 LC) acoplado a um detector de arranjo de fotiodo e uma coluna de fase reversa MICROSORB-MV C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). Os padrões utilizados foram: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido trans cinâmico, rutina, quercetina, pinocembrina, crisina, canferol, mangiferina e galangina. As condições do equipamento foram: fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 30°C, composição da fase móvel: (A) H<sub>2</sub>O: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99,8:0,2 v v<sup>-1</sup>); (B) CH<sub>3</sub>OH (100%) com gradiente iniciando com 30% de B, em 15 min 64% de B, 11 min 75% de B, 2 min 95% de B, 1 min 95% de B, 3 min 30% de B e finalmente 10 min em 30% de B, totalizando 42 min de análise. A quantificação foi realizada por padronização externa em uma faixa de concentração que variou de 0,5 µg mL<sup>-1</sup> a 60 µg mL<sup>-1</sup>.

A partir da análise realizada por CLAE-DAD foi possível determinar os compostos químicos presentes na própolis utilizada, com auxílio de padrões. Os mesmos apresentam-se descritos na tabela 1, classificados como ácidos fenólicos e flavonoides. A fim de garantir maior confiabilidade à análise, todas avaliações foram realizadas com seis repetições.

**Tabela 1** - Caracterização química da própolis verde e respectivos conteúdos fenólico e flavonoide totais.

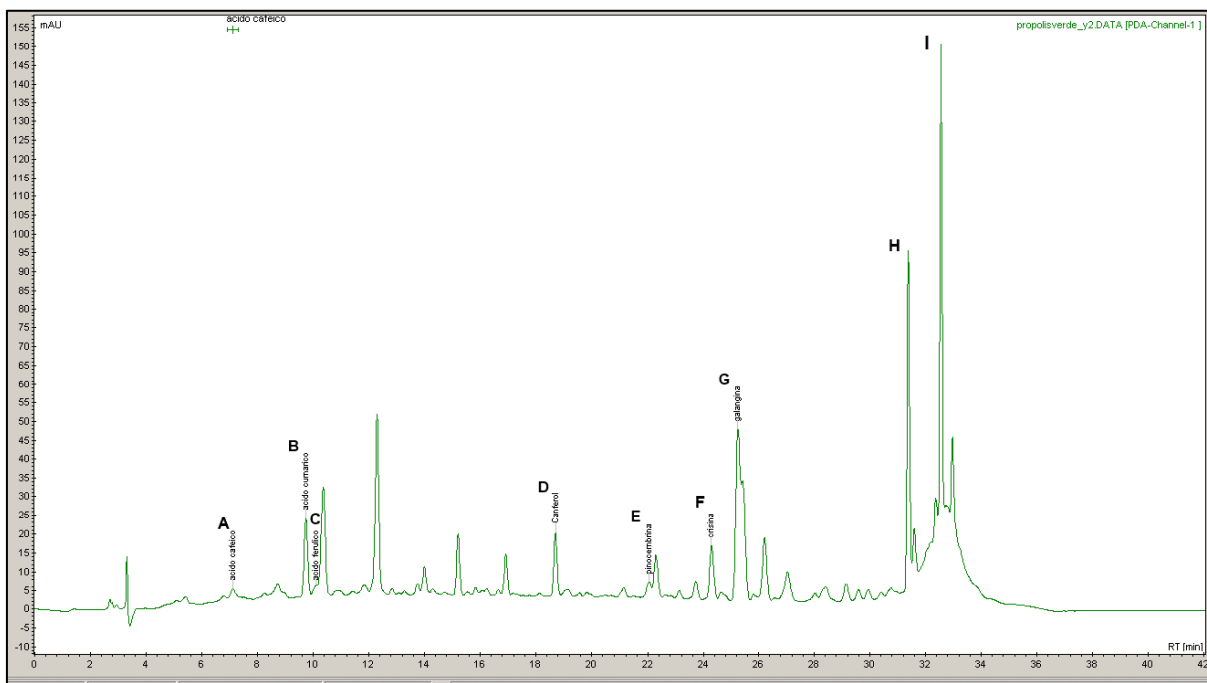
Padrão	Valores (mg g <sup>-1</sup> )
<i>Ácidos Fenólicos</i>	
ácido cafeico	1,38 ± 0,30
ácido cumárico	9,05 ± 1,84
<i>Flavonoides</i>	
pinocembrina	2,37 ± 0,26
crisina	9,06 ± 0,76
canferol	5,37 ± 0,86
galangina	10,01 ± 0,26

Notas: Todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão.

Devido a necessidade de inúmeros padrões químicos para a identificação de ambos os compostos citados e seu elevado custo, apenas uma porção destes pode



ser quimicamente identificada. Ainda assim, a construção de perfis cromatográficos por CLAE torna possível a exploração do material analisado por meio da construção de picos de ocorrência de diferentes substâncias, conforme ilustra a figura 2.



**Figura 2** - Perfil cromatográfico da própolis verde determinado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Picos identificados conforme padrões fornecidos: A: ácido cafeico; B - ácido cumárico; C - ácido ferúlico; D - canferol; E - pinocembrina; F – crisina; G – galangina. Fonte: OLDONI, 2018.

Os principais constituintes químicos da própolis verde brasileira são o ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, naringenina, kaempferide e artepillin C (SZLISZKA et al., 2013).

Usualmente, ao analisar amostras de própolis verde os picos mais elevados observados em um cromatograma compreendem ao artepillin C, o que é explicado pela sua porção majoritária na composição do produto. Os picos H e/ou I ilustrados na figura 2 sugerem a presença deste composto químico, conforme constatações já verificadas (SOUSA et al., 2007; PAULA, 2013; SALGUEIRO; CASTRO, 2016; COELHO et al., 2017).

### 3.2.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada seguindo o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, sugerido por Singleton et al. (1965). À uma

alíquota de 0,5 mL da amostra a ser analisada foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10). Após 5 minutos de repouso da mistura, foi adicionado 2,0 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (4%). As soluções ficaram encubadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente e após 2 horas foi realizada a leitura da absorbância a 740 nm. Foi utilizado como padrão de referência o ácido gálico em concentrações que variam de 5 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os resultados foram expressos em mg equivalente ao padrão ácido gálico  $\text{g}^{-1}$  de amostra.

### 3.2.3.3 Determinação da Atividade antioxidante

#### 3.2.3.3.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS

O método consiste na formação de um radical ABTS através da reação de ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com persulfato de potássio ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ), com a mistura permanecendo em ambiente escuro por um período de 16 horas. Posteriormente, o radical formado foi diluído com etanol P.A. até obter absorbância de  $0,700 \pm 0,010$ . A reação foi determinada utilizando 30  $\mu\text{L}$  do EEP ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com 3,0 mL do radical. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (734 nm) (Modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer), passados 6 minutos da reação. Etanol foi utilizado como branco e os resultados de atividade antioxidante expressos como base na curva analítica de Trolox em  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de própolis bruta ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ) (RE et al., 1999; RUFINO et al., 2007).

#### 3.2.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical DPPH

O método consiste na adição de um volume de 500  $\mu\text{L}$  do EEP ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 3 mL de etanol P.A. e 300  $\mu\text{L}$  da solução do radical DPPH a  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Após misturada, a solução permaneceu em ambiente escuro por um período de 45 minutos. A absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro (517 nm) (Modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer). Como branco, utilizou-se o etanol P.A.. A quantificação foi realizada com base na curva analítica utilizando o Trolox como padrão. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de própolis bruta ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSSET, 1995).

### 3.2.3.3.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de tampão acetato  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  (25 mL), solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (2,5 mL) e solução aquosa de cloreto de ferro a  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (2,5 mL). A reação consiste em  $100 \mu\text{L}$  do EEP ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com 3 mL do reagente. A mistura foi homogeneizada e mantida aquecida a  $37^\circ\text{C}$  (banho termostático) por 30 minutos. A absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro (595 nm) (Modelo UV-VIS Lambda 25, Perkin Elmer). Como branco foi utilizado o reagente FRAP. A quantificação foi realizada por meio da curva de calibração preparada com sulfato ferroso. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol de Fe}^{+2}$  por grama de própolis bruta ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ) (BENZIE, STRAIN, 1996; RUFINO et al, 2006).

Os resultados encontrados para os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante da própolis encontram-se descritos na tabela 2, bem como valores relatados na literatura. Ambas avaliações foram realizadas utilizando seis repetições, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados das análises.

**Tabela 2** - Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de diferentes amostras de própolis.

Análises	Fenólicos (mg EAG g <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mg EQ g <sup>-1</sup> )	Capacidade antioxidante			Local de coleta
			ABTS (μmol de Trolox g <sup>-1</sup> )	DPPH (μmol de Trolox g <sup>-1</sup> )	FRAP (μmol de Fe <sup>+2</sup> g <sup>-1</sup> )	
Resultados obtidos	54,06 ± 3,01	12,33 ± 1,59	1.362,76 ± 161,57	122,52 ± 9,07	2.798,03 ± 366,83	Minas Gerais
Autores						
COTTICA et al. (2011) <sup>***</sup>	-	-	-	-	528,00 a 1.365,00	Paraná
MIHAI et al. (2011) <sup>**</sup>	-	-	-	-	720,00 a 2.540,00	Tansilvânia
BITTENCOURT et al. (2015) <sup>*</sup>	185,52	-	-	-	-	-
MACHADO et al. (2015) <sup>*</sup>	69,74	23,27	-	-	-	Paraná
ANDRADE et al. (2017) <sup>*</sup>	90,55	59,45	2.214,96	4.554,35	604,20	Sergipe
CALEGARI (2018) <sup>**</sup>	-	-	1.130,00	136,00	-	Paraná
TOUZANI et al. (2018) <sup>***</sup>	12,02 a 168,43	9,98 a 160,56	-	-	-	Marrocos

Nota: valores expressos como média ± desvio padrão; EAG: equivalentes a Ácido Gálico; EQ: equivalentes a Quercetina. <sup>\*</sup>Amostras de própolis de coloração verde; <sup>\*\*</sup>Amostras de própolis de coloração marrom; <sup>\*\*\*</sup>Amostras de própolis sem indicação de coloração no trabalho.

### 3.2.4 Avaliação anti-helmíntica *in vitro*

Todos os procedimentos adotados no experimento foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, registrado com número de protocolo 2017-024 (Anexo 1).

O extrato de própolis utilizado nos testes *in vitro* foi produzido a partir da própolis liofilizada, misturada a solução de água e dimetilsulfóxido (DMSO) (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO) na concentração de 3%. Para auxiliar no processo de dissolução da própolis, o material foi homogeneizado e aquecido a uma temperatura máxima de 100°C.

O extrato de própolis com água e DMSO foi produzido a uma concentração inicial de 30%, sendo dissolvido posteriormente nas concentrações avaliadas em cada teste.

#### 3.2.4.1 Atividade ovicida

A avaliação da atividade ovicida foi realizada pelo teste de eclodibilidade de ovos (TEO) descrito por Coles et al. (1992) adaptado por Bizimenyera et al. (2006).

Fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de dez ovinos (½ Dorper ½ Santa Inês), infectados naturalmente por helmintos gastrointestinais, com um número de ovos por grama de fezes (OPG) médio de 5.000 (oriundos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, localizada a uma latitude S de 25° 42' 52" e longitude W de 53° 03' 94", com altitude de 519 metros acima do nível do mar). A técnica de OPG foi desenvolvida conforme metodologia de Gordon; Whitlock (1939).

A recuperação dos ovos das fezes foi realizada conforme protocolo n. 3/2009 do Laboratório de Sanidade Animal, da Embrapa Pecuária Sudoeste (Anexo 2), com algumas adaptações. Cerca de 60 gramas de fezes foram homogeneizadas com água aquecida (40°C), e filtradas sequencialmente em peneiras com aberturas de 105 µm, 55 µm e 25 µm. Os ovos retidos na última peneira (25 µm) foram recuperados, alocados em tubos tipo Falcon e centrifugados por 5 minutos a uma rotação de 3.000 rpm (centrifuga microprocessada para tubos – QUIMIS, Q222TM). O sobrenadante resultante da centrifugação foi desprezado e o conteúdo do tubo completado com solução salina saturada, para uma nova centrifugação nas mesmas condições. Após a centrifugação, o sobrenadante foi despejado na peneira de 25 µm e lavado com

água para a coleta dos ovos. Todo o procedimento foi realizado a uma temperatura ambiente mínima de 22°C, a fim de não prejudicar a eclodibilidade dos ovos.

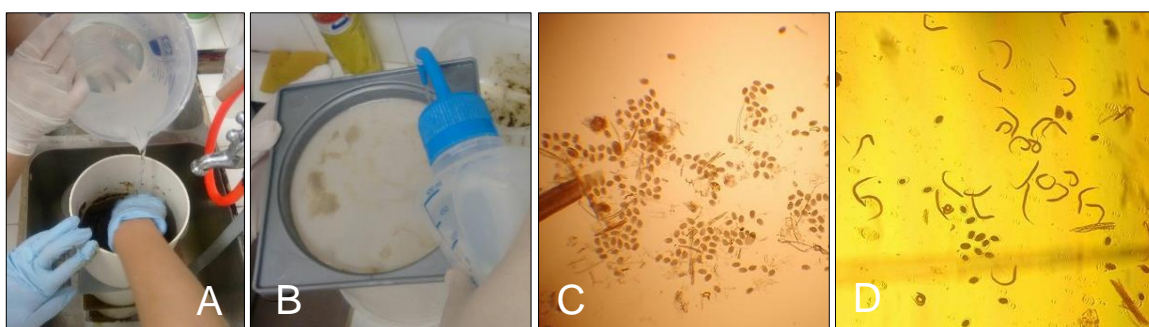
A concentração de ovos utilizada foi ajustada em 100 ovos/30 µl. Esta, foi verificada por três vezes antes da incubação. As soluções foram incubadas em placas de 24 poços a um volume total final de 1000 µl completado por água. As concentrações avaliadas do extrato de própolis verde foram: 2,49; 4,98; 9,99; 19,98; 49,98; 99,99 mg mL<sup>-1</sup>. Como controle negativo foram utilizados água, água + DMSO e DMSO, e como controle positivo albendazol (LABOVET®). Ambas as concentrações foram validadas em testes pilotos ou ainda baseadas em referenciais teóricos já existentes.

Após a inclusão, as placas foram incubadas em B.O.D. a 25°C por 48 horas e umidade relativa (UR) 70%. Após o período de incubação, adicionou-se uma gota de lugol em cada poço da placa, a fim de paralisar a eclosão dos ovos e facilitar a contagem. Todos os ovos e larvas (L1) foram contabilizados com auxílio de microscópio invertido. Foram utilizadas quatro repetições por concentração avaliada (a fim de dar maior credibilidade aos resultados). O percentual médio de eclodibilidade foi calculado conforme Sprenger (2016), a partir da seguinte equação matemática:

$$(a) \text{ Percentual de eclodibilidade (\%)} = \frac{L1}{(ovos+L1)} \times 100, \text{ em que:}$$

L1: número de larvas contabilizadas em cada poço após período de incubação;

ovos: número de ovos contabilizados em cada poço após período de incubação.



**Figura 3** - Procedimentos para realização do teste de eclodibilidade de ovos (TEO). A: Amostra do pool de fezes sendo filtradas em peneiras de diferentes aberturas (µm). B: Recuperação dos ovos de helmintos retidos na peneira de menor abertura (25 µm). C: Ovos de helmintos sendo contabilizados para posterior inclusão nas placas. D: Ovos e larvas (L1) observadas posterior período de incubação do material. Fonte: Arquivo pessoal (2018).

### 3.2.4.2 Atividade larvicida

A atividade larvicida foi avaliada pelo teste de inibição da migração larval (TIML) descrito por D'Assonville et al. (1996) adaptado por Molento; Prichard (2001).

Larvas (L3) foram obtidas de coproculturas frescas de fezes de dez ovinos ( $\frac{1}{2}$  Dorper  $\frac{1}{2}$  Santa Inês), infectados naturalmente por helmintos gastrointestinais, com um número médio de OPG de 10.000 (GORDON; WHITLOCK, 1939) (oriundos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, localizada a uma latitude S de 25° 42' 52" e longitude W de 53° 03' 94", com altitude de 519 metros acima do nível do mar). As coproculturas foram realizadas utilizando-se um *pool* de fezes de aproximadamente 60 gramas, conforme metodologia de Roberts; O'Sullivan (1950).

A prevalência de gêneros de helmintos gastrointestinais nas amostras utilizadas foi de: 60% *Haemonchus contortus*, 26% *Trichostrongylus* sp, 14% *Strongyloides papillosus* identificadas conforme metodologia de Dickmans; Andrews (1933) e Keith (1953). A motilidade larval média foi de aproximadamente 98%.

Foram utilizadas 200 larvas/poço, concentradas em um volume de 100  $\mu$ l. As alíquotas foram mensuradas três vezes antes da determinação do volume final, a fim de garantir a padronização da quantidade de indivíduos. Antes de iniciar a incubação nas placas, as larvas foram submetidas a um processo de perda de bainha, utilizando-se hipoclorito de sódio (NaClO) a 12%, por cerca de 20 minutos. Após a eliminação da bainha, o material foi lavado com água destilada por quatro vezes, a fim de garantir a retirada de todo o NaClO que em contato com as larvas por tempo prolongado é tóxico às mesmas.

As soluções foram incubadas em placas de 24 poços a um volume total final de 1.000  $\mu$ l completado por água destilada. As concentrações avaliadas do extrato de própolis verde foram: 0,099; 0,480; 1,980; 19,990; 49,990; 99,990 mg mL<sup>-1</sup>. Como controle negativo foram utilizados água, água + DMSO e DMSO, e como controle positivo albendazol (LABOVET®). Ambas concentrações foram validadas em testes pilotos ou ainda baseadas em referenciais teóricos já existentes.

As placas foram incubadas em B.O.D. a 27°C por 16 horas (*over night*) e umidade relativa (UR) 70%. Passado este período, o material foi alocado em novas placas contendo aparatos em malha de *nylon* (abertura de 25  $\mu$ m) (Figura 4).



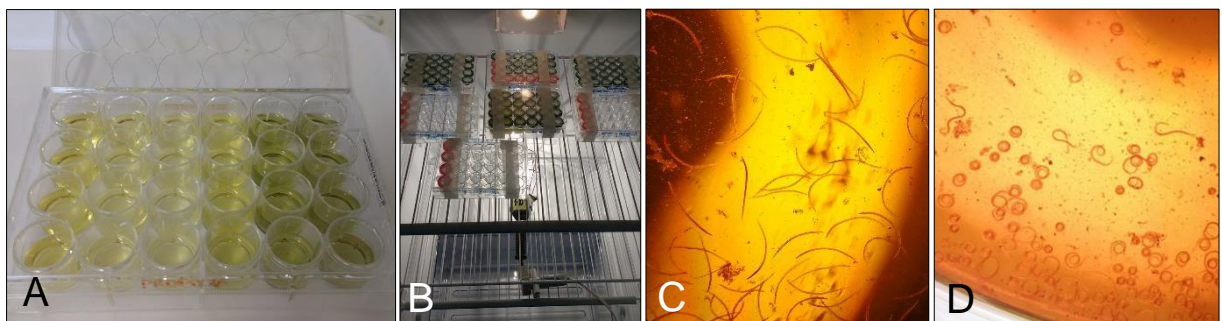
**Figura 4** - Aparatos utilizados para o TIML, confeccionados a partir de seringas descartáveis com volume de 5 e 3 mL, anéis de borracha para castração (ovinos, caprinos e bezerros) e malha de nylon com abertura de 25  $\mu\text{m}$ . Fonte: Arquivo pessoal (2018).

Cerca de 1.000  $\mu\text{l}$  de água destilada foram adicionados em cada poço, a fim de facilitar a atividade de migração das larvas. As placas foram vedadas com fita crepe e alocadas novamente em B.O.D., nas mesmas condições, por um período de 24 horas. A fim de estimular a migração das larvas, ambas foram expostas a uma fonte de luz incandescente (60 W).

Após o período total de incubação, os aparatos foram retirados das placas, e uma gota de lugol adicionada em cada poço, com o objetivo de imobilizar as larvas. Com auxílio de microscópio invertido, contabilizaram-se as larvas (L3) que migraram pelos aparatos. Foram utilizadas quatro repetições por concentração avaliada, a fim de dar maior credibilidade aos resultados. O percentual de inibição da migração foi calculado a partir da seguinte equação:

$$(b) \text{ Percentual de inibição da migração (\%)} = \frac{(Cn - trat)}{Cn} \times 100$$

em que,  $Cn$  indica a quantidade de indivíduos encontrados no grupo controle e  $trat$ , corresponde a quantidade de indivíduos do grupo tratado (BORGES, 2013).



**Figura 5** - A: Larvas (L3) incubadas com o extrato de própolis verde em diferentes concentrações. B: Placas incubadas em B.O.D. expostas a uma fonte de luz. C: Larvas (L3) observadas após a migração – controle. D: Larvas (L3) observadas após a migração – extrato de própolis verde. Fonte: Arquivo pessoal (2018).



### 3.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores que apresentaram diferença significativa, comparados pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os valores das DL<sub>50</sub> foram obtidos a partir da análise de regressão não-linear por meio do programa GraphPrism 5.0.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Caracterização química da própolis verde

A própolis utilizada no presente estudo é do tipo verde, produzida a partir de uma flora específica, o que lhe garante características diferenciadas das demais própolis produzidas (vermelha, marrom ou escura), tal condição pode proporcionar maior atividade antioxidante ao produto, comprovado pelo teor elevado de FRAP evidenciado na análise. A presença de artepillin C em própolis produzidas pela polinização de *Baccharis dracunculifolia* lhe confere diferentes atividades, dentre elas, antioxidante (HAYASHI et al., 1999; KIMOTO et al., 2001; NAKANISHI et al., 2003; SHIMIZU et al., 2004; COELHO et al., 2017) e imunomoduladora (KIMOTO et al., 1998).

Monroy et al. (2018) trabalhando com própolis verde oriunda do estado de Minas Gerais encontrou como componentes majoritários os fenólicos catequina e quercetina, ácido ascórbico e ácido gálico, além do artepillin C. A maior parte das amostras de própolis brasileiras de coloração verde apresentam como constituintes principais os fenilpropanóides prenilados, a exemplo do artepillin C (BANKOVA, 2005; SALATINO et al., 2011), e ácidos clorogênicos (éster resultante da reação de esterificação entre o ácido trans-cinâmico, p-cumárico, ferúlico ou cafeico e ácido quínico) (FERNANDES-SILVA et al, 2013).

Coelho et al. (2017) investigando amostras de própolis verde e marrom oriundas dos estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais identificaram diferentes compostos químicos, dentre eles: canferol, artepillin C, ácido isoferúlico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, entre outros. Ambos, pertencentes aos grupos fenólicos e flavonoides condizem com os compostos químicos identificados no presente trabalho.

Fernandes-Silva et al. (2013) analisaram amostras de própolis dos estados de Minas Gerais e Paraná e constataram que ambas apresentaram derivados de ácido cinâmico, a exemplo do ácido p-cumárico, canferol, drupanina e artepillin C. Dentre estes, a amostra utilizada no presente trabalho apresentou os compostos ácido cumárico e canferol, indicando que a origem botânica interfere diretamente na composição do produto final, proporcionando composições semelhantes a amostras de própolis a serem coletadas em regiões geográficas de condições semelhantes.

O poder redutor de ferro (FRAP) apresentado para a amostra avaliada no presente trabalho foi bastante elevado, indicando que a atividade antioxidante presente na própolis verde é bastante elevada quando comparada aos valores determinados por diferentes autores e amostras avaliadas.

Conforme Calegari et al. (2017) os valores elevados são resultados da alta influência das características locais onde o produto é coletado, isso porque as abelhas tendem a coletar material em áreas muito próximas de onde a colônia está inserida.

Valores encontrados para fenólicos, flavonoides e demais indicadores de atividade antioxidante, além do FRAP, divergem dos valores encontrados na literatura, sendo possível efeito das diferentes condições de produção e colheita do material.

### 3.3.2 Avaliações anti-helmínticas sobre ovos e larvas

Os ovos de helmintos gastrointestinais são muito susceptíveis a variações de temperatura e demais fatores, assim, diferentes fontes de água utilizadas e a presença de detritos na amostra pode inviabilizar a realização do teste (COLES et al., 2006; FORTES; MOLENTO, 2013).

A fim de validar o teste, controles negativos foram utilizados (água, DMSO e água + DMSO) apresentando percentuais de eclodibilidade entre 80 e 90% ou mais. Isto prova que a eclodibilidade não foi impossibilitada e os dados encontrados para os produtos testados podem ser confirmados.

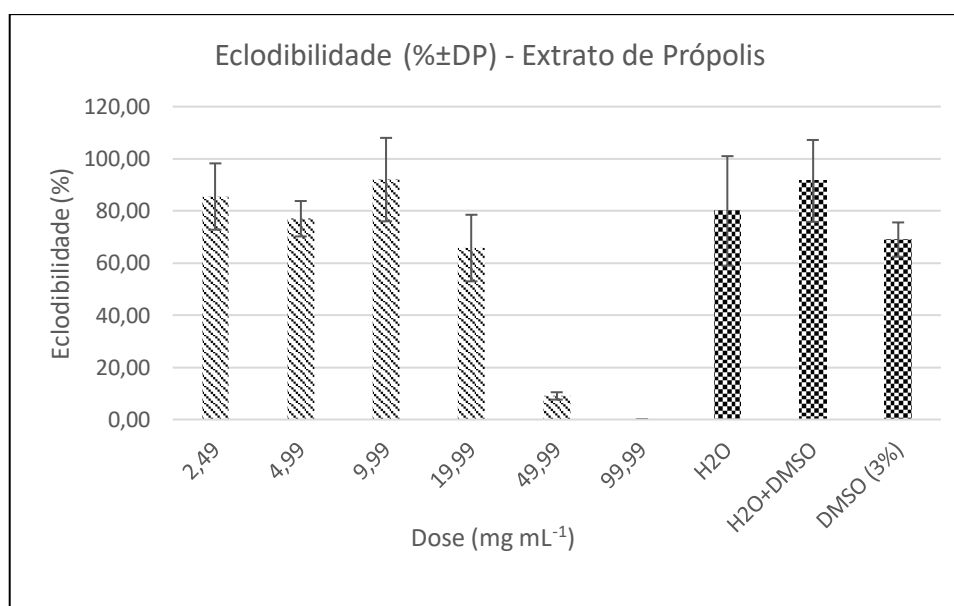
A atividade anti-helmíntica do extrato de própolis foi avaliado por meio da realização de testes *in vitro* que servem de suporte para avaliações anti-helmínticas *in vivo*. Os resultados dos testes TEO e TIML encontram-se nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3** - Eclodibilidade de ovos (TEO) de nematódeos gastrintestinais sob efeito do extrato de própolis verde e valores de DL<sub>50</sub> de ambos os produtos avaliados.

Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	TEO (%)
2,49	85,50 ± 5,36 a
4,99	77,00 ± 3,39 ab
9,99	92,00 ± 8,00 a
19,99	65,75 ± 6,38 b
49,99	4,00 ± 0,70 c
99,99	0,00 ± 0,00 c
DL <sub>50</sub> albendazol	2,450 mg mL <sup>-1</sup>
DL <sub>50</sub> extrato de própolis	26,81 mg mL <sup>-1</sup>

Valores seguidos pelo erro padrão da média (EPM). DL<sub>50</sub>: concentração letal para aproximadamente 50% da população total avaliada. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem pelo teste SNK ao nível de 5%.

As concentrações do extrato de própolis com maior atuação sobre os ovos de nematoides gastrintestinais foram 49,99 e 99,99 mg mL<sup>-1</sup> (Tabela 3), diferindo das demais concentrações avaliadas e apresentando um percentual de eclodibilidade muito baixo, o que indica que os ovos foram impedidos de realizar tal atividade (Figura 6).



**Figura 6** - Médias de eclodibilidade (TEO) para ovos sob efeito do extrato de própolis em diferentes concentrações e controles negativos (H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O+DMSO, DMSO). Nota: Barras de erro indicam o desvio padrão da média (DP) não sendo vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas é 0 (zero) ou muito próximo deste.

Concentrações menores (2,49, 4,99 e 9,99 mg mL<sup>-1</sup>) apresentam um percentual de eclodibilidade muito semelhante aos controles negativos utilizados, com valores acima de 77,00%, indicando assim que os mesmos não possuem viabilidade de utilização, por não serem capazes de impedir a eclosão dos ovos.

Oliveira (2013) avaliou o potencial de diferentes plantas medicinais sobre ovos de *H. contortus*. As plantas utilizadas *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado), *Syzygium cumini* (jamelão), *Genipa americana* (jenipapo) e *Salanum lycocarpum* (lobeira) apresentaram composição química rica em taninos e fenóis – classe relativamente simples de fenólicos. Todas demonstraram potencial de utilização no controle e inibição da eclodibilidade dos ovos dos helmintos gastrointestinais. Inibição da eclodibilidade de 96,17% foi encontrado para o extrato aquoso de *S. cumini* (100 mg mL<sup>-1</sup>), enquanto que o extrato de *A. humile* apresentou percentual de 98,23% (50 mg mL<sup>-1</sup>). Além dos percentuais de eclodibilidade elevados, os valores das DL<sub>50</sub> encontradas para ambos os extratos foram relativamente baixos (4,14 mg mL<sup>-1</sup> para *A. humile*, 2,821 mg mL<sup>-1</sup> para *G. americana*, 12,35 mg mL<sup>-1</sup> para *S. cumini* e 4,66 x 10<sup>15</sup> mg mL<sup>-1</sup> para *S. lycocarpum*), confirmando a alta toxicidade dos extratos utilizados frente os ovos de helmintos.

Oliveira (2014) avaliou o efeito de extrato de *Momordica charantia* (melão-de-São-Caetano) sobre helmintos gastrointestinais de ovinos e encontrou uma composição química a base de compostos flavonoides, terpenos, saponinas, alcaloides e taninos – principalmente ácido gálico, não verificando a presença de ácidos fenólicos na amostra avaliada. Percentuais de inibição da eclodibilidade de 21% e 37% foram evidenciados nas concentrações de 50 mg mL<sup>-1</sup> e 100 mg mL<sup>-1</sup>, e a DL<sub>50</sub> foi de 25,86 mg mL<sup>-1</sup>, sendo esta, muito similar a encontrada no presente trabalho, indicando que produtos de composição química variada apresentam potencial de atividade biológica, no entanto, devem ser estudados de forma isolada verificando as melhores aplicações.

Neuwirt et al. (2015) apresentam o extrato de *Musa* spp. (bananeira) como eficiente no controle de helmintos gastrointestinais em ruminantes, uma vez que o mesmo foi capaz de inibir a eclodibilidade de ovos de parasitas gastrointestinais de ovinos em 98,55% (160 mg mL<sup>-1</sup>). Segundo os autores, tal característica é atribuída à presença de taninos na composição química do produto em questão.

Alguns fitoterápicos de uso frequente na medicina humana também são avaliados no controle de helmintos gastrointestinais de ruminantes, um exemplo é a *Artemisia annua*. Sprenger et al. (2015b) avaliaram o potencial do extrato de *A. annua* sobre ovos de *Bunostomum* sp., *Cooperia* sp. e *Trichostrongylus* sp. e observaram inibição da eclodibilidade de ovos de 94,08% (50 mg mL<sup>-1</sup>) e uma DL<sub>50</sub> de 3,32 mg mL<sup>-1</sup>. Conforme resultados da marcha fitoquímica, a composição química do extrato

foi de compostos alcaloides, catequinas, esteroides, fenóis, taninos e triterpenos.

Féboli (2015) avaliou o potencial de *Opuntia ficus-indica* (palma forrageira) sobre ovos de helmintos gastrointestinais de ovinos apresentando um percentual de inibição da eclodibilidade de 93% ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e  $9,9 \text{ mg mL}^{-1}$  para a  $DL_{50}$ . Conforme análises de compostos químicos, eram prevalentes no extrato compostos alcaloides, flavonoides, saponinas e taninos. Segundo a autora, o efeito positivo no controle dos ovos de helmintos é explicado pela elevada concentração de tanino no fitoterápico utilizado, uma vez que esta classe de compostos polifenólicos possui potencial anti-helmíntico comprovado (VILLALBA et al., 2010; KATIKI et al., 2013; WILLIAMS et al., 2014).

Dentre os produtos fitoterápicos a serem utilizados no controle de helmintos gastrointestinais de pequenos ruminantes, a própolis é uma alternativa promissora. De composição química bastante abrangente e contendo compostos bioativos, sua utilização torna-se eficaz. No entanto, devido à inconstância da composição do produto e sua sazonalidade, a utilização em pesquisas científicas que avaliem tal objetivo é escassa.

O conhecimento da  $DL_{50}$  de determinado produto sugere seu grau de toxicidade. Assim, quanto menor o valor da  $DL_{50}$ , maior a sua toxicidade sobre estruturas teciduais de organismos vivos (RUPPENTHAL, 2013). A toxicidade é determinada pela frequência e duração de exposição à mesma e pela via de administração (LEITE; AMORIM, 2003).

O valor calculado para a  $DL_{50}$  do controle positivo (albendazol) foi de  $2,450 \text{ mg mL}^{-1}$  (Tabela 3), valores distintos são descritos na literatura para o mesmo anti-helmíntico químico. Sprenger (2015a) encontrou um percentual de inibição da eclodibilidade de ovos de aproximadamente 97,00% utilizando uma  $DL_{50}$  de  $0,63 \text{ mg mL}^{-1}$  para albendazol, sobre larvas de helmintos gastrointestinais de caprinos.

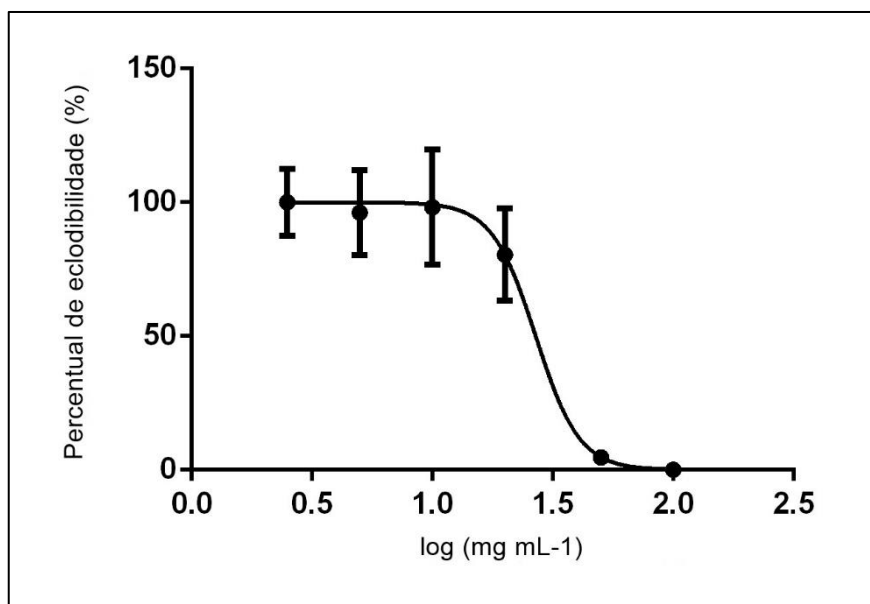
Sobre os produtos e concentrações utilizadas para controle positivo, diferentes autores relatam valores e condições distintas. Neuwirt et al. (2015) utilizando como controle positivo sulfóxido de albendazol na concentração de  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  obteve 100% de inibição da eclodibilidade de ovos de helmintos gastrointestinais de ovinos no TEO, concentração esta inferior comparada a  $DL_{50}$  encontrada no presente trabalho. Valores semelhantes ( $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ ) são apresentados por Oliveira (2014) trabalhando com culturas puras de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos. Anteriormente, Botura (2011) avaliou o potencial de albendazol sobre ovos de

helmintos gastrointestinais de caprinos e obteve eficácia de 100% no TEO com uma concentração do produto de 0,025 mg mL<sup>-1</sup>.

Isto porque, a apresentação do princípio químico utilizado é distinta em ambas as situações. O albendazol necessita ser transformado em sulfóxido de albendazol para ser absorvido e ter sua efetividade no animal, apresentando efetiva absorção aproximadamente dez horas após o fornecimento, se fornecido na forma de metabólito ativo tem sua atividade efetiva na metade do tempo (CARVALHO et al., 1999, CAVALCANTE et al., 2009, LOPES et al., 2017).

Fatores como diferentes populações de larvas e ovos utilizados, históricos de resistência por anti-helmínticos químicos entre outros apresentam total influência sobre a concentração efetiva do produto testado e sua eficiência ou não.

A curva dose-resposta obtida para o TEO (Figura 7) indica um processo de inibição, dessa forma, quanto maior a concentração do produto testado, menor a ocorrência do processo esperado, neste caso, a eclodibilidade dos ovos (MINHO; GASPAR; DOMINGUES, 2016). O valor encontrado em log(x) para a DL<sub>50</sub> do extrato de própolis verde para o TEO foi de 1,428 mg mL<sup>-1</sup>.



**Figura 7** - Curva dose-resposta obtida através do teste de eclodibilidade de ovos (TEO) para diferentes doses de extrato de própolis verde em log (x). Nota: Barras de erro indicam o erro padrão da média (EPM) não sendo vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas é 0 (zero) ou muito próximo deste.

Sobre os valores encontrados para o TIML, concentrações mais elevadas do extrato de própolis verde apresentaram percentuais de inibição de migração maiores

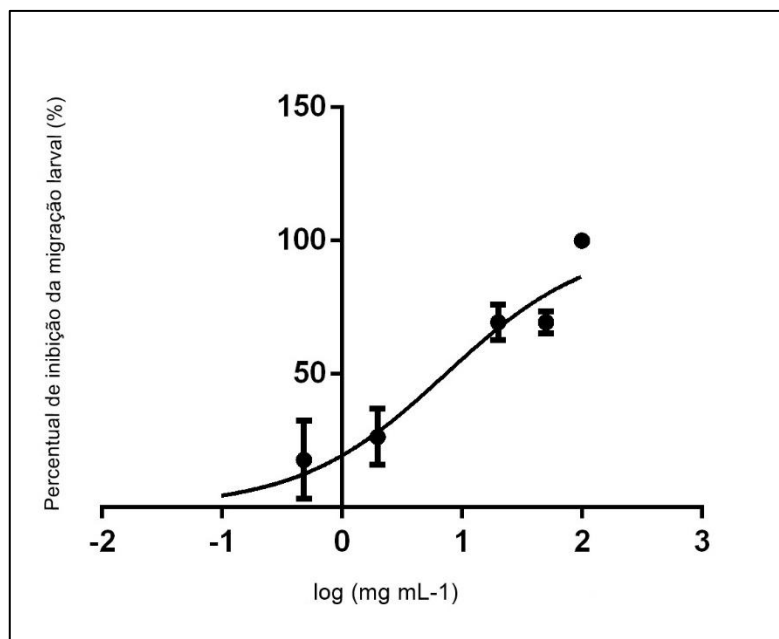
(99,99, 49,99 e 19,99 mg mL<sup>-1</sup>) (Tabela 4), sendo a concentração mais alta responsável pela inibição de mais de 97% da migração. O valor da DL<sub>50</sub> do mesmo produto para o TIML é de 7,309 mg mL<sup>-1</sup> e para o controle positivo, albendazol, 1,286 mg mL<sup>-1</sup> (Tabela 4). Sobre os controles negativos utilizados (H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O+DMSO, DMSO) pelo menos 90% do total de larvas incubadas apresentaram comportamento de migração, a fim de validar o teste e comprovar a neutralidade destes sobre as mesmas.

**Tabela 4** - Inibição de migração de larvas (TIML) de nematódeos gastrintestinais sob efeito do extrato de própolis verde e valores de DL<sub>50</sub> de ambos os produtos avaliados.

Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	TIML (%)
0,099	8,48 ± 4,25 d
0,480	23,04 ± 6,62 c
1,980	30,87 ± 4,80 c
19,99	69,85 ± 3,02 b
49,99	69,85 ± 1,88 b
99,99	97,68 ± 0,58 a
DL <sub>50</sub> albendazol	1,286 mg mL <sup>-1</sup>
DL <sub>50</sub> extrato de própolis	7,309 mg mL <sup>-1</sup>

Valores seguidos pelo erro padrão da média (EPM). DL<sub>50</sub>: concentração letal para aproximadamente 50% da população total avaliada. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem pelo teste SNK ao nível de 5%.

O valor da DL<sub>50</sub> em log(x) do extrato de própolis verde para o TIML é de 0,8639 mg mL<sup>-1</sup>, podendo ser observado na figura 8. A curva dose-resposta apresentada pelo extrato de própolis verde no TIML é de estimulação, assim, quanto maior a concentração do produto testado, maior é a ocorrência do processo biológico em questão, nesse caso, a inibição da migração de larvas (MINHO, GASPAR, DOMINGUES, 2016).



**Figura 8** - Curva dose-resposta obtida através do teste de inibição da migração larval (TIML) para diferentes doses de extrato de própolis verde em log (x). Nota: Barras de erro indicam o erro padrão da média (EPM) não sendo vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas é 0 (zero) ou muito próximo deste.

Na literatura científica citada, apenas um trabalho avaliou o potencial da própolis sobre larvas de helmintos gastrointestinais de pequenos ruminantes – *Haemonchus contortus in vitro*. Batista (2016) utilizou geoprópolis produzida no estado do Maranhão, sobre ovos e larvas de *H. contortus* nos testes de eclodibilidade larval (TEO) e inibição da migração larval (TIML). A  $DL_{50}$  encontrada para o extrato de geoprópolis no TEO foi de  $2,78 \text{ mg mL}^{-1}$  e de  $0,27 \text{ mg mL}^{-1}$  para o TIML.

O teor de fenólicos totais encontrado na mesma amostra de geoprópolis foi de  $541,96 \text{ mg EAG g}^{-1}$ , cerca de dez vezes superior àquele evidenciado na própolis utilizada no presente trabalho, o que garante elevada atividade antioxidante ao produto. Sobre a composição química, observou-se que o material apresentou quantidades consideráveis de polifenóis, a exemplo dos ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, benzofenonas preniladas, cumarinas e terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, ácidos graxos, esteroides e saponinas), sendo a maior parte composta por trigaloil e ácido elágico, ambos compostos fenólicos. O trigaloil é um galotanino (classe de taninos hidrolisáveis), formado a partir da ligação do ácido gálico com um monômero que se esterifica e liga-se ao grupo hidroxila de um carboidrato poliol, nesse caso, a glicose.



Sprenger (2013) avaliando o potencial do extrato hidroalcolico de *Artemisia annua* sobre larvas de helmintos gastrointestinais de caprinos determinou inibição da migração larval de aproximadamente 85% ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e  $6,72 \text{ mg mL}^{-1}$  para a  $DL_{50}$ . Conforme análise de componentes químicos, o extrato apresentou uma gama rica de compostos, como fenóis, taninos, catequinas, esteroides, triterpenos e alcaloides. Taninos e flavonoides, quando determinados em quantidades representativas em determinada planta, garantem à mesma elevadas propriedades anti-helmínticas (KERBOEUF et al., 2008).

Produtos com potencial conhecido na alimentação animal, a exemplo da palma forrageira (*O. indica*) podem ser utilizados no controle de helmintos gastrointestinais. Féboli (2015) encontrou um percentual de inibição da migração de 83,8% ( $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) utilizando extrato de *O. indica* sobre larvas de helmintos gastrointestinais de ovinos. A composição química do mesmo apresentava como compostos majoritários alcaloides, flavonoides, saponinas e taninos. Conforme a autora, a atividade anti-helmíntica da palma forrageira pode não estar relacionada somente a presença de taninos, mas sim ao somatório dos efeitos de demais compostos como saponinas, flavonoides, taninos e pigmentos.

Apesar de ser um dos compostos naturais com propriedades mais bem descritas na literatura, quando em conjunto com demais constituintes fitoquímicos, a exemplo das saponinas, os taninos podem apresentar reações de sinergismo, alterando assim a permeabilidade das membranas-celulares dos micro-organismos a que são submetidos (SCHENKEL et al., 2001; EFFERTH; KOCH, 2011).

Grando et al. (2016) utilizaram óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore-do-chá, mirto-de-mel) sobre larvas de culturas puras de *H. contortus* introduzidas em ovinos e obteve um percentual de inibição de migração de aproximadamente 88% ( $56 \text{ mg mL}^{-1}$ ). O óleo essencial utilizado apresentou quase que na totalidade da sua composição química terpenos, compostos estes de atuação anti-helmíntica já comprovada. Nesse caso, a eficiência pode ser explicada pelos compostos obtidos a partir de nanotecnologia além da concentração elevada do óleo essencial quando comparado à extratos vegetais, sendo assim mais potente mesmo em concentrações e dosagens menores.

Soares et al. (2018) avaliaram o potencial de um subproduto de origem vegetal (bagaço de uva) no controle de helmintos gastrointestinais de ovinos. O mesmo apresenta composição química majoritária de saponinas, taninos e flavonoides, e

apresentou teores de aproximadamente 4% e 2% de fenólicos e taninos, respectivamente. No TIML o extrato de bagaço de uva apresentou inibição de 100% até mesmo na menor concentração avaliada ( $0,097 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Por meio de micrografias foi possível verificar efeitos diretos sobre as larvas de helmintos como perda do formato cilíndrico e danos no tegumento, ocasionados pela atuação dos compostos bioativos presentes no extrato. Estes atuam diretamente com as membranas celulares, desestabilizando e aumentando a permeabilidade celular, possibilitando assim a ação de proteínas intracelulares no parasita (SANTOS et al., 2018).

A  $DL_{50}$  encontrada para o albendazol no TIML foi de  $1,286 \text{ mg mL}^{-1}$ , doses distintas do mesmo princípio químico frente a inibição da migração de larvas são encontradas na literatura. Féboli (2015) traz como sendo necessária a dose de  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$  de albendazol (FLUKA®) para a inibição de 100% da migração de larvas de helmintos gastrointestinais de ovinos. Diferentes doses podem ser necessárias para a obtenção de mesmo objetivo uma vez que a qualidade da molécula utilizada influencia diretamente na eficácia da formulação assim como a variação do grau de pureza da mesma (LOPES et al., 2013).

O grupo químico dos benzimidazóis, incluindo o albendazol, é caracterizado por atuar sobre estágios adultos e imaturos de helmintos gastrointestinais, tendo como mecanismo de atuação o impedimento da formação de microtúbulos do parasito, modificando a conformação da construção desses canais, impedindo assim a ocorrência de processos vitais para a função celular, a exemplo de alterações na forma da célula, divisão mitótica e transporte de nutrientes (LANCEY, 1988, MARTIN, 1997, AYRES; ALMEIDA, 2006).

A interrupção na formação de microtúbulos ocasiona alterações na homeostasia das células dos helmintos (BRUCE, 1987, KÖHLER, 2001), além disso, a captação de glicose pelas células intestinais dos parasitas é prejudicada pela inibição da enzima fumarato redutase, sendo necessário então a utilização de reservas energéticas para manutenção, promovendo mortes por inanição (PRICHARD, 1973).

De forma geral, o grupo químico dos benzimidazóis atua diretamente sobre a ligação  $\beta$ -tubulina dos helmintos, impedindo o mesmo de se alimentar e ocasionando ruptura intestinal, atuando sobre a inibição da produção de ovos (MARTIN; ROBERTSON; BJORN, 1997).

Alterações no alvo molecular, mudanças no metabolismo inativando ou removendo determinada droga ou impedindo sua ativação, alteração da distribuição da droga no organismo alvo e amplificação de genes-alvo para a superação da droga são algumas das formas que mecanismos de resistência podem ser evidenciados (WOLSTENHOLME et al., 2004).

A resistência pode apresentar-se nas formas específica – associada à ação dos anti-helmínticos ou inespecífica – ocasionando alterações no receptor da droga e/ou na modulação da concentração do fármaco. Estudos indicam que o mecanismo de resistência pelos benzimidazóis está relacionado à mutação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina localizados em porções definidas da  $\beta$ -tubulina, em isolados já estudados de *Haemonchus contortus* (KWA et al., 1994, PRICHARD, 2001).

Devido à afinidade de se ligarem a proteínas, os taninos apresentam efeito direto sobre a cutícula dos parasitos, principalmente nas regiões bucal e da vulva de fêmeas, provocando alterações na sua conformação, degenerações a nível muscular e em células intestinais (BRUNET et al., 2011). Devido a essas desestabilizações, alterações metabólicas oriundas de quebras estruturais da cutícula podem resultar em redução na motilidade do parasita. As deformações ocasionadas na extremidade anterior sugerem incapacidade e/ou diminuição da nutrição e prejuízos na liberação de ovos pelas fêmeas (HOSTE et al., 2012).

Além do efeito direto sobre os parasitas, em ruminantes os taninos possuem capacidade de atuar à nível nutricional, de forma indireta aos helmintos. Estes, ligam-se a proteínas, principalmente aquelas ricas em prolina (BAXTER et al., 1997) e propiciam a diminuição da degradação proteica por bactérias da microbiota ruminal. Devido ao pH ser mais baixo no compartimento abomasal que a nível ruminal, o complexo tanino-proteína é desfeito e as proteínas continuam sendo degradadas e absorvidas no trato gastrointestinal, sugerindo assim um melhor aproveitamento das mesmas. Essa “absorção tardia” eleva a capacidade de resposta imunológica frente a agentes como os helmintos (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011).

No entanto, quando fornecidos na alimentação animal, após serem convertidos em metabólitos de baixo peso molecular pelo metabolismo microbiano (bactérias ruminais) e pela digestão, formam complexos que quando fornecidos em elevadas quantidades, tornam-se tóxicos para os animais (MIN; HART, 2003). Teores entre 3 - 4% de inclusão de taninos na matéria seca (MS) na dieta não produzem efeito

tóxico, mas sim, efeitos positivos a exemplo da proteção da proteína pela excessiva degradação ruminal (ANIMUT et al., 2008).

As propriedades farmacológicas da própolis são atribuídas principalmente a presença de flavonoides (RUSSO et al., 2002), os quais apresentam efeitos sinérgicos quando em misturas complexas quimicamente, a exemplo da própolis (AMOROS et al., 1992).

Alguns compostos flavonoides, como os ácidos gálico, elágico e cafeico também podem apresentar funções anti-helmínticas (MONDAL et al., 2015). Flavonoides como a rutina, nicotiflorina e narcissina apresentam potencial na redução da migração de larvas (BARRAU et al., 2005) e alteram a motilidade das mesmas (AYERS et al., 2008).

Estudos sugerem que flavonoides quercetina, luteolina e taninos condensados apresentam efeito sinérgico na inibição do desembainhamento de larvas de *H. contortus* (KLONGSIRIWET et al., 2015). Assim, a ação simultânea de ambos os compostos proporciona efeito maior que quando utilizados separadamente.

### 3.4 CONCLUSÕES

A própolis verde utilizada apresentou composição química rica em flavonoides e fenólicos e atividade antioxidante elevada. O extrato alcóolico de própolis verde apresentou ação anti-helmíntica, inibindo o desenvolvimento de ovos e larvas, podendo tal efeito ser atribuído aos taninos e flavonoides presentes. No entanto, os valores de  $DL_{50}$  para ambos os testes são considerados elevados, uma vez que quanto menor este, maior é o grau de toxicidade do produto avaliado.

## 4 PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE CAPRINOS

### RESUMO

A resistência parasitária é recorrente na maior parte dos anti-helmínticos químicos disponíveis atualmente no mercado, tornando a busca por substâncias ativas e livres de resíduos cada vez maior. Trinta e três cabras da raça Boer foram divididas aleatoriamente em grupos experimentais (n=11 animais/grupo) a fim de avaliar os efeitos da administração oral do extrato de própolis verde sobre a verminose gastrointestinal e os parâmetros sanguíneos, em comparação com o anti-helmíntico químico monepantel. Os animais tratados com própolis (0,3 g/kg PV) receberam em média 1.156,35 mg de fenólicos cada, sendo a dose fornecida no dia sete do período experimental. O monepantel foi administrado ao respectivo grupo no mesmo dia, junto ao fornecimento de glicerina bidestilada líquida. O anti-helmíntico químico apresentou eficiência maior que o extrato de própolis verde para Famacha e OPG, uma vez que o fitoterápico teve efeito positivo no controle dos parasitas até o dia 30 do período avaliado. A espécie de helminto em maior proporção em ambos os grupos foi *H. contortus*. O percentual de redução da contaminação no TRCOF para monepantel foi de 99%. O extrato de própolis verde não apresentou efeito tóxico para os animais, os resultados encontrados para leucograma, hemograma e demais análises bioquímicas sugerem atuação direta do mesmo sobre o sistema imune dos animais. Assim, conclui-se que a própolis verde apresenta viabilidade de utilização no controle de helmintos gastrointestinais de pequenos ruminantes, visto que contribui na melhoria da saúde do animal como um todo, especificamente no combate à processos infecciosos e inflamatórios.

**Palavras chave:** Ácidos fenólicos. *Haemonchus contortus*. Verminose gastrointestinal.

## ABSTRACT

Parasite resistance is recurrent in most of chemical anthelmintics currently available on the market, making the search for active and residue-free substances increasingly large. Thirty-three Boer goats were randomly divided into experimental groups (n = 11 animals/group) to evaluate the effects of oral administration of green propolis extract on gastrointestinal verminosis and blood parameters compared to anthelmintic chemist monepantel. The animals treated with propolis (0.3 g/kg LW) received on average 1,156.35 mg of phenolics each, being the dose delivered on the seventh day of the experimental period. Monepantel was administered to the respective group on the same day, along with the supply of liquid double-distilled glycerin. The chemical anthelmintic showed higher efficiency than the green propolis extract for Famacha and EPG, since the phytotherapeutic had a positive effect on parasite control until the 30th of the evaluated period. The species of helminth in the highest proportion in both groups was *H. contortus*. The percentage reduction in FECRT contamination for monepantel was 99%. Green propolis extract didn't present toxic effect to animals, the results found for leukogram, hemogram and other biochemical analyzes suggest its direct action on the immune system of animals. Thus, it is concluded that green propolis presents viability of use in the control of gastrointestinal helminths of small ruminants, since it contributes to the animal health improvement, specifically in the fight against infectious and inflammatory processes.

**Keywords:** Phenolic acids. *Haemonchus contortus*. Gastrointestinal verminosis.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O uso frequente de anti-helmínticos químicos é a forma mais usual de controle de nematoides gastrointestinais em pequenos ruminantes, no entanto, mecanismos de seleção por parte dos helmintos, tornando-os resistentes aos produtos químicos utilizados em massa, vem inviabilizando sua utilização (PAPADOPOULOS, 2008; CEZAR et al., 2010).

Novos produtos vêm sendo lançados no mercado agroveterinário, dentre os mais recentes, anti-helmíntico de amplo espectro, o monepantel é utilizado em inúmeras regiões do Brasil e do mundo. Pertencente a classe de derivados de amino-acetonitrilo (ADDs) o produto apresenta elevada eficácia em grande parte das propriedades utilizadas, no entanto, problemas como elevado custo, ocorrência de resíduos em alimentos e grande risco de poluição ambiental inviabilizam sua utilização (MELO et al., 2003; STARLING, 2015).

Tendo em vista a gama de produtos químicos com atuação diminuída sobre os helmintos gastrointestinais, a busca por produtos naturais, que não ocasionem mecanismos de resistência, sejam seguros e não contaminem o meio ambiente é cada vez maior. Dentre estes, a própolis surge como alternativa para os produtos de origem natural. Produzida pelas abelhas, é um material complexo, de caráter resinoso e balsâmico, que quando misturado a secreções salivares é utilizado para proteger a colônia contra a proliferação de microrganismos indesejáveis (BEZERRA et al., 2015).

De atuação comprovada na medicina humana, a própolis possui propriedades antibacteriana, antiviral, antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, anti-helmíntica, dentre outras (VIUDA-MARTOS et al., 2008; HEINZEN et al., 2012; WAGH, 2013). Na produção animal vem apresentando efeitos positivos sobre a nutrição animal e qualidade da carne produzida (OZTURK et al., 2010; ZAWADZKI et al., 2011; ÍTAVO et al., 2011).

Estima-se que a própolis possua mais de 200 compostos químicos (COELHO et al., 2010), os quais variam conforme a flora utilizada para sua produção e características geográficas do local de produção/coleta. Dentre estes, os principais grupos são os flavonoides e ácidos fenólicos (TORETI et al., 2013). Estudos comprovam que ambos apresentam atividade anti-helmíntica, principalmente por compostos derivados como os taninos, classe de polifenóis de atuação direta e indireta sobre os helmintos.

Acometidos por espécies de helmintos equivalentes, ovinos e caprinos apresentam inúmeras particularidades, a exemplo de diferenças fisiológicas e imunológicas a serem avaliadas durante um processo de infecção por nematoides gastrointestinais (LOPES; COSTA JÚNIOR, 2015). Caprinos possuem capacidade em metabolizar compostos de forma mais rápida que os ovinos, necessitando assim um intervalo menor de exposição do parasita-alvo ao composto avaliado (SANGSTER et al., 1991; HENNESSY et al., 1993; LESPINE et al., 2012). Além disso, o sistema imune destes animais é menos eficiente em combater qualquer infecção, tornando os animais mais susceptíveis aos parasitos (HUNTLEY et al., 1995; LIGHTBODY et al., 2001; HOSTE et al., 2010).

A fim de obter resultados positivos no controle de helmintos gastrointestinais, recomenda-se a utilização de estratégias alternativas em conjunto com o controle usual adotado. Ao realizar métodos que propiciem um controle integrado, a taxa de seleção para resistência pode ser diminuída (BRICARELLO, 2015). Técnicas simples como o método Famacha, exame de ovos por grama de fezes (OPG), coproculturas, testes de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) e avaliações hematológicas dos animais permitem conhecer a real contaminação e auxiliar no controle do parasitismo.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da própolis verde liofilizada sobre a verminose gastrointestinal de caprinos em comparação com o anti-helmíntico químico monepantel.



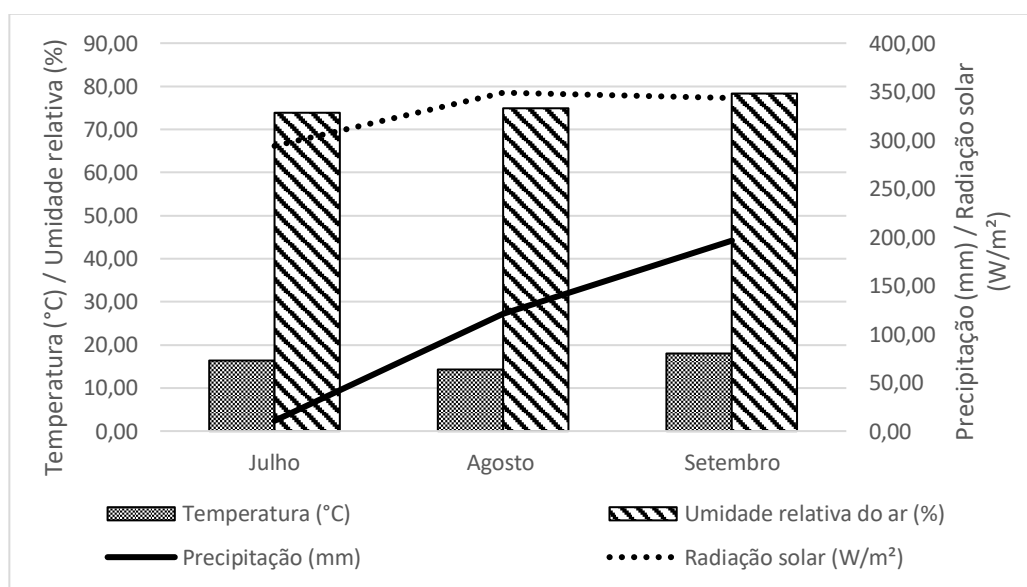
## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Animais

Todos os procedimentos adotados no experimento foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, registrado com número de protocolo 2017-024 (Anexo 1).

A fim de realizar avaliações *in vivo* sobre a utilização da própolis verde, foram utilizados caprinos, fêmeas da raça Boer, com idade média de 741 dias  $\pm$  13,86 dias. Os animais fazem parte do rebanho experimental do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, polo regional de Pato Branco-PR, localizado a uma latitude S de 26° 07' e longitude W de 52° 39', com altitude média de 700m. O clima da região é do tipo Cfa, subtropical úmido, segundo a classificação de Köppen (MORENO, 1961).

O regime pluviométrico, umidade relativa do ar, radiação solar, e média das temperaturas (mínima, média e máxima) durante o período experimental (meses de julho, agosto e setembro de 2018) foram fornecidos pelo Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR), a partir de coleta de dados de estação meteorológica localizada no município de Pato Branco-PR (Figura 9).



**Figura 9** - Dados meteorológicos determinados durante o período experimental *in vivo* de julho a setembro de 2018. Fonte: SIMEPAR, 2018.

Ao total, foram utilizados 33 animais divididos em três grupos experimentais, sendo eles: T1 – recebendo apenas glicerina bidestilada líquida na dose de 12

mL/animal. O grupo T2 – própolis, que recebeu própolis liofilizada na proporção de 0,3 gramas/kg peso vivo (PV) animal, em solução com 12 mL de glicerina bidestilada líquida e o grupo T3 - anti-helmíntico químico (monepantel) (NOVARTIS®, 2,5%), fornecido conforme dosagem recomendada na bula – 0,1 mL/kg PV animal, fornecidos no dia 01 do período experimental, em dose única. A contenção dos animais foi manual para fornecimento via oral dos produtos. O período experimental teve duração de 60 dias.

Os animais foram divididos nos respectivos grupos de acordo com seu valor de OPG, peso (kg) e idade (dias), de forma homogênea. Animais com valores de Famacha superior a quatro não foram incluídos, a fim de evitar a perda de qualquer animal durante o período experimental. Condições como peso corporal (kg) e escore de condição corporal (ECC) foram avaliados no início e no final do período experimental. A análise de ECC foi realizada conforme Russel et al. (1966) por meio de palpação lombar, estabelecendo notas com intervalos de 0,25, entre 1,00 (magro) e 5,00 (obeso).

Durante todo o período experimental os animais tiveram acesso a pastagem (Tifton (*Cynodon spp.*) e Estrela-africana (*Cynodon nlemfuensis*)) e receberam suplementação de concentrado composto por farelo de soja, milho moído e suplemento mineral (1% PV), além de silagem de milho (0,5% PV) e água. O manejo foi realizado da seguinte forma: pela manhã os animais recebiam a alimentação (8:00 horas) e tinham acesso a pastagem, no final da tarde (17:00 horas) eram recolhidos para pernoitarem em aprisco.

Para determinação da composição bromatológica dos alimentos fornecidos aos animais, amostras coletadas em ambos dias de coleta foram pré-secas em estufa de circulação de ar forçada (55°C) por 72 horas e posteriormente moídas em moinho tipo “Willey” com peneira de crivo de um milímetro e submetidas as análises para caracterização do produto *in natura*. Foram realizadas a determinação da matéria seca (MS – método 934.01), cinzas (MM – método 938.08) e proteína bruta (PB – método 981.10) segundo AOAC (2000). A determinação da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foi realizada segundo Van Soest et al. (1991). A digestibilidade *in situ* da matéria seca (MS) foi determinada conforme Mehrez; Orskov (1979), segundo adaptações de Nocek (1988). O teor de matéria orgânica (MO) foi calculado de acordo com a equação:  $MO (\%) = 100 - \% MM$ . A composição

bromatológica da dieta foi expressa como média dos valores de ambas coletas e pode ser observada na tabela 5.

**Tabela 5** - Composição química e digestibilidade *in vivo* dos ingredientes da dieta fornecida aos animais durante o período experimental.

Variáveis (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Pastagem <sup>1</sup>	Silagem de milho	Concentrado <sup>1</sup>
Matéria seca	237,80	321,10	859,40
Matéria orgânica	925,00	950,50	930,60
Matéria mineral	75,00	49,50	69,40
Proteína bruta	151,00	82,90	153,50
Fibra detergente neutro	746,50	448,80	153,30
Fibra detergente ácido	269,80	334,10	90,60
Digestibilidade <i>in situ</i>	541,60	539,90	840,70

<sup>1</sup>Pastagem consorciada de Tifton (*Cynodon* spp.) e Estrela-africana (*Cynodon nlemfuensis*).

<sup>2</sup>Concentrado composto por farelo de soja, milho moído e suplemento mineral.

#### 4.2.2 Própolis verde liofilizada

A própolis verde fornecida aos animais possuía as mesmas características daquela utilizada nos testes *in vitro*. Após processo de extração, a mesma foi liofilizada (ver tópico 2.2.2) e posteriormente fornecida aos animais na quantidade de 0,3 gramas/kg PV animal conforme testes anteriores realizados por Morsy et al. (2016). A partir da análise da composição química da própolis verde fornecida aos animais, constatou-se que a quantidade média de fenólicos presente em 03 gramas de própolis verde liofilizada fornecida a cada um dos animais do tratamento T2 foi de 1.156,35 mg.

A fim de facilitar o fornecimento e dissolução da própolis, foi utilizada glicerina bidestilada líquida. Muito utilizada como solvente na indústria farmacêutica, a glicerina pode ser utilizada para diluir qualquer outra substância no preparo de uma solução (ABRANTES, 2015). Conhecida comercialmente como glicerina, o glicerol (1,2,3 propanotriol) tem como características ser inodoro, higroscópico, viscoso e de sabor adocicado (VERUSSA et al., 2016).

#### 4.2.3 Avaliação da conjuntiva ocular – método Famacha®

Com o objetivo de detectar anemia clínica ocasionada pela presença de helmintos da espécie *Haemonchus contortus* nos animais dos diferentes tratamentos avaliados, realizou-se a verificação da conjuntiva ocular dos mesmos, por meio da técnica conhecida por Famacha (BATH; MALAN; VAN WYK, 1996). Cada animal foi contido de forma individual e a conjuntiva ocular exposta por meio da realização de

pressão na pálpebra superior com um dedo polegar, abaixando a pálpebra inferior com o polegar da outra mão (CHAGAS et al., 2007). Avaliações da mucosa ocular foram realizadas nos dias 01, 07, 14, 30 e 60 do período experimental.

A partir da observação da mucosa, cinco diferentes graus de coloração podem ser atribuídos como nota, estes, sugerem ou não a aplicação de anti-helmínticos nos animais quando o método Famacha for adotado como forma de controle (Tabela 6).

**Tabela 6** - Relação do grau Famacha com a coloração da conjuntiva ocular e o valor de hematócrito.

Grau Famacha	Coloração	Hematócrito (%)	Atitude clínica
1	vermelho robusto	>27	não tratar
2	vermelho rosado	23-27	não tratar
3	Rosa	18-22	Tratar/não tratar
4	rosa pálido	13-17	Tratar
5	Branco	<13	Tratar

Fonte: Adaptado de Molento; Severo (2004).

#### 4.2.4 Exames parasitológicos e coproculturas

Para a análise de ovos por grama de fezes (OPG), amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal de cada um dos animais e encaminhadas para análise e cálculo de OPG conforme metodologia de Gordon; Whitlock (1939). Foram realizadas coletas nos dias 01, 07, 14, 30 e 60 do período experimental.

Foram identificados e contabilizados ovos do tipo *Strongyloidea*, reportando-se assim à infecções por helmintos dos gêneros *Haemonchus* sp., *Trichostrongylus* sp., *Ostertagia* sp., *Bunostomum* sp., *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* sp.. A fim de garantir a viabilidade dos ovos, todas as análises foram feitas no mesmo dia, após a coleta.

Para a análise de coprocultura, um *pool* de fezes (aproximadamente 50 gramas) foi misturado a uma porção de vermiculita expandida e cultivada em B.O.D. por um período de sete dias (27°C e 70% UR) conforme Roberts; O'Sullivan (1950). Foram coletadas amostras e preparadas coproculturas dos dias experimentais: 01, 07, 14, 30 e 60, sendo uma amostra por tratamento avaliado. As larvas foram identificadas e contabilizadas até 100 indivíduos ou em sua totalidade caso a amostra apresentasse população menor que essa (DICKMANS; ANDREWS, 1933; KEITH, 1953).

#### 4.2.5 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF)

Com o objetivo de verificar a eficácia de ambos os produtos avaliados, realizou-se o teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF). Coletas de material

fecal foram realizadas no dia da aplicação dos tratamentos anti-helmíntico químico e extrato de própolis verde e outra após um intervalo de 14 dias. Foram utilizadas as médias de OPG de cada animal de ambos os grupos avaliados na coleta 14 dias após aplicação, bem como os gêneros de helmintos encontrados para cada tratamento e seus percentuais (CHAGAS; NICIURA; MOLENTO, 2011).

O cálculo da eficácia do extrato de própolis verde e monepantel em relação ao grupo que recebeu glicerina foi realizado com auxílio do software RESO 2.0 (WURSTHORN; MARTIN, 1990).

#### 4.2.6 Hemograma e perfil bioquímico

Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular em tubos a vácuo com e sem anticoagulante (EDTA) de cinco animais por tratamento. Os animais foram contidos de forma individual, e as coletas realizadas na parte da manhã a fim de diminuir possíveis erros de amostragem. Foram realizadas coletas nos dias experimentais 01, 07, 14, 30 e 60.

O hemograma foi realizado em no máximo quatro horas após a coleta, com confecção da distensão sanguínea corada com corante hematológico rápido do tipo Romanowsky (Panótico Rápido LB - Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil) para posterior contagem diferencial de leucócitos e avaliação morfológica das células em microscópio óptico (Olympus® CX 21). A contagem do número de hemácias, leucócitos, hemoglobina, o RDW-CV (Red Cell Distribution Width) foram analisados no contador automático de células (Bio - 2900 Vet - Bioeasy Diagnostical).

O hematócrito foi determinado pela técnica do microhematócrito após a centrifugação do sangue em capilar de microhematócrito por 15 minutos a 12.000 rpm (Centrífuga hematócrito - Nova Instrument, Piracicaba, Brasil). Também foram realizados os cálculos dos índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM) e determinação da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

A determinação da proteína plasmática total (PPT) foi realizada por refratometria (Hand Held Refractometer, Stanley®, Inglaterra), após a centrifugação do sangue em capilar de microhematócrito. O fibrinogênio foi determinado pelo método indireto de precipitação pelo calor (56°C) e a leitura realizada por refratometria.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático (Bio2000®, Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda, Barueri-SP, Brasil),

utilizando kits comerciais (Labtest®, Lagoa Santa-MG, Brasil) e soro controle universal (Qualitrol 1H®, Labtest), conforme orientação do fabricante.

As concentrações séricas de glicose foram determinadas segundo o método cinético de GOD-Trinder (Glicose Liquiform®, Labtest); de ureia pelo método enzimático – UV (Ureia UV Liquiform®, Labtest); de albumina pelo método Verde de Bromocresol (Albumina®, Labtest) e das proteínas totais pelo método Biureto (Proteína Total®, Labtest). As concentrações de globulinas foram calculadas (*globulinas = proteínas totais – albumina*).

Foram determinadas as atividades enzimáticas séricas das enzimas aspartato aminotransferase por metodologia Cinética UV - IFCC (AST/GOT Liquiform®, Labtest); fosfatase alcalina pelo método de Bowers e Mc Comb modificado (Fosfatase Alcalina Liquiform®, Labtest) e gama glutamiltransferase pelo método Szasz modificado (Gama GT Liquiform®, Labtest). Todas as análises foram realizadas segundo as técnicas de Hendrix (2006).

Os valores de referência para diferentes variáveis sanguíneas encontram-se nas tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** - Valores de referência para eritrograma e leucograma de caprinos, segundo diferentes autores.

Parâmetros	Valores de referência	
	PUGH (2004)	WEISS; WARDROP (2010)
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> )	8,0-17,0	8,0-18,0
Hemoglobina (g/dL)	8,0-12,0	8,0-12,0
Hematócrito (%)	22-36	22-38
CHCM (%)	29-35	30-36
VCM (fL)	15-26	16-25
RDW (%)	SRL	SRL
Leucócitos totais (/μL)	4.000-13.000	4.000-13.000
Neutrófilo (/μL)	1.400-8.000	1.000-7.200
Linfócito (/μL)	2.000-9.000	2.000-9.000
Eosinófilo (/μL)	0-900	50-650
Monócito (/μL)	0-500	0-550
Basófilo (/μL)	0-100	0-120
PPT (g/dL)	6,0-7,5	6,0-7,5
Fibrinogênio (mg/dL)	100-500	100-400

CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média. VCM – volume corpuscular médio. RDW - amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos. SRL – sem referência na literatura.

**Tabela 8** - Valores de referência para parâmetros bioquímicos de caprinos, conforme literatura.

Parâmetros	Valores de referência
	KANEKO et al. (2008)
AST (U/L)	167-513
GGT (U/L)	20-56
Ureia (mg/dL)	60-120
FA (U/L)	93-387
Proteínas totais (g/dL)	6,4-7,0
Albumina (g/dL)	2,4-3,0
Globulina (g/dL)	2,7-4,1
Glicose (mg/dL)	50-75

PPT – proteína plasmática total. AST – aspartato aminotransferase. GGT – gamaglutamiltransferase. FA – fosfatase alcalina.

#### 4.2.7 Análise estatística

Para as variáveis ovos por grama de fezes (OPG) e Famacha o delineamento utilizado foi um teste fatorial 3x4 (três grupos e quatro períodos de coleta). Enquanto que para as variáveis hematológicas o delineamento utilizado foi um teste fatorial 3x5 (três grupos e cinco períodos de coleta).

Os dados foram submetidos à análise ANOVA realizada pelo PROC GLM do SAS e os valores que apresentaram diferença significativa, comparados pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A normalidade dos dados foi verificada pelo PROC Univariate e quando a distribuição não foi normal, submetidos a transformação  $\log_{10}(x+1)$  (SAS Institute Inc., Cary, NC, versão 9.3).

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais avaliados apresentaram peso (kg) e valores de ECC semelhantes, conforme tabelas 9 e 10. Dessa forma, pode-se concluir que a dosagem utilizada de ambos produtos avaliados não apresentou efeitos sobre tais características dos animais.

**Tabela 9** - Pesos iniciais e finais (kg) médios seguidos por valores de mediana, mínimo e máximo dos tratamentos avaliados durante todo o período experimental.

Variável	Tratamentos		
	Glicerina	Extrato de própolis verde	Monepantel
Peso inicial médio (kg) (0 dias)	51,30	53,80	50,40
Mediana	51,00	55,00	49,00
Mínimo	40,00	36,00	38,00
Máximo	67,00	81,00	63,00
Peso final médio (kg) (60 dias)	63,80	65,60	64,10
Mediana	66,20	67,00	63,30
Mínimo	45,30	46,20	48,70
Máximo	81,30	94,30	82,00

**Tabela 10** - Escores de condição corporal (ECC) médios seguidos por valores de mediana, mínimo e máximo dos tratamentos avaliados durante todo o período experimental.

Variável	Tratamentos		
	Glicerina	Extrato de própolis verde	Monepantel
ECC inicial (0 dias)	3,18	3,50	3,39
Mediana	3,50	3,50	3,50
Mínimo	2,50	3,00	2,50
Máximo	3,75	4,00	4,00
ECC final (60 dias)	3,57	3,89	3,84
Mediana	3,75	4,00	4,00
Mínimo	1,50	2,25	3,00
Máximo	4,75	4,75	4,50

#### 4.3.1 Avaliações de contaminação e resistência anti-helmíntica

De acordo com as médias apresentadas na tabela 11, os animais tratados com extrato de própolis verde apresentaram valor de Famacha maior em relação àqueles que receberam monepantel, não diferindo do tratamento com glicerina.

**Tabela 11** - Média valores de Famacha  $\pm$  erro padrão da média (EPM) nos diferentes grupos avaliados.

Variável	Tratamentos		
	Glicerina	Extrato de própolis verde	Monepantel
Famacha	2,75 $\pm$ 0,06 ab	2,85 $\pm$ 0,07 b	2,60 $\pm$ 0,06 a

Médias seguidas por letras minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O método Famacha é classificado como um tratamento seletivo e/ou estratégico, tendo a necessidade da aplicação de anti-helmínticos em apenas em alguns animais do rebanho (VIEIRA et al., 2008). Muito utilizado como forma de acompanhamento do grau de contaminação dos animais, o método Famacha é aplicável apenas em populações de helmintos hematófagos, a exemplo do *Haemonchus contortus* (VAN WYK et al., 1997). Por esse motivo, recomenda-se sua utilização em conjunto com



outras técnicas de acompanhamento da infecção anti-helmíntica, a exemplo do OPG, coproculturas e avaliações de parâmetros sanguíneos.

Mesmo apresentando diferença significativa entre os tratamentos, nenhum dos grupos avaliados apresentou valores de Famacha fora do intervalo considerado como sem necessidade de tratamento.

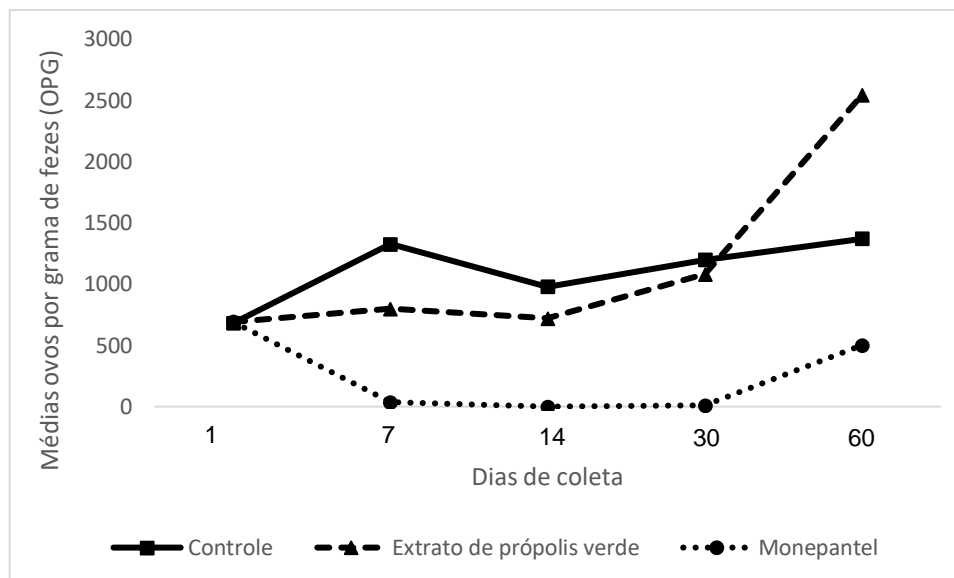
As médias dos valores de OPG para ambos os tratamentos avaliados encontram-se na tabela 12.

**Tabela 12** - Média ovos por grama de fezes (OPG)  $\pm$  erro padrão da média (EPM) nos diferentes grupos avaliados e dias de coleta.

Dias de coleta	Tratamentos		
	Glicerina	Extrato de própolis verde	Monepantel
Dia 07	1.327,27 $\pm$ 354,73 Aa	800,00 $\pm$ 208,89 Aa	36,36 $\pm$ 27,87 Bb
Dia 14	980,00 $\pm$ 456,75 Aa	720,00 $\pm$ 234,66 Aa	0,00 $\pm$ 0,00 Bb
Dia 30	1.200,00 $\pm$ 381,86 Aa	1.081,82 $\pm$ 426,36 Aa	9,09 $\pm$ 9,09 Bb
Dia 60	1.370,00 $\pm$ 863,85 Aa	2.545,45 $\pm$ 925,63 Aa	500,00 $\pm$ 161,25 Aa

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna e médias seguidas por letras minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O grupo que recebeu anti-helmíntico monepantel apresentou menor média de OPG em relação aos animais que receberam própolis e glicerina nas coletas aos 07, 14 e 30 dias. A média de OPG dos animais do grupo que recebeu glicerina e extrato de própolis verde não diferiram entre os dias de coleta. O valor de OPG dos animais tratados com monepantel apresentou-se maior na coleta do dia 60 em relação as demais coletas (Figura 10).



**Figura 10** - Comportamento das médias de ovos por grama de fezes (OPG) dos tratamentos avaliados durante as coletas experimentais. Nota: no dia considerado D1, os grupos experimentais apresentaram OPG média de 687,88.

O comportamento das médias de OPG sugerem que os produtos avaliados apresentaram eficácia até pelo menos o 30º dia avaliado. O produto químico monepantel foi capaz de controlar a infecção anti-helmíntica de forma mais eficiente que o extrato de própolis verde, representado pelas baixas médias de OPG.

A interpretação da contagem de OPG pode ser realizada pela comparação dos valores encontrados no exame com classificações da literatura científica. A infecção é usualmente denominada como mista ou então analisada de acordo com o gênero de helminto específico que acomete os animais. Um exame de OPG de 1.000, se tratando de infecção mista, é de grau moderada, enquanto que o dobro deste já categoriza a infecção como intensa. (UENO; GONÇALVES, 1988).

Com o objetivo de determinar qual o percentual de redução de OPG dos produtos analisados, extrato de própolis verde e monepantel, realizou-se o TRCOF. Estes, apresentaram percentuais de redução de -86% e 64%, respectivamente (Tabela 13). Para ser considerado como eficiente, o produto avaliado deve apresentar percentual de 95% de redução, demonstrando assim sua eficácia na redução da carga anti-helmíntica (FORTES; MOLENTO, 2013).

**Tabela 13** - Percentual de redução de OPG (R%) de ambos produtos avaliados e intervalo de confiança (IC) após tratamento anti-helmíntico.

Tratamentos	R%	IC
Extrato de própolis verde (3 g/10 kg PV)	-86,00	0,53
Monepantel (1 mL/10 kg PV)	64,00	0,50

Nota: valores calculados com auxílio do Software RESO 2.01.

Assim, ambos produtos não apresentaram eficácia, sendo o extrato de própolis verde de percentual de redução menor que o monepantel. Todavia, inúmeros fatores devem ser avaliados em conjunto com os resultados apresentados neste teste para a tomada de qualquer decisão. O teste de contagem de OPG é uma avaliação fenotípica, e seu resultado é diretamente dependente do efeito do hospedeiro. Como resposta, têm-se a postura dos ovos das fêmeas que por sua vez depende do efeito da resposta imune do hospedeiro (FORTES; MOLENTO, 2013).

Conforme Ueno; Gonçalves (1998) a contagem de OPG não representa uma infecção real, isso porque em casos de verminose grave a infecção é ocasionada principalmente por formas imaturas de larvas, que ainda não produziram ovos. Assim, um valor elevado de OPG possivelmente pode indicar um elevado número de helmintos, mas OPG baixo não indica que o número de parasitos gastrointestinais no animal seja baixo. Dessa forma, mesmo que o produto avaliado não tenha apresentado efeito positivo na diminuição de OPG, este deve ser analisado aliado a demais alternativas de avaliação, a exemplo de parâmetros sanguíneos que possam indicar alterações no sistema imunológico dos animais.

Alguns trabalhos sugerem que o TRCOF apresenta resultados confiáveis quando utilizado em populações de helmintos que já apresentem pelo menos 25% da população total resistente (MARTIN et al., 1989). Para que ovos e larvas apresentem tal comportamento, o anti-helmíntico em questão já deve ter sido submetido aos mesmos, preferencialmente em quantidades relevantes, o que não foi evidenciado nos animais estudados, já que a contaminação inicial dos mesmos era relativamente baixa (Figura 8). No entanto, os grupos foram distribuídos de forma homogênea conforme recomendado por Niciura et al. (2009), evitando assim a indução de resultados errôneos.

Alguns produtos avaliados, especialmente drogas sintéticas, podem ocasionar uma supressão temporária na postura de ovos pelas fêmeas de helmintos,

superestimando a eficácia do produto em questão. Por este motivo, o período para coleta de material fecal ao testar mais de um produto com característica anti-helmíntica varia entre 10 e 14 dias.

Uma vez que o exame de OPG pode ter difícil interpretação e não permita a diferenciação morfológica de todos os ovos presentes nas fezes no TRCOF, recomenda-se a realização de coproculturas das amostras de ambos os grupos, a fim de ampliar o grau de conhecimento da real situação da infecção helmíntica (FORTES; MOLENTO, 2013).

Em todos os tratamentos avaliados, incluindo o grupo que recebeu glicerina, o gênero de helminto mais prevalente foi o *H. contortus*. Os grupos tratados com monepantel e glicerina apresentaram populações relativamente pequenas de helmintos do gênero *Strongyloides papillosus*, em comparação ao tratamento com extrato de própolis verde que apresentou número maior desses indivíduos. *Trichostrongylus* sp. foram observados em proporções iguais em todos os grupos avaliados (Tabela 14).

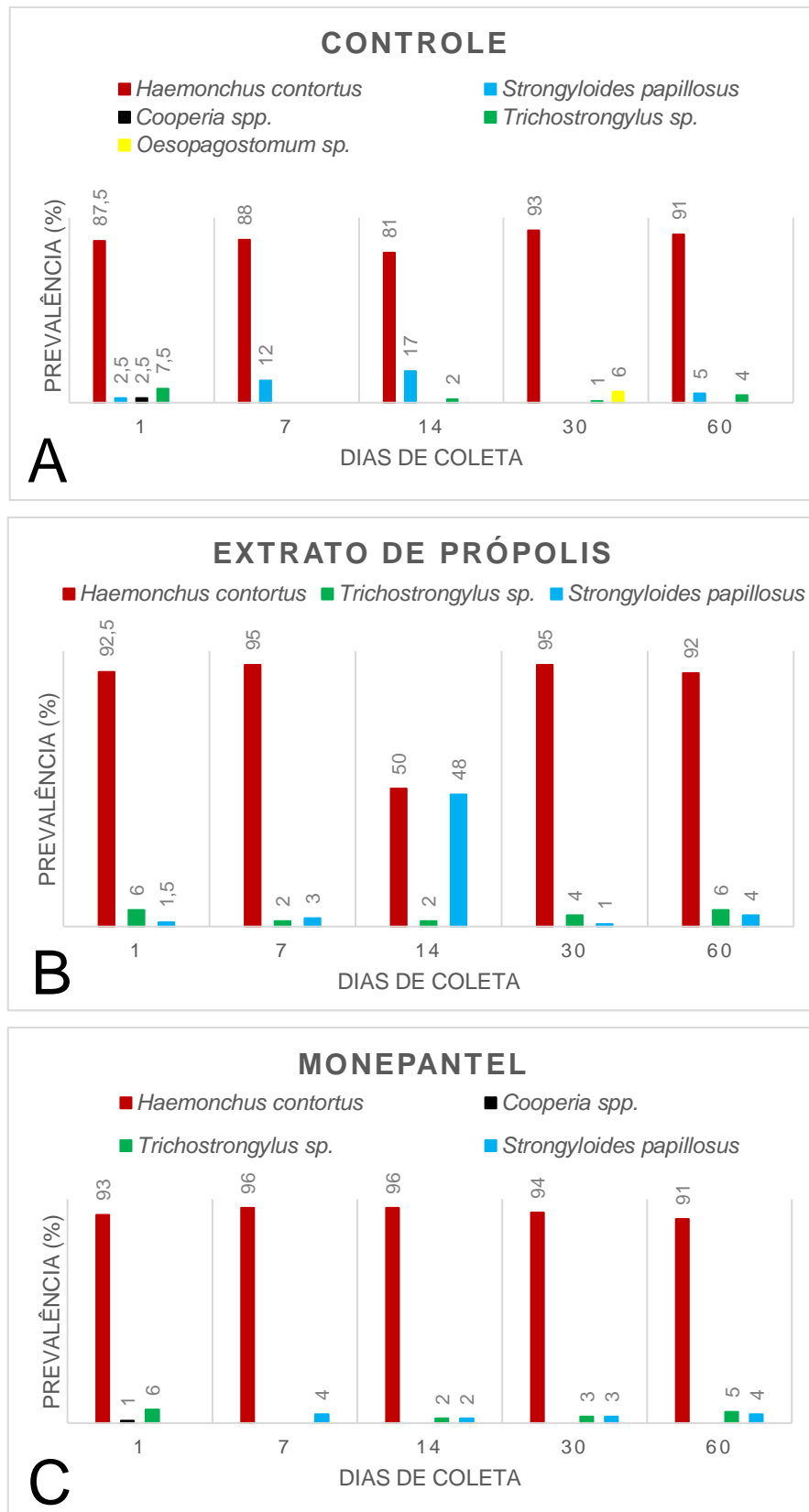
**Tabela 14** - Percentual do número total de larvas de helmintos identificados nas coproculturas de ambos os produtos avaliados após tratamento anti-helmíntico, por gênero de helminto.

Gênero	Percentagem do número total de larvas (L3)		
	Glicerina	Extrato de própolis verde	Monepantel
<i>Haemonchus contortus</i>	81,0% <sup>1</sup>	50,0% <sup>1</sup>	96,0% <sup>1</sup>
<i>Trichostrongylus</i> sp.	2,0% <sup>1</sup>	2,0% <sup>1</sup>	2,0% <sup>1</sup>
<i>Strongyloides papillosus</i>	17,0% <sup>1</sup>	48,0% <sup>1</sup>	2,0% <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Resistência. <sup>2</sup>Baixa resistência. <sup>3</sup>Susceptível.

Nota: valores calculados com auxílio do Software RESO 2.01.

Presume-se que a discrepância dos percentuais de larvas de helmintos encontrados em ambos os tratamentos seja resultado da ação dos produtos fornecidos aos mesmos, indicando assim que extrato de própolis verde teve efeito sobre helmintos do gênero *Haemonchus contortus* em determinado momento do período experimental, diminuindo o número de indivíduos em relação às demais espécies, por exemplo. No entanto, as diferentes condições nas culturas de larvas produzidas podem favorecer o desenvolvimento de determinada espécie em detrimento de outras (PRESIDENTE, 1985), mesmo que os procedimentos laboratoriais adotados tenham sido idênticos em ambas as repetições (Figura 11).



**Figura 11** - População de larvas (L3) de cada um dos grupos avaliados, nos diferentes dias experimentais (01, 07, 14, 30 e 60). A – Tratamento com glicerina; B – Tratamento extrato de própolis verde (0,3g/kg PV); C – Tratamento anti-helmíntico químico – monepantel (0,1 mL/kg PV). Nota: As coproculturas foram realizadas com amostras do grupo avaliado, sendo uma amostra por grupo.

Para que o TRCOF seja aceito com confiabilidade dos resultados, a correlação entre os valores de OPG e a carga parasitária real do animal não deve apresentar muitas variações (FORTES; MOLENTO, 2013). Alguns estudos sugerem que espécies de helmintos como o *H. contortus* apresentam boas correlações (ROBERTS; SWAN 1981, CHAGAS et al., 2013), no entanto para *T. colubriformis* (SANGSTER et al., 1979), *Ostertagia circumcincta* e *Nematodirus* spp. (MARTIN et al., 1985) são classificadas como ruins. *T. axei* apresenta uma postura de ovos muito baixa, dessa forma, sua sensibilidade para o teste também é baixa (PALCY et al., 2010).

Martins (2016) trabalhando com ovinos acometidos por *H. contortus* relatam diminuição na contagem de OPG a partir do segundo dia após a aplicação do tratamento (monepantel), no entanto, apresentando eficácia máxima de 24,65%, inexpressiva para ser considerado como eficiente no controle. Tais resultados são decorrência de aplicações massivas do produto, realizadas uma vez a cada 60 dias, em um período máximo de um ano. Neste caso, a população de helmintos possivelmente desenvolveu resistência ao químico monepantel.

Mederos; Ramos; Bancho (2014) avaliaram o comportamento da infecção helmíntica de duas fazendas criadoras de ovinos no Uruguai. Ambas utilizavam como anti-helmíntico químico o monepantel. Como técnicas que visam auxiliar no conhecimento dos animais que necessitavam da aplicação do químico, uma das fazendas utilizava a técnica Famacha e a outra, OPG. Ambas as propriedades realizaram o mesmo manejo durante um período de pelo menos três anos. A fazenda que utilizou Famacha observou um percentual de 42% de eficácia do monepantel, enquanto que aquela que realizava OPG não apresentou eficácia significativa, o que pode sugerir mecanismos de resistência pelos helmintos ao grupo químico utilizado, ou ainda ineficácia na realização da técnica. Sobre a população de helmintos gastrointestinais, os gêneros prevalentes nas duas fazendas foram: *Haemonchus* sp., *Trichostrongylus* sp. e *Oesophagostomum* sp.. O percentual de *Haemonchus* sp. apresentou aumento nas duas fazendas, enquanto que as demais espécies diminuíram significativamente.

A utilização da própolis no controle da verminose gastrointestinal de ruminantes e diferentes parasitas de outras espécies animais já vem sendo estudada a determinado tempo, os resultados de diferentes abordagens são descritos por diferentes autores, conforme citados abaixo. Seja administrado na forma liofilizada, *in natura* ou em extrato alcóolico, a própolis apresenta potencialidade de utilização.

Hollands et al. (1984) e Hollands et al. (1988) registraram a utilização de extrato alcóolico de própolis na concentração de 95% para controle de *Eimeria* sp. em coelhos, verificando a redução do número de oocistos nos animais tratados com o produto quando comparados aos que receberam sulfa durante o período experimental. Resultados semelhantes são descritos por Moura et al. (1998) aonde o fornecimento de solução hidroalcóolica de própolis foi mais eficiente que a utilização de robenidina no controle de oocistos em coelhos Nova Zelândia, diminuindo linearmente o número de OPG encontrado nas fezes dos animais.

Resultados positivos também são descritos para controle de parasitas gastrointestinais em bovinos. Heinzen et al. (2012) avaliou o efeito do fornecimento de extrato alcóolico de própolis (30%) para bezerros na quantidade de 10 mL/animal a cada oito horas durante quatro dias consecutivos. Quase que a totalidade dos animais (83%) tratados com própolis apresentaram uma diminuição na contaminação de aproximadamente 48%, sendo os principais gêneros de helmintos identificados *Trichostrongylus* sp. e *Strongyloides* sp..

Principal et al. (2002) obteve diminuição da OPG de ovinos West African tratados com extrato alcóolico de própolis (3%) na quantidade de 10 mL/animal, fornecido em duas doses iguais (dias consecutivos). Redução no valor de OPG de ovinos Santa Inês também foi evidenciado por Castagnara et al. (2007) fornecendo solução alcóolica de própolis (96°GL) na concentração de 30% em dose única (10 mL/animal). Após 21 dias do fornecimento foi alcançada eficácia de 94% e após 42 dias, 96%, ambas para o extrato de própolis.

Efeito antiparasitário e potencialidade de utilização no controle da verminose também são descritos por Loureiro (2007). Cordeiros Ile de France (em média 5 kg PV) recebendo 30 mg de extrato de própolis (11%) incorporado ao concentrado, fornecido diariamente até o desmame dos animais (15 kg PV) apresentaram redução do valor de OPG quando comparados ao tratamento com glicerina.

Morsy el al. (2013) obtiveram controle do valor de OPG em ovinos tratados com própolis vermelha na quantidade de 3g/animal/dia durante 21 dias consecutivos. Ao final do período experimental, a média de OPG encontrada para o grupo que recebeu própolis foi de 200, enquanto que para o tratamento com glicerina foi 600. Ambos os grupos iniciaram as avaliações experimentais com OPG variando entre 100 e 200.

Diminuições nos valores de OPG e contagem de larvas foram observados por Linécio (2013) fornecendo extrato alcóolico de própolis (70%) para ovinos Santa Inês.

O autor observou diminuições significativas na contaminação dos animais e na contagem de larvas dos gêneros *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp. quando oferecendo doses únicas de 5 e 10 mL do extrato alcóolico aos animais.

Nenhum dos autores citados acima determinou qual a quantidade de fenólicos presente na própolis fornecida aos animais, dessa forma, a padronização e consequente reprodução dos estudos torna-se inviável, seja pela ampla e diversificada composição química da própolis como produto, ou ainda pela diversidade entre os tipos encontrados no mercado – escura (marrom), vermelha e verde.

Uma efetiva aplicação terapêutica depende do controle de qualidade realizado no momento da padronização de diferentes amostras de própolis (PARK et al., 2002). Determinados componentes ocorrem somente em amostras produzidas a partir de uma flora específica (VARGAS et al., 2004), o que ocasiona elevada variação na composição química e dificulta a padronização do tipo e concentração dos compostos (TRUSHEVA et al., 2006).

Uma vez conhecido o potencial anti-helmíntico dos compostos classificados como ácidos fenólicos presentes na própolis, a mesma apresenta elevado potencial de utilização no controle integrado de helmintos gastrointestinais. Classificada como fitoterápico, é sustentável, biodegradável e apresenta possibilidade de utilização pela biodiversidade da flora existente. Além disso, demonstra capacidade em diminuir a intensidade de utilização de anti-helmínticos convencionais, estendendo a vida útil dos produtos químicos e diminuindo a eliminação de resíduos químicos no meio ambiente (CHAGAS, 2004; TIRABASSI et al., 2013).

#### 4.3.2 Contaminação por helmintos e sua relação com padrões hematológicos

Os efeitos da própolis verde sobre os parâmetros hematológicos de caprinos podem ser observados nas tabelas 15 e 16. As variáveis listadas na tabela 15 apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para os diferentes tratamentos avaliados. Na tabela 16 encontram-se os resultados das variáveis que apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas para os dias de coleta. Não houve interação entre os diferentes dias de coleta e os grupos avaliados, para nenhuma das variáveis analisadas.



**Tabela 15** - Média valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), proteína plasmática total (PPT), leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos, relação neutrófilos/linfócitos, proteínas totais, albumina, globulina, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT)  $\pm$  erro padrão da média (EPM) nos diferentes grupos avaliados.

Variável	Tratamentos		
	Glicerina	Extrato de própolis verde	Monepantel
Hemácias ( $\times 10^6$ )	9.264 $\pm$ 0,222 b	9.312 $\pm$ 0,261 b	10.465 $\pm$ 0,243 a
Hemoglobina (g/dL)	8.196 $\pm$ 0,159	8.220 $\pm$ 0,342	8.948 $\pm$ 0,253
Hematócrito (%)	24.600 $\pm$ 0,603 b	26.280 $\pm$ 0,727 b	28.920 $\pm$ 0,726 a
VCM (fL)	26,840 $\pm$ 0,854	28,324 $\pm$ 0,574	27,828 $\pm$ 0,694
RDW (%)	21.520 $\pm$ 0,185	21.948 $\pm$ 0,295	22.076 $\pm$ 0,224
PPT (g/dL)	6,364 $\pm$ 0,201	6,412 $\pm$ 0,104	6,512 $\pm$ 0,091
Leucócitos totais	19.440 $\pm$ 696,874 a	16.352 $\pm$ 787,636 b	21.720 $\pm$ 737,518 a
Neutrófilos ( $\mu$ L)	9.836,52 $\pm$ 512,328 ab	9.057,00 $\pm$ 715,311 b	11.204,920 $\pm$ 524,619 a
Linfócitos ( $\mu$ L)	8.157,12 $\pm$ 468,288 a	6.491,20 $\pm$ 380,647 b	9.312,56 $\pm$ 509,317 a
Eosinófilos ( $\mu$ L)	966,00 $\pm$ 175,523 a	540,36 $\pm$ 132,907 b	790,44 $\pm$ 187,833 a
Monócitos ( $\mu$ L)	366,20 $\pm$ 31,308 a	282,76 $\pm$ 32,227 b	353,520 $\pm$ 35,421 ab
Basófilos ( $\mu$ L)	114,160 $\pm$ 32,045	70,680 $\pm$ 22,296	48,680 $\pm$ 23,731
Rel. neutrófilo/linfócito	1,356 $\pm$ 0,154	1,539 $\pm$ 0,146	1,300 $\pm$ 0,101
Proteínas totais (g/dL)	6,572 $\pm$ 0,270	6,680 $\pm$ 0,154	6,976 $\pm$ 0,111
Albumina (g/dL)	2,332 $\pm$ 0,113	2,452 $\pm$ 0,065	2,532 $\pm$ 0,093
Globulina (g/dL)	4,240 $\pm$ 0,216	4,228 $\pm$ 0,151	4,444 $\pm$ 0,135
FA (U/L)	180,232 $\pm$ 13,640	220,372 $\pm$ 28,926	232,364 $\pm$ 17,432
AST (U/L)	69,840 $\pm$ 3,263 b	84,200 $\pm$ 4,298 a	80,080 $\pm$ 5,761 ab
GGT (U/L)	47,412 $\pm$ 1,081 b	49,248 $\pm$ 1,536 b	54,448 $\pm$ 1,612 a

Médias seguidas por letras minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

**Tabela 16** - Média valores de monócitos, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), ureia, glicose, fibrinogênio e aspartato aminotransferase (AST)  $\pm$  erro padrão da média (EPM) nos diferentes dias de coleta.

Variável	Dias de coleta (D)				
	D01	D07	D14	D30	D60
Monócitos ( $\mu$ L)	222,733 $\pm$ 26,047 b	292,933 $\pm$ 31,335 ab	415,600 $\pm$ 42,572 a	422,667 $\pm$ 49,165 a	316,867 $\pm$ 43,371 ab
CHCM (%)	31,893 $\pm$ 0,710 b	31,320 $\pm$ 0,716 b	29,467 $\pm$ 0,527 b	32,107 $\pm$ 0,711 a	34,773 $\pm$ 1,012 a
Ureia (mg/dL)	46,333 $\pm$ 2,670 ab	41,800 $\pm$ 1,384 b	48,133 $\pm$ 1,895 ab	45,067 $\pm$ 1,446 ab	52,800 $\pm$ 2,158 a
Glicose (mg/dL)	45,613 $\pm$ 2,140 b	57,447 $\pm$ 1,960 a	57,247 $\pm$ 2,817 a	57,860 $\pm$ 2,383 a	53,913 $\pm$ 2,332 ab
Fibrinogênio (mg/dL)	313,333 $\pm$ 48,665 b	373,333 $\pm$ 54,743 ab	480,000 $\pm$ 50,897 a	386,667 $\pm$ 36,341 ab	253,333 $\pm$ 23,637 b
AST (U/L)	95,600 $\pm$ 8,687 a	68,067 $\pm$ 3,418 b	75,733 $\pm$ 3,467 ab	70,400 $\pm$ 3,454 b	80,400 $\pm$ 6,772 ab

Médias seguidas por letras minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As variáveis hemoglobina, VCM, RDW, PPT, proteínas totais, albumina, globulina e FA (Tabela 14) não apresentaram diferença significativa dentre os grupos experimentais. Destes, hemoglobina, PPT, proteínas totais e FA apresentaram-se dentro do valor de referência para a espécie avaliada.

Valores encontrados para VCM não diferiram entre os grupos avaliados, no entanto, não concordam com o valor de referência para a espécie. As médias da variável RDW não apresentaram diferença estatística entre os grupos avaliados.

A helmintose observada não foi suficiente para ocasionar processos anêmicos nos animais observados, já que os valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias mantiveram-se dentro do valor de referência para a espécie. O mecanismo de sucção de sangue pelo parasita estimulou a produção de células jovens, elevando assim os valores de VCM, o que só foi possível devido ao estado nutricional equilibrado dos animais de ambos os tratamentos avaliados.

O VCM é amplamente utilizado na classificação de processos anêmicos (GROTTO, 2009), e quando acima dos valores normais (16-25 fL) como determinados no presente trabalho, sugere um processo de anemia macrocítica (DAY et al., 2000). Diferentemente de outras variáveis, os valores normais para VCM apresentam variação entre diferentes raças (WEISS; WARDROP, 2010).

Durante a instauração de um processo anêmico, a medula óssea recebe estímulos da eritropoietina para que produza e libere quantidades maiores de células eritroides na corrente sanguínea, objetivando reestabelecer as concentrações sanguíneas de hemácias para dentro dos valores do intervalo de referência, que até então estavam menores. Esse aumento ocorre pela liberação de células eritroides mais jovens na corrente sanguínea, os reticulócitos. Estes, são de volume celular maior que uma hemácia adulta, elevando o valor de VCM quando em uma concentração significativa na corrente sanguínea, sugerindo processo de anemia macrocítica (RISTOW, 2016).

Souza et al. (2008) avaliaram parâmetros sanguíneos de caprinos de diferentes padrões raciais oriundos do semi-árido da Paraíba, encontrando valores distintos entre os mesmos. Animais Boer apresentaram VCM médio de 18,05 fL, enquanto que a mesma variável apresentou valor maior para animais das raças Kalahari (20,91 fL) e Moxotó (21,99 fL), mantidos em condições experimentais semelhantes. Avaliações relacionadas à presença de helmintos não foram realizadas, no entanto, sugere-se

que os animais apresentavam níveis de contaminação baixos, uma vez que o valor ficou classificado dentro do valor de referência.

Conforme estudos já realizados, poucos autores determinaram o valor de RDW em caprinos. Silva et al. (2017) trabalhou com caprinos da raça Saanen, no estado do Recife, encontrando teores de RDW de  $29,38 \pm 0,78\%$  em animais de recria e  $27,11 \pm 0,40\%$  para fêmeas gestantes.

Valores maiores são relatados por Min et al. (2015) trabalhando com caprinos da raça Kiko, originários da Nova Zelândia, suplementados ou não com dieta rica em taninos (30% PB). Os animais do grupo suplementado apresentaram RDW de 31,5%, enquanto que no grupo controle o teor foi de 32,8%, não diferindo estatisticamente. Além disso, os animais que receberam suplementação apresentaram menor contaminação por helmintos gastrointestinais, comprovando a atuação do grupo químico sobre os parasitas. Além destes, Piccione et al. (2010) determinou valores de referência de parâmetros sanguíneos para caprinos Girgentana, raça originária da Sicília. O valor de RDW (%) foi  $37,37 \pm 0,39$  para animais com idade variando entre um e dois anos.

A albumina apresentou-se abaixo do valor de referência para a espécie caprina no grupo que recebeu glicerina, enquanto que a globulina demonstrou-se acima do valor de referência para a espécie em ambos os grupos. Os basófilos encontram-se dentro do valor de referência determinado por Weiss; Wardrop (2010), no entanto, Pugh (2004) cita valores um pouco menores, deixando assim apenas a média do grupo que recebeu glicerina fora do valor de referência.

A albumina é constituinte das proteínas presentes no plasma, sendo encontrada em maior proporção em comparação às demais (THRALL et al., 2015). As globulinas são obtidas por meio da subtração da quantidade de albumina da concentração de proteína sérica total (MEYER; HARVEY, 2004; GRÜN WALDT et al., 2005). O comportamento de diminuição no valor de albumina ocorre durante processos inflamatórios, devido a inibição da sua síntese pelas citocinas pró-inflamatórias (PEREIRA; BURINI, 1992) e pelo aumento da permeabilidade vascular (CORRÊA; BURINI, 2000).

Conforme Contreras; Phil (2000), algumas doenças podem ocasionar um aumento nas concentrações sanguíneas de globulinas e diminuição do teor de albuminas. Doenças de diferentes caracteres podem apresentar efeito similar, desde aquelas ocasionadas por microrganismos até mesmo processos de infecções por

helmintos. Processos inflamatórios e situações de estresse ocasionam aumento da produção de globulina, a qual migra para as frações  $\alpha$  e  $\beta$  em resposta de fase aguda da infecção (ECKERSALL, 1995).

Em situações de Haemoncose hiper-aguda, quando o animal é vítima de morte súbita, processos de gastrite hemorrágica grave originados pelo comportamento hematófago do helminto *H. contortus* ocasionam alterações nos constituintes sanguíneos, a exemplo da diminuição na concentração de proteína total sérica (hipoproteinemia), principalmente dos níveis de albumina, gerando um processo de hipoalbumemia (SOULSBY, 1987).

Aguiar (2009) avaliou diferentes parâmetros sanguíneos de caprinos das raças Canindé e Moxotó nos períodos seco e chuvoso do estado do Ceará, encontrando variações nos valores entre as estações. Os teores de albumina foram superiores nas duas raças na estação chuvosa em comparação a seca, contrário do observado para globulina. Albumina ficou acima do valor de referência em ambas raças e períodos, o que pode ter sido ocasionado por fatores nutricionais devido à discrepância entre as estações, enquanto que globulinas apresentaram valores normais, diferentemente do observado no presente estudo.

As hemácias e hematócrito foram superiores no grupo monepantel em relação aos demais grupos avaliados, sendo que, os valores encontram-se dentro da faixa referência para caprinos.

Com o propósito de analisar se diferentes níveis de inclusão de suplementação ocasionam alterações nos parâmetros hematológicos, Roberto et al. (2010) avaliaram caprinos Boer x SRD (sem raça definida). Os teores de hemácias variaram de 11,86 a 12,05  $\times 10^6/\mu\text{L}$  e para hematócrito 23,20 a 30,20%, ambos classificados dentro do valor de referência. Não foram observadas diferenças significativas para os níveis de suplementação.

Os leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos foram superiores nos grupos monepantel e tratamento com glicerina em comparação com o grupo que recebeu extrato de própolis verde. As médias de leucócitos totais e linfócitos encontram-se acima do valor de referência recomendado para ambos os tratamentos, enquanto que para eosinófilos segundo recomendação de Pugh (2004) somente os valores do tratamento com glicerina encontram-se acima do valor de referência. No entanto, Weiss; Wardrop (2010) trazem valores distintos, classificando os grupos controle e monepantel acima do valor de referência.

O menor número de eosinófilos no grupo tratado com própolis verde sugere menores processos inflamatórios ocasionados pela verminose, ou ainda, capacidade maior de recuperação do animal, garantida principalmente pelas propriedades anti-inflamatória (REIS, et al, 2000; BORRELLI, et al, 2002; RIGHI, et al., 2011) imunomoduladora e antialérgica (ORSOLIC; BASIC, 2005; SFORCIN; BANKOVA, 2011; SHRUTHI; SUMA, 2012) da própolis.

Algumas variáveis como o número de basófilos e eosinófilos estão relacionadas ao sistema imune do animal. Os basófilos são encontrados em menor número de forma natural, uma vez que alterações estão relacionadas a processos de dermatite alérgica e reações de hipersensibilidade tardia (MORRIS; LARGE, 1990). Usualmente seus resultados são avaliados em conjunto com os valores de eosinófilos, isso porque a eosinofilia da mesma forma que o valor aumentado de basófilos pode indicar processos alérgicos, hipersensibilidade e ocorrência de doenças parasitárias. O número elevado de eosinófilos é um indicativo do contato da quitina do parasita com o hospedeiro (FRASER, 1997).

Assim como basófilos e eosinófilos, os linfócitos são considerados a base do desencadeamento e execução da resposta imune (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007), porque a resposta imunológica contra os helmintos é dependente do número de linfócitos (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2009). A linfocitose observada nas médias apresentadas por ambos os grupos pode remeter a processos de infecção, como os ocasionados por helmintos gastrointestinais.

A fim de instalar-se no hospedeiro de forma efetiva, o parasita adota alguns mecanismos de ludibriação no momento da infecção. Se instala em um local adequado para sua maturação e propagação sem prejudicar e/ou matar o hospedeiro, enquanto isso o hospedeiro busca produzir resposta imune suficiente para expulsar o parasita, minimizando seus efeitos nocivos e não prejudicando sua resposta contra outros patógenos (SANTOS, 2013).

Processos de infecção por nematoides gastrointestinais normalmente estão associados a hemorragias e processos de descamação das paredes e lesões nos compartimentos gastrointestinais em que os helmintos se localizam. Um aumento no número de leucócitos é observado em situações de resposta inflamatória (PAREDES, 2010).

Estudos sugerem que parasitas hematófagos a exemplo do *H. contortus* ocasionam alterações no abomaso, como formação de edemas na mucosa,

submucosa e serosa, processos de descamação de células epiteliais seguidas pela formação de úlceras. Nestes locais, é possível visualizar infiltrações de leucócitos, com o objetivo de combater tais processos (SANTA ROSA, 1996).

Os tratamentos avaliados apresentaram condições de leucocitose, justificada pela presença de processos hemorrágicos agudos e intensos, ocasionados pela contaminação quase que em sua totalidade por parasitas hematófagos. Em situações como esta, células mieloides produzem estímulos para o reestabelecimento do número de hemácias circulantes no organismo (BIRGEL et al., 2014), visando reestabelecer a homeostase. No entanto, a ocorrência deste foi menor no grupo que recebeu própolis verde, justificando sua ação anti-inflamatória.

O número de neutrófilos foi superior no grupo monepantel quando comparado ao grupo extrato de própolis verde, não diferindo para o tratamento com glicerina. As médias apresentadas encontram-se acima do valor de referência sugerindo neutrofilia, quando processos infecciosos/inflamatórios são observados. Os monócitos foram superiores no tratamento com glicerina em relação aos animais que receberam extrato de própolis verde, sendo semelhante ao tratamento monepantel. Além de apresentar diferença significativa para os diferentes tratamentos, os monócitos diferiram entre os tempos de coleta (Tabela 15). As médias dos dias 14 e 30 foram significativamente maiores que a média do dia 01, enquanto que os dias 07 e 60 não foram diferentes dos demais. Todas dentro do valor referência para a espécie.

Sabendo que a primeira função desse grupo celular é a defesa do organismo à corpos estranhos, ao analisar as médias de OPG verifica-se que na coleta do dia 14 as médias apresentaram uma diminuição em relação à coleta anterior, o que pode ter se mantido até a coleta do dia 30, ocasionando tal diferença.

Os neutrófilos possuem como função principal a morte e eliminação de microrganismos estranhos ao organismo. Apresentam atividade parasiticida, ocasionada por danos teciduais e efeitos citotóxicos, ambas mediadas por anticorpos (GONZÁLEZ; SILVA, 2008). Na expulsão do parasita os neutrófilos são atraídos por fatores quimiostáticos liberados por mastócitos, e atuam em conjunto com a relação eosinófilos e neutrófilos presentes na corrente sanguínea (ORTOLANI et al., 2013). No que diz respeito ao sistema imune, os neutrófilos fazem parte da defesa inicial despendida pelo sistema imunológico contra agentes externos, sendo rapidamente mobilizados da corrente sanguínea para o local afetado (WOYTSCHEK et al., 2016).

A relação neutrófilo/linfócito (N:L) apresenta-se em torno de 1,0 em animais adultos (SMITH; SHERMAN, 2009; WEISS; WARDROP, 2010). Esta, não apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos avaliados, no entanto, seu valor foi superior para o grupo que recebeu extrato de própolis verde que nos demais.

Com ação fagocítica e microbicida, os monócitos são muito importantes no combate a infecções (LOPES et al., 2007). Participam da regulação da resposta imune e dão origem aos macrófagos, os quais infiltram-se em tecidos com processos inflamatórios e com presença de nódulos, acometidos por helmintos gastrointestinais (TAYLOR et al., 2010).

Os macrófagos possuem funções muito parecidas com as dos neutrófilos, pois destroem antígenos e produzem citocinas pró-inflamatórias. Normalmente não estão associados à processos de infecção helmíntica, mas existem relatos de produção de algumas citocinas específicas quando o material incubado com produtos resultantes da secreção e excreção de larvas de algumas espécies de helmintos que acometem humanos (GILLETTE-FERGUSON et al., 2007).

AST foi superior nos grupos tratados com própolis verde e monepantel em relação ao tratamento com glicerina que não diferiu para os animais que receberam o anti-helmíntico químico. Da mesma forma que a variável anterior, AST apresentou efeito também para os diferentes dias de coleta. A coleta do dia 01 foi superior em relação aos dias 07 e 30, não apresentando diferença para os dias 14 e 60.

GGT foi superior no grupo tratado com monepantel em relação aos demais, não apresentando diferença significativa para os diferentes dias de coleta. Ambos se encontram abaixo do valor referência para caprinos, indicando que os produtos utilizados nas doses determinadas não ocasionaram efeito tóxico aos animais em questão. Caso houvesse, as lesões seriam provocadas por fatores como hipoxia decorrente de processos anêmicos (FARIA JÚNIOR et al., 2002) e efeitos tóxicos de substância como taninos e demais (MONTEIRO et al., 2005).

Enzimas presentes em processos de lesão dos hepatócitos e colestases, como aspartato aminotransferase (AST) e  $\gamma$ -glutamil transferase (GGT) permitem conhecer a magnitude, extensão e curso das infecções. A AST é mais restrita aos hepatócitos, enquanto que a GGT pode ser encontrada em quase todos os tecidos corporais, principalmente pâncreas e rins, podendo também indicar processos de lesão hepática aguda (THRALL et al., 2015).



Simplício et al. (2009) determinou os valores destas mesmas enzimas em caprinos (fêmeas) dos padrões raciais Boer e Saanen, no estado do São Paulo. Os valores de AST observados foram  $89,57 \pm 8,4$  U/L e  $74,90 \pm 11,3$  U/L para animais Saanen e Boer, respectivamente. Enquanto que para GGT foram  $45,14 \pm 4,3$  U/L e  $43,31 \pm 9,0$  U/L, para a mesma sequência. O comportamento de ambas variáveis foi semelhante ao observado no presente estudo.

Além do acompanhamento da saúde do animal, algumas análises bioquímicas permitem um maior conhecimento referente à avaliação nutricional e energética, a exemplo da ureia e glicose, respectivamente (FISCHER et al., 2016).

Variáveis como CHCM, ureia, glicose e fibrinogênio também apresentaram diferença estatística para os diferentes dias de coleta. CHCM foi superior nas coletas dos dias 30 e 60 em relação aos demais dias. Porém, sem significado clínico por estarem dentro dos valores de referência.

O CHCM reflete a concentração média de hemoglobina e permite classificar as anemias em normocrômica ou em hipocrômica. Os animais estudados não apresentaram anemia, sendo positivo o CHCM dentro dos valores de referência em animais parasitados por helmintos hematófagos. Diferente de outras variáveis sanguíneas, o valor de CHCM varia conforme a raça do animal (DAY et al., 2000).

Birgel et al. (2014) avaliou parâmetros sanguíneos de caprinos Saanen com histórico clínico de anemia, ocasionada por verminose gastrointestinal (*H. contortus*) e dividiu ambos os animais de acordo com seu hematócrito para classificação nos diferentes graus de anemia. O CHCM apresentado pelo primeiro grupo foi classificado como acima do de referência, enquanto que o segundo está dentro do estabelecido, dessa forma, é reforçada a necessidade da realização de diferentes análises para auxiliar na classificação de processos anêmicos nos animais.

Os níveis de ureia apresentaram superioridade no D60 em relação ao D07, não diferindo dos demais dias de coleta. Porém se encontram abaixo do valor referência para a espécie.

A ureia é sintetizada pelo fígado e possui relação direta com o nível proteico da alimentação, participando da avaliação da atividade metabólica proteica (WITTEWER, 2000), uma vez que rebanhos que recebem alimentação rica em proteína apresentam altos valores desse produto no sangue (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002). Na maior parte das espécies, o nível de ureia também é utilizado como indicador de

funcionamento renal, pelo fato de ser excretada pela urina (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002).

Ambos animais utilizados foram mantidos em condições experimentais semelhantes, recebendo mesmo manejo alimentar, com dieta isoproteica e isoenergética contendo aproximadamente 0,149 kg de PB/animal/dia, conforme recomendações do NRC (2006). Isso sugere que as alterações observadas para os níveis de ureia não foram ocasionadas pela dieta fornecida aos animais.

Pérez et al. (2003) observou teor de 44,4 mg/dL de ureia em animais Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) criados na Espanha, o qual ficou abaixo do valor adotado como referência para a espécie, comportamento similar ao observado no presente trabalho.

A concentração sérica de glicose do D01 foi inferior aos dias 07, 14 e 30, e semelhante ao D60, sendo todas as médias classificadas abaixo do valor de referência. Produzida no fígado a partir de moléculas precursoras na via da gliconeogênese, serve como combustível para a oxidação respiratória, utilizada no processo de metabolismo cerebral e na lactação (GONZÁLEZ, 2000). Sua concentração pode ser afetada pelo nível de estresse dos animais (MENDES et al., 2005).

Araújo; Silva, (2008) observaram 48,3 mg/dL de glicose em caprinos sem raça definida criados em Mossoró-RN. O autor conclui que este resultado pode ser utilizado como padrão para comparação em trabalhos cujo objetivo seja o diagnóstico de problemas relacionados ao manejo alimentar e/ou problemas no metabolismo. Uma vez que o teor de glicose tenha sido avaliado em amostras de soro dos animais, o tempo de transporte destas pode ter ocasionado redução nos teores esperados, justificando assim os valores baixos.

Fibrinogênio apresentou superioridade na coleta do dia 14 em relação aos dias 01 e 60, não diferindo dos demais dias de coleta. Conforme recomendação de Pugh (2004), ambas as médias se encontram dentro do valor referência para a espécie, enquanto que para Weiss; Wardrop (2010) a média encontrada no dia 14 encontra-se acima do valor referência.

Predominante na ocorrência de processos inflamatórios, o fibrinogênio é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado, e apresenta resposta à inflamação em conjunto com os leucócitos (GONZÁLEZ; SILVA, 2008). Conhecendo o perfil da infecção helmíntica dos animais, que foi em sua maior proporção composta por helmintos sugadores de sangue, tais resultados podem ser explicados pela

capacidade do fibrinogênio na formação de fibrina – substância ativa em processos de coagulação sanguínea.

Pesquisas indicam que além de alimentar-se de sangue dos hospedeiros, larvas de *H. contortus* apresentam capacidade de inocular uma substância anticoagulante no local onde lesionaram a parede abomasal, provocando situações como hemorragias, gastrites e processos anêmicos (FORTES, 1993).

Cavele et al. (2009) relatam um teor de 338,6 mg/dL de fibrinogênio em caprinos Anglo Nubiano, cujo valor encontra-se dentro do preconizado como referência para caprinos (100-400 mg/dL). Segundo os autores, a partir da estimativa de fibrinogênio é possível avaliar a contaminação helmíntica dos animais, já que o mesmo indica respostas a processos inflamatórios associados a infecções helmínticas (JAIN, 1993).

Os antígenos dos helmintos gastrointestinais promovem a polarização e proliferação de linfócitos específicos para uma resposta específica no organismo, responsáveis em produzir e secretar diferentes citocinas. O conjunto de citocinas suprimem a resposta imune celular e promovem estímulos para a produção de anticorpos pelos linfócitos, proliferação de mastócitos e recrutamento de eosinófilos. Estes serão atraídos para diferentes sítios de invasão dos helmintos por moléculas quimiotáticas liberadas pelos mastócitos e irão se ligar as IgE, que revestem toda a superfície do parasito. Essa ligação provoca a degranulação e liberação de proteína e enzimas tóxicas para os helmintos (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2009).

Sabe-se que as citocinas não atuam diretamente sobre os parasitas, mas sim por meio de algumas interleucinas específicas, que possuem capacidade de agir diretamente na mucosa intestinal, alterando mecanismos de contração muscular (ZHAO et al., 2003) e a proliferação de células epiteliais intestinais (CLIFFE et al., 2005). Tais alterações imunológicas e fisiológicas afetam a sobrevivência dos parasitas e apresentam efeitos sobre a patologia associada ao processo de infecção (NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2009). A maneira como os anticorpos atuam na eliminação dos vermes se dá principalmente por mecanismos de hiper-reatividade imediata ou citotoxicidade mediada por anticorpos e células como mastócitos ou eosinófilos e macrófagos (ABRAHAM et al., 1995).

Alguns estudos sugerem que as citocinas (interleucinas) atuam em conjunto com os linfócitos no controle de helmintos gastrointestinais, uma vez que os linfócitos fazem parte da resposta à infecção regulada por citocinas específicas no processo de eliminação dos helmintos (ONAH; NAWA, 2000; FINKELMAN et al., 2004). De modo

geral, todos os helmintos induzem respostas de uma classe de linfócitos específica, no entanto, o mecanismo responsável pela sua eliminação pode ser distinta para cada espécie de parasito, isso porque o microambiente do hospedeiro ocupado pelo parasita, a fonte alimentar e seus mecanismos evasivos podem diferir em ambas espécies e são consideradas no processo de infecção (FINKELMAN et al., 1997; ONAH; NAWA, 2000; FINKELMAN; URBAN; JR., 2001; NEGRÃO-CORRÊA, 2001; LAWRENCE, 2003; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006).

Além da capacidade em aumentar a permeabilidade intestinal durante processos de infecção por helmintos (SHEA-DONOHUE et al., 2001; MADDEN et al., 2002), algumas classes de citocinas induzem mecanismos de hipercontratilidade de células musculares com o objetivo de dificultar o estabelecimento e/ou aderência dos nematoides na parede intestinal (VALLANCE et al., 1999; KHAN et al., 2003; ZHAO et al., 2003). Além disso, promovem condições de alterações na arquitetura das vilosidades intestinais e proliferação de células epiteliais intestinais, promovendo a renovação do epitélio intestinal e a eliminação dos helmintos ali presentes (CLIFFE et al., 2005).

Variáveis apresentadas no leucograma apresentaram o mesmo comportamento, valores menores para os animais do grupo tratado com extrato de própolis verde que aqueles apresentados para os grupos tratados com o anti-helmíntico químico monepantel e glicerina. Uma vez que altos valores nestas avaliações hematológicas podem representar processos infecciosos e inflamatórios, sugere-se que a própolis verde teve atuação direta sobre o sistema imune dos animais.

Estudos sugerem que o efeito de imunomodulação da própolis é garantido pela presença de compostos como ácidos aromáticos e flavonoides e está relacionado principalmente pela ativação de macrófagos (ORSOLIC; BASIC, 2003), realizando processos de fagocitose de partículas estranhas (ORSI et al., 2000), mediação de processos inflamatórios e secreção de substâncias a exemplo de citocinas (DIMOV et al., 1992; IVANOVSKA et al., 1995; ORSI et al., 2000; KHAYAL et al., 2003). Além disso, compostos polifenólicos podem desempenhar funções de ativação de macrófagos e linfócitos (FISHER et al., 2008).

Apesar de todas as vantagens já relatadas em relação à utilização de produtos naturais no controle de parasitas gastrointestinais, estes podem conter em sua composição substâncias de caráter tóxico, cancerígeno e alergizantes, que ainda não foram identificadas e/ou reconhecidas com tais funções (SOUZA, MELLO; LOPES,

2012). Assim, ao trabalhar com produtos de caráter natural, recomenda-se a realização de análises que identifiquem possíveis casos de intoxicação e danos em órgãos como fígado, rins, pâncreas e demais.

Diferentes autores trabalhando com produtos fitoterápicos a exemplo da própolis e extratos vegetais de diferentes espécies botânicas avaliaram a ocorrência de possíveis efeitos tóxicos destes por meio de exames hematológicos.

Morsy et al. (2016) forneceu própolis vermelha para ovinos durante o período de *flushing* e observou aumento do leucograma no grupo que recebeu o extrato conforme o avanço das semanas de lactação dos animais. Na semana onde se concentram os partos, níveis de glicose e proteínas totais apresentaram acréscimo e foram maiores que os observados no tratamento controle.

Resultados semelhantes foram observados por Morsy et al. (2013) ao fornecer extrato de própolis vermelha para ovelhas não gestantes. As médias para VCM e CHCM não diferiram entre os grupos, o autor salienta que caso os animais estivessem gestantes, ambas poderiam apresentar aumento.

Lôbo (2016) ao fornecer extratos de plantas como *Solanum paniculatum* (jurubeba) e *Operculina hamiltonii* (batata-de-purga) para ovinos observaram valores aumentados para AST em ambos tratamentos, indicando a ocorrência de possíveis lesões hepáticas. No entanto, variáveis como proteínas totais, albumina, globulina e ALT não apresentaram diferença significativa entre os grupos que receberam os extratos vegetais e o controle, que recebeu anti-helmíntico químico. Ambas plantas utilizadas possuem em sua composição taninos condensados, alcaloides, flavonoides, xantonas e flavononas (CORDEIRO, 2008; SILVA, 2009), que em quantidades elevadas podem tornar-se tóxicas.

Fonseca (2016) forneceu extrato de *Momordica charantia* para camundongos e observou situações de leucopenia, eosinopenia e monocitopenia três dias após a dosagem do mesmo. Processo de anemia macrocítica também foi observado na mesma data, evidenciado pela diminuição dos valores de hematócrito e hemoglobina e aumento do VCM. Os níveis de ALT e FA também apresentaram declínio após os animais receberem a dosagem.

No entanto, o autor confirma que não foram observadas lesões a nível hepático, já que os níveis de AST e ALT não apresentaram valores significativos. *M. charantia* é uma planta cuja composição química é bastante semelhante às citadas anteriormente, rica em alcaloides, esteroides, saponinas, proteínas e triterpenos (HO

et al., 1991; GUPTA, 1995; PORRO et al., 1995; BEGUM et al., 1997; CHANG et al., 2008; CHEN et al., 2009).

#### 4.4 CONCLUSÕES

Segundo resultados obtidos para Famacha, OPG e TRCOF, o anti-helmíntico químico monepantel foi superior ao extrato de própolis verde no controle dos helmintos, apresentando eficácia superior até o final do período experimental. Todos os grupos avaliados apresentaram infecção com superioridade da população de *H. contortus* em relação as demais espécies de helmintos observadas. No entanto, os animais tratados com própolis verde apresentaram melhores valores para leucograma, comprovando efeitos positivos no sistema imune dos animais e a não ocorrência de qualquer grau de toxicidade para os mesmos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A própolis verde utilizada no presente trabalho possui distintas viabilidades de aplicação. Sua vasta composição química contém fenólicos a exemplo dos taninos, flavonoides e demais compostos químicos, substâncias estas com atividades biológicas já reconhecidas na saúde humana, e com estudos em andamento relativos a saúde animal.

Estudos envolvendo sua utilização no controle de helmintos gastrointestinais em pequenos ruminantes são restritos, uma vez que poucos trabalhos avaliaram seu potencial perante a contaminação e saúde geral dos animais e apenas um referente sua atuação direta sobre ovos e larvas (*in vitro*), até então publicados.

A forma de fornecimento, doses, tempo e características do produto ainda requerem maiores análises. A padronização de doses por quantidade determinada de compostos químicos, a exemplo dos flavonoides, é uma alternativa quando se busca trabalhar com própolis oriundas de lotes e até mesmo locais de produção distintos.

Sua efetividade nos testes *in vitro* demonstra o potencial de seus compostos e requer maiores estudos referente às suas ações em isolado. Testes como a utilização da própolis verde em combinação com anti-helmínticos químicos à campo surge como alternativa de controle a ser verificada.

Além da ação anti-helmíntica, a própolis apresentou efeitos positivos no sistema imune dos animais, sendo capaz de prevenir e combater processos infecciosos e inflamatórios, a exemplo daqueles originados pelas infecções helmínticas. Quando comparada ao monepantel, apresentou eficácia inferior, o que se justifica pela distinção nas composições de ambos produtos. O anti-helmíntico químico apresenta moléculas puras, isoladas e com função bastante específica, ao contrário do fitoterápico, que possui uma gama de compostos, de atuação sinérgica ou não, que atuam de distintas formas nos organismos animais bem como sobre os parasitas.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D.; ROTMAN, H.L.; HABERSTROH, H.F.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; BRIGANDI, R.A.; LEON, O.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. **Experimental Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 297-307, 1995.
- ABRANTES, C. F. G. **Segurança dos excipientes utilizados pela indústria farmacêutica**, Lisboa. 2015. 133 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2015.
- ABREU, B.V.B; DUTRA, R.P.; BATISTA, M.C.A; AZEVEDO, C.C.; NOGUEIRA, A.M.C; COSTA, M.C.P; RIBEIRO, M.N.S. Polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 8, n. 1, p. 18-24, 2006.
- AGUIAR, F. C. **Contribuição para a determinação dos valores normais dos parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e parasitológicos de caprinos Canindé e Moxotó no semiárido nordestino**, Sobral. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2009.
- AGUIAR, S. C. **Quantificação e caracterização dos compostos ativos da própolis e seus efeitos sobre a nutrição e qualidade do leite de vacas e cepas bacterianas do rúmen**, Maringá. 2012. 126 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.
- ALONSO-DÍAZ, M.A; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; CAPETILLO-LEAL C.; BRUNET, S.; HOSTE, H. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 187-192, 2008.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture: comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 12, p. 1732-1740, 1992.
- ANDRADE, J.K.S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C.S.; NUNES, M.L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, s.n., p. 129-138, 2017.
- ANIMUT, G.; PUCHALA, R.; GOETSCH, A.L.; PATRA, A.K.; SAHLU, T.; VAREL, V.H.; WELLS, J. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 3-4, p. 228-241, 2008.
- ANZIANI, O.S.; FIEL, C.A. Resistencia a los anti-helmínticos em nematodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina. **Revista de investigaciones agropecuárias**, v. 41, n. 1, p. 34-46, 2015.



ANZIANI, O.S.; MUCHIUT, S. Resistencia anti-helmíntica múltiple (closantel, febendazole, ivermectina y levamisol) en *Haemonchus* spp. parasitando a ovinos em la provincia de Santa Fe. Ineficacia de una triple combinación de estas drogas para su control. **Revista Veterinaria argentina**, v. 95, n. 1, p. 22-27, 2014.

ARAÚJO, D.F.; SILVA, I.P. Valores de amilase, glicose, colesterol e triglicérides em soro de cabras de Mossoró, RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 97-100, 2008.

ARAÚJO, M.J.A.M.; BÚFALO, M.C.; CONTI, B.J.; FERNANDES JR, A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, n. 1, p. 12-20, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC INTERNATIONAL. 2000. **Official methods of analysis**. 17. ed. Gaithersburg: 2000 p.

ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.; KYRIAZAKIS, I. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1-2, p. 2-11, 2008.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 205-219, 2015.

AYERS, S.; ZINKA, D.L.; MOHNB, K.; POWELL, J.S.; BROWN, C.M.; MURPHY, T.; BRAND, R.; PRETORIUSD, S.; STEVENSON, D; THOMPSON, D.; SINGH, S.B. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity *in vitro*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 541-545, 2008.

AYRES, M.C.C.; ALMEIDA, M.A.O. Agentes antinematódeos. In: SPINOSA, H.S., GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 45. p. 453-465. 1996.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V.; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2007.

BARRAU, E; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. 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**, v. 131, n. 4, p. 531-538, 2005.

BATH G. F.; MALAN F. S.; VAN WYK J. A. The "FAMACHA®" Ovine Anaemia Guide to assist with the control of haemonchosis. In: **Proceedings...** Port Elizabeth, 1996. P. 5-7.

BATISTA, M. C. A. **Bioprospeção anti-helmíntica da geopropolis de *Melipona fasciculata* Smith em testes *in vitro* com ovos e larvas de *Haemochus contortus***

**de pequenos ruminantes**, São Luís. 2016. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

BATISTA, M.C.A.; ABREU, B.V.B.; DUTRA, R.P.; CUNHA, M.S.; AMARAL, F.M.M.; TORRES, L.M.B.; RIBEIRO, M.N.S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 315-322, 2016.

BAXTER, N.J.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E.; WILLIAMSON, M.P. Multiple interactions between polyphenols and salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. **Biochemistry**, v. 36, n. 18, p. 5566-5577, 1997.

BEGUM, S.; AHMED, M; SIDDIQUI, B.S.; KHAN, A.; SAIFY, Z.S.; ARIF, M. Triterpenes, a sterol and a monocyclic alcohol from *Momordica charantia* L. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1313-1320, 1997.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996

BEZERRA, A.M.F.; BEZERRA, K.K.S.; FERNANDES FILHO, A.; CASIMIRO, G.S.; PEREIRA, R.S.M.; NUNES, E.M.; CAVALCANTE, J.C.B.; DA SILVA, E.M.L.; BRASILINO, I.M.V.; DE ABRANTES, K.S.M.; DE ABREU, L.C.; MARACAJÁ, P.B.; ARAÚJO, A.S.; DA SILVA, R.A. Action of propolis on microorganisms of the oral cavity: an integrative review. **International Archives of Medicine**, v. 8, n. 118, p. 1-13, 2015.

BIRGEL, D. B. **Estudo da anemia em ovinos decorrente à verminose gastrointestinal**, São Paulo. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2013.

BIRGEL, D.B.; MULLER, A.F.; FANTINATO-NETO, P.; STORILLO, V.M.; BENESI, F.J.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Avaliação do quadro eritrocitário e da repercussão do estado anêmico no leucograma de caprinos com verminose gastrointestinal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 199-204, 2014.

BITTENCOURT, M.L.F.; RIBEIRO, P.R.; FRANCO, L.R.P.; HILHORST, H.W.M.; DE CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, n. 3, p. 449-457, 2015.

BIZIMENYERA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (*Fabacea*) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 336-343, 2006.

BORGES, D. G. L. **Testes *in vitro* com extratos de plantas coletadas no pantanal Sul-Mato-Grossense sobre *Haemonchus placei* (Nematoda: *Trichostrongylidae*)**, Campo Grande. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

BORGES, S. L. **Estudo da resistência anti-helmíntica em populações de nematoides gastrintestinais de caprinos do município de Cansanção**, Bahia. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 53-63, 2002.

BOTURA, M. B. **Avaliação anti-helmíntica e toxicológica de extratos e frações do resíduo de *Agave sisalana* Perr. (sisal) sobre nematoides gastrintestinais de caprinos**, Bahia. 2011. 108 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa** nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

BRICARELLO, P.A. Prejuízos causados pelas helmintoses em ruminantes. In: COSTA JÚNIOR, L.M.; AMARANTE, A.F.T. **Controle de helmintos de ruminantes no Brasil**. Jundiaí, Paco Editorial: 1 ed. 2015. 316 p.

BRUCE, J.I. New Anthelmintics. **Helminth Chemotherapy**, v. 17, n. 1, p. 131-140, 1987.

BRUNET, S.; AUFRERE, J.; EL BABILI, F.; FOURASTE, H.; HOSTE, H. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in presence of tannin-rich plant (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. **Parasitology**, v. 134, n. 9, p. 1253-1262, 2007.

BRUNET, S.; FOURQUAUX, I.; HOSTE, H. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 419-424, 2011.

CALEGARI, M. A. **Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e calibração multivariada: desenvolvimento de modelos PLS para a determinação da atividade antioxidante em amostras de própolis**, Pato Branco. 2018. 147 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

CALEGARI, M.A.; PRASNIEWSKI, A.; SILVA C.D; SADO, R.Y.; MAIA, F.; TONIAL, L.; OLDONI, T.L. Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2017.

CARRÃO, D. B. **Estudo de metabolismo *in vitro* do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos**,

Ribeirão Preto, 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

CARVALHO, D.; QUEIROZ, M.E.C.; BARBOSA, R.G.; COUTO, L.B.; PEREIRA, L.R.L.; PAULILLO, A.C.; COSTA, A.J. Biodisponibilidade de sulfóxido de albendazol (2,5 e 3,4 mg/kg) em bovinos naturalmente infectados por nematódeos parasitos. **ARS Veterinaria**, v. 15, n. 1, p. 7-11, 1999.

CASTAGNARA, D.D.; BUSARELLO, L.L.; ARAÚJO, J.S.; LEVISTKI, I.C.; DREIER, M.A.; DEFANTE, L.; GARCIA, R.C.; BRAGA, G.C.; PEIXOTO, E.C.T.M.; OLIVEIRA, V.; NERES, M.A.; MESQUITA, E.E.; LIMA, M. Utilização da própolis no controle de parasitos gastrintestinais em ovinos. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA. 29., 2007, Londrina. **Anais...** Londrina: CD-ROM, 2007.

CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, 603 p.

CAVELE, A.; ALMEIDA, M.A.O.; BARRETO, M.A.; LIMA, M.M.; MACHADO, E.A.A.; PEIXOTO, M.S.R.; SILVA, M.N.; MADRUGA, C.R.; AYRES, M.C.C. Estudo comparativo do sistema Famacha entre caprinos e ovinos sob o mesmo manejo produtivo no sertão baiano. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, s.n., p. 690-694, 2009.

CEZAR, A.S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L.A.; RIBAS, H.O.; VOGEL, F.S.F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 157-160, 2010.

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

CHAGAS, A.C.S.; KATIKI, L.M.; SILVA, I.C.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S.N.; OLIVEIRA, M.C.S.; BARIONI, JÚNIOR W. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, v. 62, n. 1, p. 1-6, 2013.

CHAGAS, A.C.S.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011, 153 p.

CHAGAS, A.C.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; DE CARVALHO, C.O.; MOLENTO, M.B. **Método Famacha®: Um recurso para o controle da verminose em ovinos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. (Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado Técnico, 52). 2007.

CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L.S.; FREITAS, A.R.; ARAÚJO, M.R.A.; ARAÚJO-FILHO, J.A.; ARAGUÃO, W.R.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product fator vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 68-73, 2008.

CHANG, C.I.; CHEN, C.R.; LIAO, Y.W.; CHENG, H.L.; CHEN, Y.C.; CHOU, C.H. Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1327-1330, 2008.

CHEN, J.C.; LIU, W.Q.; LU, L.; QIU, M.H.; ZHENG, Y.T.; YANG, L.M.; ZHANG, X.M.; ZHOU, L.; LI, Z.R. Kuguacins F-S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 133-40, 2009.

CLIFFE, L.J.; HUMPHREYS, N.E.; LANE, T.E.; POTTEN, C.S.; BOOTH, C.; GRENCIS, R.K. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. **Science**, v. 308, n. 5727, p. 1463-1465, 2005.

COELHO, J.; FALCÃO, S.I.; VALE, N.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; VILAS-BOAS, M. Phenolic composition and antioxidant activity assessment of southeastern and south Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 21-31, 2017.

COELHO, M.S.; SILVA, J.H.V.; OLIVEIRA, E.R.A.; AMÂNCIO, A.L.L.; SILVA, N.V.; LIMA, R.M.B. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, s.n., p. 95-112, 2010.

COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-43, 1992.

COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; SAMSON-HIMMELSTJERNA G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

CONTRERAS, M.V.P.A.; PHIL, M. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H.O.; RIBEIRO, L.A. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 108p.

CORDEIRO, L.N. **Efeito *in vitro* de extratos etanólicos da raiz de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos**. Patos, 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2008.

CORRÊA, C.R.; BURINI, R.C. Proteínas plasmáticas positivas à fase aguda. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 36, s.n., p. 48-56, 2000.

COTTICA, S.M.; SAWAYA, A.C.; EBERLIN, M.N.; FRANCO, S.L.; ZEOULA, L.M.; VISENTAINER, J.V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 929-935, 2011.

CUNHA, M. S. **Bioprospecção antitumoral da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith**. São Luís, 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

CUNHA, M.S.; DUTRA, R.P.; BATISTA, M.C.A; ABREU, B.V.B.; SANTOS, J.R.; NEIVA, V.A.; AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **Cadernos de Pesquisa**, v. 16, n. 3, p. 31-38, 2009.

D'ASSONVILLE, J.A.; JANOVSKY, E.; VERSLEY, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 61, n. 1-2, p.73-80, 1996.

DA CUNHA, M.G.; ROSALEN, P.L.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J.A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**, v. 82, n. 3, p. 190-194, 2016.

DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. **Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**. Gloucester: BSAVA. 1 ed. 2000. 328 p.

DEMELER J.; KLEINSCHMIDT, N.; KÜTTLER, U.; KOOPMANN, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **International Journal for Parasitology**, v. 61, n. 4, p. 614-618, 2012.

DICKMANS, G.; ANDREWS, J.S. A comparative morphological study of the infective larvae of the common nematodes parasitic in the alimentary tract of sheep. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 52, n. 1, p. 1-25, 1933.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. **Vaccine**, v. 10, n. 12, p. 817-823, 1992.

DUTRA, R.P.; ABREU, B.V.B.; BATISTA, M.C.A; SANTOS, J.R.; CUNHA, M.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; TORRES, L.M.B.; RIBEIRO, M.N.S.; GUERRA, R.N.M. Chemical composition of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis produced in the savana of the state of Maranhao, Brazil. In: APIMONDEA, Argentina. **Anais...** Buenos Aires, CD- ROM, 2011.

DUTRA, R.P.; ABREU, B.V.B.; CUNHA, M.S.; BATISTA, M.C.A.; TORRES, L.M.B.; NASCIMENTO, F.R.F.; RIBEIRO, M.N.S.; GUERRA, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 2014.

DUTRA, R.P.; NOGUEIRA, A.M.C.; MARQUES, R.R.O.; COSTA, M.C.P.; RIBEIRO, M.N.S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 18, n. 4, p. 557-562, 2008.

ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. **Comparative Heamatology International**, v. 5, n. 2, p. 93-97, 1995.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 12, p. 122-132, 2011.

ENGSTRÖM, M.T.; KARONEN, M.; AHERN, J.R.; BAERT, N.; PAYRÉ, B.; HOSTE, H.; SALMINEN, J.P. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 840–851, 2016.

FARIA JÚNIOR, S.P.; SILVA, M.M.; SCHEIBEL, M.; MARTINS, M.F.; RABELLO, P.; BERTAGNON, H.G.; GARCIA, M. Uso da contagem fecal de ovos de nematóides (OPG) para estimar a condição clínica em caprinos. **Ciências Veterinárias nos Trópicos**, v. 5, n. 2-3, p. 86-92, 2002.

FÉBOLI, A. **Estudos fitoquímicos e avaliação do potencial anti-helmíntico da *Opuntia ficus-indica***, Ilha Solteira. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2015.

FERNANDES-SILVA, C.C.; SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; BREYER, E.D.H.; NEGRI, G. Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 237- 240, 2013.

FIGUEIREDO, F.J.B.; DIAS-SOUZA, M.V.; NASCIMENTO, E.A.; DE LIMA, L.R.P. Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal brazilian green propolis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 64-68, 2015.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C.A.; MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; GAUSE, W.C.; URBAN JR., J.F. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology**, v. 15, s.n., p. 505-533, 1997.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S.C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K.B.; SCHOPF, L.; URBAN JR., J.F. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 139-155, 2004.

FINKELMAN, F.D.; URBAN JR., J.F. The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 107, n. 5, p. 772-780, 2001.

FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FISCHER, T.D.; FRAGA, D.R.; KLEMMANN, A.P.H.; COSTANTIN, B.S.; BECK, C.; VIERO, L.M. Níveis de ureia, creatinina e glicose sanguínea e urinária de vacas Holandesas submetidas à dieta com alta proteína. In: Salão do conhecimento – ciência alimentando o Brasil (UNIJUÍ 2016). 2016. **Anais...** 2016.

FONSECA, L.D.; VIEIRA, T.M.; LÁZARO, S.F.; SILVA, M.L.F.; FERREIRA, A.V.P.; BASTOS, G.A.; MORAIS-COSTA, F.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R. Eficácia *in vitro* de extratos aquosos de plantas no controle de nematódeos gastrintestinais de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

FONSECA, Z. A. A. S. **Avaliação da toxicidade e atividade anti-helmíntica de *Momordica charantia***, Mossoró. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2016.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. Porto Alegre: Sulina, 1993. 606p.

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

FRASER, C.M. **Manual Merck de Veterinária**. 7 ed. São Paulo: ROCA, 1997. 2169p.

GILLETTE-FERGUSON, I.; DAEHNEL, K.; HISE, A.G.; SUN, Y.; CARLSON, E.; DIACONU, E.; MCGARRY, H.F.; TAYLOR, M.J.; PEARLMAN, E. Toll-like receptor 2 regulates CXC chemokine production and neutrophil recruitment to the cornea in *Onchocerca volvulus*/Wolbachia-induced keratitis. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5908-5915, 2007.

GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-328, 2006.

GONZÁLEZ, E.; ORZALES, M.T. Estudios del propoleo: origin e importancia de los compuestos fenolicos em su composicion. **Alimentaria**, v. 283, s.n., p. 103-107, 1997.

GONZÁLEZ, F.H.D.; CONCEIÇÃO, T.R.; SIQUEIRA, A.J.; LA ROSA, V.L. Variações sanguíneas de ureia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 20, s.n., p. 59-62, 2000.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. 2002. In: **Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais**, 2002, Gramado. 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 342 p.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Scientific Industry Research Australia**, v. 12, p. 50-52, 1939.

GRANDO, T.H.; DE SÁ, M.F.; BALDISSERA, M.D.; OLIVEIRA, C.B.; DE SOUZA, M.E.; RAFFIN, R.P.; SANTOS, R.C.V.; DOMINGUES, R.; MINHO, A.P.; LEAL, M.L.R.; MONTEIRO, S.G. *In vitro* activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 3, p. 377-382, 2016.

GROTTO, H. Z. W. O hemograma: Importância Para a Interpretação da Biópsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 3, p.178-182, 2009.

GRÜN WALDT, E.G.; GUEVARA, J.C.; ESTÉVEZ, O.R.; VICENTE, A.; ROUSSELLE, H.; ALCUTEN, N.; AGUERREGARAY, D.; STASI, C.R. Biochemical and



hematological measurements in beef cattle in Mendoza Plain Rangelands (Argentina). **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 6, p. 527-540, 2005.

GUISALBERTI, V.Q. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GUPTA, M.P. **270 plantas medicinales iberoamericanas**. Panamá: Convênio Andres Bello, 1995. 617p.

HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 11, p. 1521-1524, 1999.

HEINZEN, E.L.; PEIXOTO, E.C.T.M.; JARDIM, J.G.; GARCIA, R.G.; OLIVEIRA, N.T.E.; ORSI, R.O. Extrato de própolis no controle de helmintoses em bezerros. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 40-44, 2012.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários**. São Paulo: Roca, 2006. 556p.

HENNESSY, D.R. Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs the ruminant gastrointestinal tract. **Parasitology Today**, v. 9, n. 9, p. 329-333, 1993.

HO, W.K.K.; LIU, S.C.; SHAW, P.C.; YEUNG, H.W.; NG, T.B.; CHAN, W.Y. Cloning of the cDNA of á-momorcharin: a ribosome inactivating protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1088, n. 2, p. 311-314, 1991.

HOLLANDS I.; MIYARES C.; SIGARROA A. Análisis comparativo entre la acción del propóleo, la sulfaquinoxalina y la sulfametacina en conejos afectados con coccidiosis. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 19, p. 99-104, 1988.

HOLLANDS I.; MIYARES C.; SIGARROA A.; PÉREZ A. Acción del propóleo sobre la intensidad de parasitación en conejos afectados por Eimerias intestinales. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 15, p.157-163, 1984.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M.; HOSKIN, S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 253-261, 2006.

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. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1-2, p. 18-27, 2012.

HOSTE, H.; SOTIRAKI, S.; LANDAU, S.Y.; JACKSON, F.; BEVERIDGE, I. Goat-nematode interactions: think differently. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 376-381, 2010.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solution for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 144-154, 2011.

HUANG, S.; ZHANG, C.; WANG, K.; LI, G.Q.; HU, F. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.

HUNTLEY, J.F.; PATTERSON, M.; MACKELLAR, A.; JACKSON, F.; STEVENSON, L.M.; COOP, R.L. A comparison of the mast cell and eosinophil responses of sheep and goats to gastrointestinal nematode infection. **Research in Veterinary Science**, v. 58, n. 1, p. 5-10, 1995.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; COSTA, C.; ÍTAVO, L.C.V., FRANCO, G.L., DA SILVA, J.A.; REIS, F.A. Addition of propolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feedlot. **Animal Feed Science and Technology**, v. 165, n. 3-4, p. 161-166, 2011.

IVANOVSKA, N.D.; DIMOV, V.B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, n. 3, p. 135-143, 1995.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

KAPLAN, R.M. Recommendations for control of gastrointestinal nematode parasites in small ruminants: These ain't your father's parasites. **The Bovine practitioner**, v. 47, n. 2, p. 97-109, 2013.

KATIKI, L.M.; FERREIRA, J.F.; GONZALEZ, J.M.; ZAJAC, A.M.; LINDSAY DS.A.C.; AMARANTE, A.F. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 192-218, 2013.

KEITH, R.K. The differentiation of the infective larval of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, v. 1, n. 2, p. 223-230, 1953.

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUEGNARD, F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 116-128, 2008.

KHAN, W.I.; RICHARD, M.; AKIHO, H.; BLENNERHASSET, P.A.; HUMPHREYS, N.E.; GRENCIS, R.K.; VAN SNICK, J.; COLLINS, S.M. Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 5, p. 2430-2438, 2003.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; HATEM, A.M.; VRIES, P.J.F.; EL-SHAFEI, S.; KHATTAB, M.M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 93-102, 2003.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M. J.; KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 22, n. 6, p. 506-515, 1998.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M. J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artepillin C. **Pathology International**, v. 50, n. 9, p. 679-689, 2000.

KLONGSIRIWET, C.; QUIJADA, J.; WILLIAMS, A.R.; MUELLER-HARVEY, I.; WILLIAMSON, E.M.; HOSTE, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 127-134, 2015.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 335-345, 2001.

KRYCHAK-FURTADO, S.; PALHANO, A. L.; FUNAYAMA, S.; DIAS, J. DE F. G.; CERDEIRO, A. P. DOS S. Uso de própolis de *Apis mellifera* no controle do desenvolvimento dos ovos de Trichostrongilídeos de pequenos ruminantes. **Revista eletrônica Biociência, Biotecnologia e Saúde**, v. 3, n. 2, p. 54-63, 2011.

KUMAR, S. **Analytical techniques for natural product research**. Wallingford: CABI, 2015, 194 p.

KWA, M.S.; VEENSTRA, J.G.; ROOS, M.H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in  $\beta$ -tubuline isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 299-303, 1994.

LANCEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal Parasitology**, v.18, n. 7, p. 886-936, 1988.

LAWRENCE, C.E. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion?. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 5, p. 271-281, 2003.

LEITE, E.M.A.; AMORIM, L.C.A. **Toxicologia geral**. Nota de aula, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/Apostila%20Toxicologia%20Geral%20.doc>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

LEOPOLDINI, M.; MARINO, T.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 22, p. 4916-4922, 2004.

LESPINE, A.; CHARTIER, C.; HOSTE, H.; ALVINERIE, M. Endectocides in goats: Pharmacology, efficacy and use conditions in the context of anthelmintics resistance. **Small Ruminant Research**, v. 103, n. 1, p. 10-17, 2012.

LIGHTBODY, J.H.; STEVENSON, L.M.; JACKSON, F.; DONALDSON, K.; JONES, D.G. Comparative aspects of plasma antioxidant status in sheep and goats, and the influence of experimental abomasal nematode infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, n. 2-3, p. 192-199, 2001.

LINÉCIO, M. **Verminose em ovelhas tratadas com extrato alcóolico de própolis**, Marechal Cândido Rondon. 2013. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2013.

LÔBO, K. M. S. **Ação anti-helmíntica da Jurubeba e Batata de purga adicionadas à dieta de ovelhas prenhas e não prenhas**, Patos. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2009.

LÔBO, R.N.B.; VIEIRA, L.S.; OLIVEIRA, A.A.; MUNIZ, E.N.; SILVA, J.M. Genetic parameters for faecal egg count, packed-cell volume and body-weight in Santa Inês lambs. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 288-294, 2009.

LOPES, S.G.; COSTA JÚNIOR, L.M. Controle de helmintos gastrointestinais de caprinos e ovinos utilizando plantas no Brasil. In: COSTA JÚNIOR, L.M.; AMARANTE, A.F.T. **Controle de helmintos de ruminantes no Brasil**. Jundiaí, Paco Editorial: 1ed. 2015. 316 p.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. **Manual de Patologia clínica veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107p.

LOPES, W.D.Z.; PINHEIRO, G.; BORGES, F.A.; COSTA, A.J.; VULCANI, V.A.S.; LIMA, C.R.O. Terapia anti-helmíntica. In: LOPES, W.D.Z, DA COSTA, A.J. (Org.). **Endoparasitoses de ruminantes**. Goiânia: Editora UFG, 2017. 242 p.

LOUREIRO, C.M.B. **Redução de verminoses, parâmetros hematológicos e bioquímicos de cordeiros alimentados com extrato de própolis na ração**, Jaboticabal. 2007. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, A.S.; COSTA, S.S.; SILVA, R.P.D.; DA SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; DA ROCHA, J.L.C.; NUNES, S.B.; UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-26, 2015.

MADDEN, K.B.; WHITMAN, L.; SULLIVAN, C.; GAUSE, W.C.; URBAN, J.F.JR.; KATONA, I.M.; FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T. Role of STAT6 and mast cells in IL-4 and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 8, p. 4417-4422, 2002.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83–99, 1995.

MARINO, P.C.; SILA, C.B.; GONZALEZ, S.M.; REWAY, A.P.; ALMEIDA, A.L.; BIANCHINI, T.P.; FERNANDES, T.M.; GOMES, R.G.; LISBOA, J.A.N.; SENEDA, M.M. Biomarcadores fisiológicos de ovelhas (*Ovis aries*) mestiças durante o parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 159-164, 2014.

MARTIN, P.J.; ANDERSON, N.; JARRETT, R.G. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, n. 8, p. 236-240, 1989.

MARTIN, P.J.; ANDERSON, N.; JARRETT, R.G. Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 2, p. 38-43, 1985.

MARTIN, R. J. Modes of Action of Anthelmintic Drugs. **The Veterinary Journal**, v.154, p.11-34, 1997.

MARTIN, R.J.; ROBERTSON, A.P.; BJORN, H. Target sites of anthelmintics. **Parasitology**, v.114, p.111-124, 1997.

MARTINS, A. C. **Estudo de resistência anti-helmíntica ao monepantel em propriedades de ovinos de uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP**, Jaboticabal. 2016. 61 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

MEDEROS, A.E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G.E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 2, p. 941-946, 2013.

MEHREZ, A.Z.; ORSKOV, E.R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal Agricultural Science**, v. 88, n. 3, p. 645-650, 1979.

MELO, A.C.F.L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F.A.M.; MELO, L.M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.

MENDES, A.R.; EZEQUIEL, J.M.B.; GALATI, R.L.; FEITOSA, J.V. Desempenho, parâmetros plasmáticos e características de carcaça de novilhos alimentados com farelo de girassol e diferentes fontes energética, em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 962-702, 2005.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 2004, 351p.

MIHAI, C.M.; MARGHITAS, L.A.; DEZMIREAN, D.S.; BARNUTIU, L. Correlation between polyphenolic profile and antioxidant activity of propolis from Transylvania. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 2, p. 100-103, 2011.

MIN, B.R.; HART, S.P. Tannins for suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14, p. 102-109, 2003.

MIN, B.R.; WILSON, E.A.; SOLAIMAN, S.; MILLER, J. Effects of condensed tannin-rich pine bark diet on experimentally infected with *Haemonchus contortus* in meat goats. **International Journal of Veterinary Health Science & Research**, v. 3, n. 3, p. 49-57, 2015.

MINHO, A.P.; GASPAR, E.B.; DOMINGUES, R. **Guia Prático para determinação de durva dose-resposta e concentração letal em bioensaios com extratos vegetais**.

Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2016. (Embrapa Pecuária Sul. Comunicado Técnico, 93). 2016.

MOLAN, A.L. Effect of purified condensed tannins from pine bark on larval motility, egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda: *Trichostrongylidae*). **Folia Parasitologica**, v. 61, n. 4, p. 371-376, 2014.

MOLAN, A.L.; FARAJ, A.M. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: *Trichostrongylidae*). **Folia parasitologica**. v. 57, n. 1, p. 62-68, 2010.

MOLENTO, M. B.; SEVERO, D. **Famacha**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2004. 4 p. (Folheto técnico).

MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 117-121, 2001.

MONDAL, H.; HOSSAIN, H.; AWANG, K.; SAHA, S.; RASHID, S. M. U.; ISLAM, M. K.; RAHMAN, M. S.; JAHAN, I. A.; RAHMAN, M. M.; SHILPI, J. A. Anthelmintic activity of ellagic acid, a major constituent of *Alternanthera sessilis* against *Haemonchus contortus*. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 35, n. 1, p. 58-62, 2015.

MONROY, Y.M.; RODRIGUES, R.A.F.; RODRIGUES, M.V.N.; CABRAL, F.A. Fractionation of ethanolic and hydroalcoholic extracts of green propolis using supercritical carbon dioxide as an anti-solvent to obtain artepillin rich-extract. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, s.n., p. 167-173, 2018.

MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; DE AMORIM, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAUJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORENO, J.A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura, Divisão de Terras e Colonização, 1961, 41p.

MORRIS, D.D.; LARGE, S.M. Alterações no leucograma. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Veterinária de Grandes Animais**. São Paulo: Manole, p.437-446, 1990.

MORSY, A.S.; ABDALLA, A.L.; SOLTAN, Y.A.; SALLAM, S.M.A.; EL-AZRAK, K.E.M.; LOUVANDINI, H.; ALENCAR, S.M. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 7, p. 1609–1618, 2013.

MORSY, A.S.; SOLTAN, Y.A.; SALLM, S.M.A.; ALENCAR, S.M.; ABDALLA, A.L. Impact of Brazilian red propolis extract on blood metabolites, milk production, and lam performance of Santa Inês ewes. **Tropical Animal Heath Production**, v. 48, n. 5, p. 1043-1050, 2016.

MOURA L.P.P.; SCAPINELLO C.; MARTINS E.N.; FRANCO S.L.; RIBEIRO M.C.M. Efeito da solução hidroalcolica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocisto por grama de fezes de *Eimeria* spp em coelhos Nova Zelândia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 320-325, 1998.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 908 p.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of Artepellin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 9, p. 1452-1454, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, D.C.: National Academy Press, 2007. 384p.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 291-299, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D.G.; PEREIRA, A.T.M.; FERNANDES, A.; SCHEUERMANN, K.; SAOUZA, A.L.S.; TEIXEIRA, M.M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 10-11, p. 14-28, 2006.

NEGRÃO-CORRÊA, D.A.; TEIXEIRA, M.M. Resposta imune. In: CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, 603 p.

NERY, P.S.; DUARTE, E.R.; MARTINS, E.R. Plant efficacy in small ruminant gastrointestinal nematode control: a review of published studies. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 330-338, 2009.

NEUWIRT, N.; GREGORY, L.; YOSHIHARA, E.; GORNIK, S.L. Effect of *Musa* spp. extract on eggs and larvae of gastrointestinal nematodes from infected sheep. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 3751-3756, 2015.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, s.n., p. 107-110, 2009.

NICIURA, S.C.M.; VERÍSSIMO, C.J.; MOLENTO, M.B. **Determinação da Eficácia Antihelmíntica em Rebanhos Ovinos: Metodologia da Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zossanitário**. São Paulo: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. (Embrapa Pecuária Sudoeste. Documentos, 91). 2009.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility, a review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2051-2060, 1988.

OLDONI, T.L.C.; OLIVEIRA, S.C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M.A.; SADO, R.Y.; MAIA, F.M.C.; ALENCAR, S.M.; LIMA, V.A. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2054–2062, 2015.

OLIVEIRA, L. D. R. **Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo***, Brasília. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

OLIVEIRA, L. L. S. **Dinâmica das infecções helmínticas em ovinos submetidos a diferentes tratamentos anti-helmínticos na região Norte de Minas Gerais, Brasil, e avaliação da atividade dos extratos de *Momordica charantia* e *Calotropis procera* como anti-helmíntico**, Minas Gerais. 2014. 111 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACEDO, I.T.F. Plantas taniníferas e o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1967-1974, 2011.

ONAH, D.N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **Korean Journal of Parasitology**, v. 38, n. 4, p. 209-236, 2000.

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, n. 2, p. 205-219, 2000.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 265-273, 2003.

ORSOLIC, N; BASIC, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Journal Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 37–45, 2005.

ORTOLANI, E.L.; LEAL M.L.R.; MINERVINO A.H.H.; AIRES A.R.; COOP R.L.; JACKSON F.; SUTTLE N.F. Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 230-234, 2013.

OZTURK, H., PEKCAN, M., SIRELI, M.; FIDANCI, U.R. Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 57, n. 4, p. 217-221, 2010.

PALCY, C.; SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CORTET, J.; CABARET, J. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep



and genotypic evaluation of the parasite. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 68-74, 2010.

PAPADOPOULOS, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1-2, p. 99-103, 2008.

PAREDES, P. I. G. **Coccidiose em Pequenos Ruminantes**, Lisboa. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PAULA, E. M. de. **Produto com compostos fenólicos da própolis sobre parâmetros digestivos e ruminais, e população de protozoários em bubalinos**, Maringá. 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, P.C.M.; BURINI, R.C. Reação metabólica à infecção no hospedeiro. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**, v. 47, s.n., p.111-115, 1992.

PÉREZ, J.M.; GONZÁLEZ, F.J.; GRANADOS, J.E.; PÉREZ, M.C.; FANDOS, P.; SORIGUER, R.C.; SERRANO, E. Hematologic and biochemical reference intervals for Spanish ibex. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 1, p. 209–215, 2003.

PIANTINO, C. R. **Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico**, Campinas. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; LUTRI, L.; VAZZANA, I.; FERRANTELLI, V.; CAOLA, G. Reference values for some haematological, haematochemical, and electrophoretic parameters in the Girgentana goat. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 34, n. 2, p. 197-204, 2010.

PORRO, G; BOLOGNESI, A.; CARETTO, P.; GROMO, G.; LENTO, P.; MISTZA, G.; SCIUMBATA, T.; STIRPE, F.; MODENA, D. *In vitro* and *in vivo* properties of na anti-CD5-momordin immunotoxin on normal and neoplastic T lymphocytes. **Cancer ImmunolImmunother**, v. 36, n. 5, p. 346-350, 1993.

POWERS, K.G.; WOOD, J.B.; GIBSON, T.; SMITH, H.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 265-84, 1982.

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

PRICHARD, R.K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 445–453, 2001.

PRICHARD, R.K. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. **International Journal of Parasitology**, v. 3, n. 3, p. 409-417, 1973.

PRINCIPAL, J.; HERNÁNDEZ, I.; D'AUBETERRE, R.; RODRIGUEZ, J.G. Eficacia del propóleo en el control de las helmintiasis de ovinos naturalmente infestados. **Revista Científica**, v. 12, n. 2, p. 604-607, 2002.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2004. 513 p.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REIS, C.M.F.; CARVALHO, J.C.T; CAPUTO, L.R.G.; PATRÍCIO, K.C.M.; BARBOSA, M.V.J.; CHIEFF, A.L.; BASTOS, J.K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9-10, n. 1, p. 43-52, 2000.

RICE-EVANS, C. A.; BURDON, R. H. **Free radical damage and its control**. Elsevier Science, 1 ed. 1994. 389 p.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIGHI, A.A.; ALVES, T.R.; NEGRI, G.; MARQUES, L.M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L.J.; GREER, A; BARTLEY, Y.; BARTLEY, D.J.; GRANT, G.; HUNTLEY, J.F. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 390-398, 2012.

RISTOW, L.E. Interpretando o RDW (Red Cell distribution width) em Medicina Veterinária). **VETScience Magazine**, v. 10, p. 36-37, 2016.

ROBERTO, J.V.B.; SOUZA, B.B.; SILVA, A.L.N.; JUSTINIANO, S.V.; FREITAS, M.M.S. Parâmetros hematológicos de caprinos de corte submetidos a diferentes níveis de suplementação no semi-árido paraibano. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p. 127-132, 2010.

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

ROBERTS, J.L.; SWAN, R.A. Quantitative studies of ovine haemonchosis. I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. **Veterinary Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 165-171, 1981.

ROMERO, J.R.; ANZIANI, O.S.; CETRA, B.; FIEL, C.A. Epidemiologia e impacto productivo de nematodes gastrointestinales en la región NEA. In: **Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control**. Fiel C y Nari A. Ed: Agropecuaria Hemisferio Sur SRL. Uruguay. p. 89-112. 2013.

ROMERO, J.R.; SÁNCHEZ, R.; BOERO, C. Nematodes. Epidemiología y control. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en la pampa húmeda y la mesopotámica. In: SUÁREZ, V.; OLAECHEA, F.; ROMERO, J.; ROSSANIGO, C. **Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América**. INTA. Publicación técnica N°70, p. 33-42. 2007.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 125). 2006.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128). 2007.

RUPPENTHAL, J.E. **Toxicologia**. Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria; Rede e-Tec Brasil, Santa Maria, 2013. 128 p.

RUSSEL, A.J.F.; DONEY, M.; GUNN, G.R. Subjective Assessment of Body Fat in Live Sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 72, p. 451-454, 1966.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 21-29, 2002.

SALATINO, A.; FERNANDES-SILVA, C.C.; RIGHI, A.A.; SALATINO, M.L.F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Products Report**, v. 28, n. 5, p.925-936, 2011.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian própolis. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SALGUEIRO, F. B. **Caracterização da própolis verde brasileira: substâncias fenólicas, atividade biológica e análise quimiométrica**. Salgueiro. 2016. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Salgueiro, 2016.

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1-8, 2016.

SANGSTER, N.C.; RICKARD, J.M. Disposition of oxfendazole in goats and efficacy compared with sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 3, p. 258-263, 1991.

SANGSTER, N.C.; WHITLOCK, H.V.; RUSS, I.G.; GUNAWAN, M.; GRIFFIN, D.L.; KELLY, J.D. *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. **Research in Veterinary Science**, v. 27, n. 1, p. 106-110, 1979.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. Brasília, DF: Embrapa-CNPC, 1996, 220 p.

SANTOS, A.C.V.; SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; SILVA, G.D.D.; UZÊDA, R.S.; DIAS, Ê.R.; BRANCO A.; CARDOSO, K.V.; DAVID, J.M.; BOTURA, M.B.; COSTA, S.L.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* ovicidal and larvicidal activities of some saponins and flavonoids against parasitic nematodes of goats. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1884-1889, 2018.

SANTOS, M. C. **Resposta imunológica de cordeiros às infecções artificiais por *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei***. Botucatu. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral Aplicada) - Universidade de São Paulo, Botucatu, 2013.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Florianópolis: UFRGS- UFSC, 2001. 740 p.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHEA-DONOHUE, T.; SULLIVAN, C.; FINKELMAN, F.D.; MADDEN, K.B.; MORRIS, S.C.; GOLDHILL, J.; PINEIRO-CARRERO, V.; URBAN, J.F.JR. The role of IL-4 in *Heligmosomoides polygyrus*-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 4, p. 2234-2239, 2001.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of Artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 2, p. 181-188, 2004.

SHRUTHI, E.; SUMA, B. Health from the hive: potential uses of propolis in general health. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 3, n. 3, p. 159-162, 2012.

SILVA, L. Fitoterápicos no Controle de Endoparasitoses de Caprinos e Ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 01, n. 02, p. 37-43, 2007.

SILVA, C.F. **Avaliação da eficácia de *Typha domingensis* Pers (Taboa) e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples) (Batata de purga), In natura, sobre infecções helmínticas gastrintestinais em caprinos naturalmente infectados, em clima semi-árido**. Patos, 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos. 2009.

SILVA, E.C.C.; MUNIZ, M.P.; NUNOMURA, R.C.S.; NUNOMURA, S.M.; ZILSE, G.A.C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628-633, 2013.

SILVA, E.R.R.; HUNKA, M.M.; FERREIRA, M.P.B.; ALMEIDA, T.L.A.C.; VAZ, S.G.; MÉLO, S.K.M.; MANSO, H.E.C.C.C.; MANSO FILHO, H.C. Biomarcadores sanguíneos de caprinos Saanen com diferentes faixas etárias. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 24, n. 1, p. 22-26, 2017.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, s.n., p. 1-29, 2015.

SIMPLÍCIO, K.; COTRIM, F.; FAGLIARI, J.J.; JORGE, R.L.N. Perfil bioquímico sérico de cabras das raças Saanen e Boer. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, s.n., p. 270 – 275, 2009.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, n. 1, p. 152-178, 1999.

SOARES, S.C.S.; DE LIMA, G.C.; LAURENTIZ, A.C.; FÉBOLI, A.; DOS ANJOS, L.A.; CARLIS, M.S.P.; FILARDI, R.S.; DE LAURENTIZA, R.S. *In vitro* anthelmintic activity of grape pomace extract against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 243-247, 2018.

SOULSBY, E.J.L. The invasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminthes infection. **Immunology Letters**, v. 16, n. 3-4, p. 315-320, 1987.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

SOUZA, B.B.; SOUZA, E.D.; SILVA, R.M.N.; CEZAR, M.F.; SANTOS, J.R.S.; SILVA, G.A. Respostas fisiológicas de caprinos de diferentes grupos genéticos no semi-árido paraibano. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 314-320, 2008.

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012. 372p.

SOUZA, S.A.; CAMARA, C.A.; SILVA, E.M.S.; SILVA, T.M.S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, s.n., p. 1-5, 2013.

SPRENGER, L. K. **Utilização de extrato de *Artemisia annua* no controle de *Eimeria* em aves e nematódeos gastrintestinais em caprinos**. Curitiba. 2013. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SPRENGER, L.K. Atividade ovicida e larvicida do extrato etanólico de *Aloe vera* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 3-4, p. 152-156, 2015a.

SPRENGER, L.K.; MAURER, J.B.B.; BAGGIO, S.F.Z.; MAGALHÃES, P.M.; MOLENTO, M.B. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre *Haemonchus contortus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 4, p. 57-65, 2016.

SPRENGER, L.L.; BUZATTI, A.; CAMPESTRINI, L.H.; YAMASSAKI, F.T.; MAURER, J.B.B.; BAGGIO, S.F.Z.; MAGALHÃES, P.M.; MOLENTO, M.B. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre parasitas gastrintestinais de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 25-31, 2015b.

STARLING, R. Z. V. C. **Diagnóstico *in vivo* da sensibilidade de nematoides a diferentes anti-helmínticos em ovinos do município de Alegre, Espírito Santo**. Alegre. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

SUTHERLAND, I.; SCOTT, I. Nematode parasites. In: SUTHERLAND, I.; SCOTT, I. (Eds.), **Gastrointestinal Nematodes of Sheep and Cattle**. Oxford: Wiley Blackwell, 2010. 26 p.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A.Z.; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, Z.P.; KRÓL, W. Chemical composition and anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 1-13, 2013.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. Parasitos de caprinos e ovinos. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap.3. p.133-156.

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

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 1590 p.

TIRABASSI, A.H.; MADEIRA, H.M.F.; OLLHOFF, R.D.; SOTOMAIOR, C.S. Manejo integrado de parasitos como alternativa sustentável na produção de pequenos ruminantes. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 11, n. 3, p. 322-338, 2013.

TORETI, V.C.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, s.n., p. 1-13, 2013.

TORRES-ACOSTA, J.F.J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2-3, p. 159-173, 2008.

TOUZANI, S.; AL-WAILI, N.; EL MENYIY, N.; FILIPIC, B.; PEREYRA, A.; EL ARABI, I.; AL-WAILI, W.; LYOUSSI, B. Chemical analysis and antioxidant content of various propolis samples collected from different regions and their impact on antimicrobial activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 11, n. 7, p. 436-442, 2018.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

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

VALLANCE, B.A.; BLENNERHASSETT, P.A.; DENG, Y.; MATTHAEL, K.I.; YOUNG, I.G.; COLLINS, S.M. IL-5 contributes to worm expulsion and muscle hypercontractility in a primary *T. spiralis* infection. **American Journal of Physiology**, v. 277, n. 2, p. G400-G408, 1999.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. V. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. Rampant Anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? **Anais...** In: VAN WYK, J.A.; VAN SCHALKWYK, P.C. (eds.). Managing Anthelmintic Resistance in Endoparasites. Workshop, 16th International Conference of the WAAVP, Sun City, South Africa, p. 51-63, 1997.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; DA COSTA, M.M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

VEIGA, R.S.; MENDONÇA, S.; MENDES, P.B.; PAULINO, N.; MIMICA, M.J.; LAGAREIRO NETTO, A.A.; LIRA, I.S.; LÓPEZ, B.G-C.; NEGRÃO, V.; MARCUCCI, M.C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidante activity of green própolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, n. 4, p. 911-920, 2017.

VERUSSA, G.H.; CORASSA, A.; PINA, D. dos S.; TON, A.P.S.; KOMIYAMA, C.M.; LEITE, R.G. Caracterização, uso e limitações da glicerina na alimentação de suínos: revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 3, p. 179-186, 2016.

VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE OVINOS E CAPRINOS DE CORTE. 02., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2008.

VILLALBA, J.J.; PROVENZA, F.D.; HALL, J.O.; LISONBEE, L.D. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 6, p. 2189-2198, 2010.

VISIOLI, F.; BELLOMO, G.; GALLI, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 247, n. 1, p. 60-64, 1998.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ J.A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 117-124, 2008.

WAGH, V.D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, s.n., p. 1-11, 2013.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Shalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. Wiley-Blackwell, Ames; 2010. 1206 p.

WELBER, D.Z.L.; CARVALHO, R.S.; GRACIOLI, D.P.; OLIVEIRA, P.V.; PEREIRA, V.; MARTINEZ, A.C.; MAZZUCATTO, B.C. Intoxicação aguda por triclorfon em caprinos tratados com a dose terapêutica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 114-118, 2014.

WILLIAMS, A.R.; ROPIAK, H.M.; FRYGANAS, C.; DESRUES, O.; MUELLER-HARVEY, I.; THAMSBORG, S.M. Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. **Parasitology Vectors**, v. 7, n. 518, p. 1-12, 2014.

WITTEWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H.O.; RIBEIRO, L.A. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 108p.

WOLSTENHOLME, A.J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; AMSONHIMMELSTJERNA, G.V.; SANGSTER, N.C. Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 469-476, 2004.



WOYTSCHAK, J.; KELLER, N.; KRIEG, C.; WYNN, T.A.; ZINKERNAGEL, A.S.; BOYMAN, O. Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 45, n. 1, p. 172–184, 2016.

WURSTHORN, L.; MARTIN, P. **Reso**: faecal egg count reduction test (FECRT) Analysis Program. 2.01. Parkville: CSIRO Animal Health Research Laboratory, 1990.

ZAWADZKI, F.; PRADO, I.N.; MARQUES, J.A.; ZEOULA, L.M.; ROTTA, P.P.; SESTARI, B.B.; VALERO, M.V.; RIVAROLI, D.C. Sodium monensin or propolis extract in the diets of feedlot-finished bulls: effects on animal performance and carcass characteristics. **Journal of Animal and Feed Science**, v. 20, n. 1, p. 16–25, 2011.

ZHAO, A.; MCDERMOTT, J.; URBAN, J.F.JR.; GAUSE, W.; MADDEN, K.B.; YEUNG, K.A.; MORRIS, S.C.; FINKELMA, F.D.; SHEA-DONOHUE, T. Dependence of IL-4, IL-3, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 2, p. 948-954, 2003.

**ANEXOS**

## Anexo 1. Parecer de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



PARECER: 2017-020/2017 - CEUA  
PROCESSO Nº: 23064.020774/2017-64  
INTERESSADO: VICENTE DE PAULO MACEDO

Dois Vizinhos, 13 de dezembro de 2017.

### PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

<b>Título:</b>	Extrato Alcoólico no controle de verminose em caprinos
<b>Área Temática:</b>	Produção e Sanidade Animal
<b>Pesquisador / Professor:</b>	Prof. Dr Vicente P Macedo
<b>Instituição:</b>	UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CAMPUS DOIS VIZINHOS
<b>Financiamento:</b>	Não há.
<b>Versão:</b>	02

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2017-024
<p><b>Apresentação do Projeto:</b> Trata-se de experimento convencional de avaliação de potencialidade de uso de produtos naturais no controle de verminose animal, comparando a produtos convencionais, normalmente utilizados em criações de animais.</p>	
<p><b>Objetivo:</b> Avaliar a potencialidade da própolis em comparação ao produto químico ZOLVIX no controle da verminose em caprinos.</p>	
<p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> A utilização de produtos naturais vem de encontro a produção de alimentos responsáveis sem resíduos e valorizando a sustentabilidade e segmentos especiais de mercado de produtos tidos como orgânicos, não apresentando riscos maiores aos animais.</p>	
<p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática:</b> O projeto busca controles alternativos que são necessários as linhas de produtos orgânicos e que crescem em termos de demanda em supermercados tidos como produtos equilibrados com a natureza e sustentáveis.</p>	
<p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> Foram apresentados os seguintes: formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; projeto de pesquisa completo no modelo CNPq; declaração de não início do projeto (com assinatura e data); registro de projeto junto à DIRPPG por meio de uma declaração do coordenador do programa; declaração do veterinário responsável pelos animais com assinatura do pesquisador e do médico veterinário; termo de consentimento firmado entre a UTFPR e CIAEP assinado pelo responsável do CIAEP e pelo pesquisador da UTFPR. Todos atendendo os requisitos legais vigentes do CEUA/UTFPR.</p>	
<p><b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> Não há.</p>	
<p><b>Situação do Parecer:</b> APROVADO</p>	
<p><b>Considerações Finais a Critério da CEUA:</b> Todos os procedimentos devem seguir a lei n° 11.794 de 8 de outubro de 2008.</p>	

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Extrato Alcoólico no controle de verminose em caprinos**", protocolo nº 2017/24, sob a responsabilidade de VICENTE DE PAULO MACEDO - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 13/12/2017.

Vigência do projeto:	De primeiro de janeiro de 2018 a 30 de março de 2018
Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	Caprinos Boer
Número de animais:	42 quarenta e dois ao total (40 animais para teste in vivo e dois animais para teste em vitro)
Peso/idade:	40 animais de 15 quilos e dois animais de 50 quilos
Sexo:	Macho e fêmeas
Origem:	CIAEP/IAPAR/UTFPR

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por NEDIA DE CASTILHOS GHISI, PRESIDENTE DE COMISSÃO, em 13/12/2017, às 12:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_externo=0](https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0), informando o código verificador 0132477 e o código CRC 93138E7E.

**Anexo 2.** Protocolo n. 3/2009 Laboratório Sanidade Animal – Embrapa Pecuária Sudeste, utilizado para recuperação de ovos utilizados no teste de eclodibilidade larval.



### **PROTOCOLO LABORATÓRIO SANIDADE ANIMAL – N° 3/2009)**

#### **Protocolo de recuperação de ovos de nematóides gastrintestinais**

- Coletar fezes do reto de animais infectados que apresentem OPG acima de 2000; ovos
- Pegar uma porção das fezes, macerar e acrescentar água morna ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ );
- Filtrar o material fecal em quatro peneiras com as seguintes reticulações: 1mm, 105 $\mu\text{m}$ , 55 $\mu\text{m}$  e 25 $\mu\text{m}$ ;
- Lavar a peneira de 25 $\mu\text{m}$  com **água destilada**, com auxílio de pisseta, para retirar os ovos que ficaram retidos;
- Colocar este conteúdo em um Béquer e posteriormente transferi-lo para tubos Falcon;
- Colocar os tubos Falcon em centrífuga por 5 min a 3000 rpm (1.100 xg);
- Após a centrifugação, descartar o sobrenadante, completar com **solução salina saturada para a suspensão dos ovos**;
- Centrifugar por 5 min a 3000 rpm;
- Após a centrifugação, despejar o sobrenadante na peneira de 25  $\mu\text{m}$  e lavar com água destilada (Caso a suspensão fique suja, repetir a centrifugação com solução salina saturada);
- Despejar o conteúdo da peneira em um cálice de decantação (1h); deixar a temperatura ambiente, desde que a mesma não seja inferior a 22°C, nesse caso colocar em B.O.D.;

**OBS: A quantidade de fezes a ser macerada dependerá do OPG, quanto menor o resultado do OPG maior quantidade de fezes será necessária para uma recuperação de ovos satisfatória.**

**O tempo de decantação também varia conforme o OPG, quanto maior o resultado do OPG, menor será o tempo de decantação.**