



Universidade Federal do Maranhão

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

**ATIVIDADE ANTICOCCIDICIDA DE PRODUTOS
NATURAIS CONTRA *EIMERIA* DE CAPRINOS**

ELINALVA DA SILVA MORAES

Chapadinha

2019

ELINALVA DA SILVA MORAES

**ATIVIDADE ANTICOCCIDICIDA DE PRODUTOS
NATURAIS CONTRA *EIMERIA* DE CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha

Chapadinha

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

da Silva Moraes, Elinalva.

Atividade anticoccidíca de produtos naturais contra
Eimeria de caprinos / Elinalva da Silva Moraes. - 2019.
64 p.

Orientador(a): Ivo Alexandre Leme da Cunha.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal (25.06)/ccaa, Universidade Federal do
Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,
2019.

1. Caprinos. 2. Compostos bioativos. 3. Eimeriose.
4. Manejo sanitário. I. Alexandre Leme da Cunha, Ivo.
II. Título.

ELINALVA DA SILVA MORAES

**ATIVIDADE ANTICOCCIDICIDA DE PRODUTOS
NATURAIS CONTRA *EIMERIA* DE CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em: 30/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha (**Orientador**)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Samuel Vieira Brito
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida que tenho.

Ao meu orientador professor Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha pelo apoio, conselhos, grandes oportunidades e pelo ensino a mim dado, e principalmente por toda confiança que sempre teve no meu potencial.

Ao professor Dr. Samuel Vieira Brito por aceitar o convite para participar da banca dando a sua importante contribuição neste trabalho.

Ao prof. Dr. Claudener Souza Teixeira por participar da banca e ao Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. med. vet. habil. Carlos Hermosilla, Sara López e Liliana Silva do Instituto de Parasitologia da Justus Liebig University Gießen na Alemanha por todo apoio, carinho e paciência pelo qual foi possível realizar uma importante etapa do trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Parasitologia Aplicada-LPA em especial minha amiga Helena, amo muito.

Ao meu noivo Ezequias Santos pelo amor, todo incentivo nos momentos mais difíceis. Te amo!

À CAPES por todo o apoio financeiro durante o mestrado.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I- REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1	Introdução	13
1.2	Caprinocultura	14
1.3	Aspectos biológicos de <i>Eimeria</i> spp. em caprinos	15
1.4	Taxonomia e ciclo biológico.....	17
1.5	Tratamento e formas de controle	18
1.6	Controle alternativo	19
1.6.1	Características de <i>Lippia gracilis</i> e suas aplicações.....	20
1.6.2	Características da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> e suas aplicações.....	23
1.6.3	Características gerais dos monoterpenos carvacrol, ρ -cimeno e γ -terpineno	27
1.7	Importância dos estudos <i>in vitro</i>	27
1.8	Referências Bibliográficas	28
2	OBJETIVO	35
2.1	Geral.....	35
2.2	Específicos	35
3	CAPÍTULO II - Avaliação da atividade coccidicida do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> e monoterpenos em oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....	36
3.1	Resumo	37
3.2	Abstract.....	38
3.3	Introdução	39
3.4	Material e Métodos	40
3.4.1	Obtenção e análise do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> e monoterpenos	40
3.4.2	Obtenção dos oocistos	41
3.4.3	Testes <i>in vitro</i> da destruição dos oocistos	41
3.4.4	Teste <i>in vitro</i> da inibição da esporulação dos oocistos.....	42
3.4.5	Análise estatística para os testes <i>in vitro</i>	42
3.4.6	Resultados.....	43
3.4.7	Discussão	46
3.4.8	Conclusão	47
3.4.9	Referências Bibliográficas.....	48

4	CAPÍTULO III - Avaliação <i>in vitro</i> do efeito da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) em esporozoítos de <i>Eimeria arloingi</i>.	50
4.1	Resumo	51
4.2	Abstract	52
4.3	Introdução	53
4.4	Material e Métodos	54
4.4.1	Purificação da lectina <i>C. brasiliensis</i> (ConBr)	54
4.4.2	Preparação de <i>E. arloingi</i>	54
4.4.3	Obtenção dos esporozoítos <i>E. arloingi</i>	55
4.4.4	Ensaio de viabilidade de esporozoítos com a lectina ConBr	56
4.4.5	Análise estatística para os testes <i>in vitro</i> da viabilidade do esporozoítos de <i>E. arloingi</i>	56
4.5	Resultados	57
4.6	Discussão	59
4.7	Conclusão	61
4.8	Referências Bibliográficas	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BUVEC	Células endoteliais da veia umbilical bovina
Ca ²⁺	Cátion divalente de cálcio
DC ₅₀	Concentração de destruição
IC ₅₀	Concentração de inibição
LC ₅₀	Concentração letal
CO ₂	Dióxido de carbono
Con-A	Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ECGM	Meio suplemento para células
FKS	Soro fetal bovino
G	Gravitacional
g	Gramas
Gly	Glicina
kDa	Peso molecular expresso em Dalton
M	Molar
mL	mililitro
mg	miligrama
Mn ²⁺	Cátion divalente de manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
OE	Óleo essencial
Oopg	Oocistos por grama de fezes
ppm	Partes por milhão
p:v	Peso/volume
SRD	Sem raça definida
rpm	rotação por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Dodecil Sulfato de Sódio
SG/EM	Cromatográfica Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
UFS	Universidade Federal de Sergipe
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Eficácias e concentração letal dos efeitos do óleo essencial de *L. gracilis* em oocistos de *Eimeria* spp.....44
- Tabela 2:** Concentrações letais e inibitórias para oocistos de *Eimeria* dos principais monoterpenos presentes no óleo essencial de *L. gracilis*.....45

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Óleos essenciais analisados em ensaios para o controle de coccídios gastrointestinais.222
- Quadro 2:** Análise de ensaios com lectinas vegetais realizados em parasitas gastrointestinais266
- Quadro 3:** Compostos majoritários dos óleos essenciais de três genótipos de *L. gracilis* isolados por Cruz et al., 2013.....40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Forma infectante de <i>E. arloingi</i> . Oocisto esporulado (A) e esporozoítos (B). (Fonte: próprio autor)	177
Figura 2: Planta de <i>Lippia gracilis</i> . (Adaptado de Neto, 2018)	20
Figura 3: Vegetal arbustivo com inflorescência e folhas (A). Inflorescência de <i>C. brasiliensis</i> (B). Legume plano (C) e sementes monocromadas (D). Fonte: plantasdobrasil; http://chaves.rcpol.org.br/	24
Figura 4: Estrutura global do tetrâmero de ConBr e a localização das quatro subunidades. As esferas cinza e pretas representam os sítios de ligações dos metais de transição Mn^{2+} e Ca^{2+} . (Adaptado de Sanz-Aparicio et al., 1997)	25
Figura 5: Estrutura molecular do carvacrol (A) ρ -cimeno (B) e γ -terpineno (C) extraído de: (PEIXOTO-NEVES et al., (2010)	27
Figura 6. Gráfico representativo do número de oocistos destruídos após o tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	43
Figura 7. Efeito das concentrações de carvacrol na destruição dos oocistos de <i>Eimeria</i> spp.	45
Figura 8. Efeito das concentrações de carvacrol na inibição da esporulação dos oocistos de <i>Eimeria</i> spp.	45
Figura 9: Purificação de ConBr por cromatografia de afinidade (A) Cromatograma de extrato bruto de <i>Canavalia brasiliensis</i> em coluna Sephadex G-50. (B) SDS-PAGE. Pista1: Marcadores de massa molecular (fosforilase b, 97 kDa; albumina de soro bovino, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; anidrase carbica, 29 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa e - Lactalbumina, 14,4 kDa); Pista 2: PII.	57
Figura 10: Efeito das concentrações da lectina de <i>C. brasiliensis</i> (ConBr) na viabilidade dos esporozoítos de <i>E. arloingi</i>	58
Figura 11: Esporozoítos de <i>Eimeria arloingi</i> após contato com lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> . Esporozoítos viáveis (A) e na figura B, esporozoítos inviáveis de acordo com sua motilidade e morfologia. Nas figuras C e D estão representados de forma mais visíveis as características morfológicas.	59

RESUMO

A eimeriose ou coccidiose é uma doença frequente em caprinos, causada por protozoários do gênero *Eimeria*, responsável por prejuízos econômicos expressivos na produção de caprinos. O controle é realizado com quimioterápicos, que podem deixar resíduos na carne e leite e que podem induzir a resistência do parasita, nesse sentido, a utilização de produtos naturais de plantas podem tornar-se alternativa para o controle de *Eimeria*. O efeito dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* e lectinas tem sido demonstrando em diversos estudos aplicados à produção animal, no entanto, seus efeitos sobre *Eimeria* ainda são pouco conhecidos. Considerando a necessidade do desenvolvimento de tecnologias para o manejo sanitário animal utilizando a flora nativa da região, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do óleo essencial de *L. gracilis*, monoterpenos e da lectina isolada da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) sobre *Eimeria* de caprino. Diferentes concentrações de óleo essencial de *L. gracilis* e monoterpenos carvacrol, p-Cimeno e γ -Terpineno foram analisadas para viabilidade de oocistos de *Eimeria* spp e realizado estudo para análise da viabilidade de esporozoítos de *E. arloingi* sob ação da lectina ConBr. As análises mostraram que o genótipo 201 do óleo essencial de *L. gracilis* apresentou LC₅₀ de 4,56 mg/mL contra oocistos e os genótipos 108 e 109, destruíram 44,3% e 34,8% dos oocistos quando submetidos à 10 mg/mL. A inibição da esporulação dos oocistos pelo carvacrol foi observada na concentração inibitória (IC₅₀) de 0,42 mg/mL (IC 95% 0,35-0,50; R² 0,97) e a destruição dos oocistos obteve concentração letal (LC₅₀) de 0,963 mg/mL (LC 95% 0,87-1,07; R² 0,97), com aumento da destruição dos oocistos até a concentração de 7,0 mg/mL, com 9,92% de oocistos viáveis. Os monoterpenos p-Cimeno e γ -Terpineno não apresentaram eficácia quando analisados isoladamente. A proteína da lectina de *C. brasiliensis* apresentou concentração letal (LC₅₀) de 0,167 mg/mL (LC 95% 0,10-0,27; R² 0,67) para esporozoítos de *E. arloingi*. O presente trabalho, trata-se do primeiro realizado com a utilização de óleo essencial de *L. gracilis*, monoterpenos e da lectina de *C. brasiliensis* (ConBr) sobre oocistos e esporozoítos de *Eimeria* isolados de pequenos ruminantes, no qual mostraram a descrição da ação na destruição, inibição da esporulação dos oocistos e inibição da viabilidade dos esporozoítos de *E. arloingi*.

Palavras chave: Eimeriose, caprinos, manejo sanitário, compostos bioativos.

ABSTRACT

Eimeriosis or coccidiosis is a frequent goat disease caused by protozoa of the genre *Eimeria*, responsible for significant economic losses in goat production. The control is performed with chemotherapeutic agents, which can leave residues in meat and milk and which can induce the resistance of the parasite. In this sense, the use of natural plant products can become an alternative for the control of *Eimeria*. The effect of the essential oils of *Lippia gracilis* and lectins has been shown in several studies applied to animal production, however, their effects on *Eimeria* are still little known. Considering the need for the development of technologies for animal health management using the native flora of the region, the objective of the present study was to evaluate the effect of *L. gracilis*, monoterpenes and lectin isolated from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) essential oil on *Eimeria* de goat. Different concentrations of essential oil of *L. gracilis* and monoterpenes carvacrol, p-Cimeno and γ -Terpineno were analyzed for viability of *Eimeria* spp. oocysts and a study was performed to analyze the viability of *E. arloingi* sporozoites under ConBr lectin action. The analyzes showed that *L. gracilis* essential oil genotype 201 presented LC₅₀ of 4.56 mg/mL against oocysts and genotypes 108 and 109 destroyed 44.3% and 34.8% of oocysts when submitted to 10 mg/mL. Inhibition of oocyst sporulation by carvacrol was observed at an inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.42 mg/mL (95% CI 0.35-0.50; R2 0.97) and oocyst destruction resulted in lethal concentration (LC₅₀) 0.963 mg/mL (95% LC 0.87-1.07; R2 0.97), with increased destruction of oocysts to a concentration of 7.0 mg/mL with 9.92% viable oocysts. The p-Cimeno and γ -Terpineno monoterpenes were not effective when analyzed separately. *C. brasiliensis* lectin protein had a lethal concentration (LC₅₀) of 0.167 mg / mL (95% LC 0.10-0.27; R2 0.67) for *E. arloingi* sporozoites. The present work is the first one using *L. gracilis* essential oil, monoterpenes and *C. brasiliensis* lectin (ConBr) on *Eimeria* oocysts and sporozoites isolated from small ruminants in destruction, inhibition of oocyst sporulation and inhibition of viability of *E. arloingi* sporozoites.

Keywords: Eimeriosis, goats, sanitary management, bioactive compounds.

1 CAPÍTULO I- REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Introdução

A atividade de produção de pequenos ruminantes representa grande importância sócio econômica em todo o mundo, principalmente nas regiões de climas árido e semiárido (SIMPLÍCIO et al., 2003; LEITE, 2007). No Brasil, a caprinocultura está voltada para a produção de carne, pele, leite e seus derivados, constituindo-se em considerável fator de geração de renda e fonte saudável de proteína alimentar (NOGUEIRA FILHO et al., 2010).

As infecções parasitárias gastrointestinais afetam diretamente a produção de caprinos constituindo-se como um dos principais impactos na caprinocultura em diferentes países, principalmente em países tropicais como o Brasil (VIEIRA, 2004). Dentre as infecções parasitárias mais importantes destaca-se a coccidiose ou eimeriose.

A coccidiose ou eimeriose caprina é uma doença causada por um protozoário intracelular obrigatório do Gênero *Eimeria*, afeta uma variedade de animais, principalmente os pequenos ruminantes causando perdas significativas na produção (CAVALCANTE et al., 2012). Essas perdas são provocadas por alterações gastrointestinais, diminuição do apetite e redução no ganho de peso, aumento de índice de mortalidade entre animais jovens (VIEIRA, 1996; VIEIRA, 2000; LIMA, 2004) e exigência de medidas urgentes de controle (VIEIRA, 1996) o que culmina em gastos adicionais e não previstos nesse sistema produtivo.

O controle da eimeriose é feito através da combinação de práticas de manejo associada à utilização de quimioterápicos (LIMA, 2004), no entanto, o uso frequente, e de forma incorreta ou indiscriminada, dos quimioterápicos, podem selecionar populações resistentes de *Eimeria* (MC EVOY, 2002; PEEK & LANDMAN, 2003).

São escassos os estudos e disponibilidade de tecnologia para o controle da coccidiose de pequenos ruminantes, sendo a maioria dos estudos de detecção de resistência ou de controle da coccidiose realizados com *Eimeria* de aves (GONZALES, 2001; PEEK & LANDMAN, 2003).

Além disso, nenhum novo medicamento contra a *Eimeria* foi introduzido no mercado, nos últimos anos, tendo em vista que a legislação internacional favorece cada vez mais a abolição do uso de drogas anticoccidianas em animais destinado à alimentação humana (DORNE et al., 2013). Desta forma, faz-se necessário a busca por alternativas no controle de

Eimeria e a utilização de compostos bioativos pode se tornar eficiente no controle deste parasita.

Óleos essenciais extraídos de folhas e flores de plantas aromáticas de *Lippia gracilis*, também conhecida como alecrim-de-tabuleiro, são extraídos óleos essenciais (PASCUAL et al., 2001) que possuem na sua composição química os principais monoterpenos, carvacrol e timol (CRUZ et al., 2013). Estes podem atuar como controle alternativo para prevenção e tratamento da coccidiose devido a sua atividade antimicrobiana (ALI et al., 2015).

Além disso, proteínas bioativas, tais como lectinas, isoladas de plantas vêm sendo utilizadas em pesquisas com parasitas de pequenos ruminantes. As lectinas são caracterizadas como proteínas de origem não imunes, capazes de se unir a carboidratos com alta especificidade. Em vegetais, são isoladas principalmente das sementes (CAVADA et al., 2001) e têm demonstrado eficiência em parasitas gastrointestinais (IORDACHE et al., 2015; BATISTA et al., 2018). Isso é possível devido a capacidade da lectina em reconhecer a glicanos de superfícies celulares, glicanos estes que segundo Haslam et al. (1998) estão presentes nos parasitos.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade do óleo essencial e lectina de plantas da região Nordeste no controle de *Eimeria* de pequenos ruminantes.

1.2 Caprinocultura

A caprinocultura é uma das práticas pecuárias mais antigas do Brasil, cuja origem remonta aos tempos da ocupação portuguesa. É uma atividade difundida em todo território nacional, mas com uma maior concentração do rebanho na região Nordeste do Brasil, região que abriga 92,5% do Semiárido brasileiro (IBGE, 2016). A alta capacidade de adaptação dos caprinos a diferentes climas e ambientes, a oferta de alimento durante todo o ano e a facilidade do manejo são alguns dos fatores que influenciam para o crescimento da atividade no Nordeste (EMBRAPA, 2005).

Entre outros fatores importantes associados para o crescimento da caprinocultura na região Nordeste, estão a baixa necessidade de capital inicial, a capacidade de acumulação de renda em pequena escala, o elevado potencial de geração de ocupações produtivas, a fácil

apropriação sociocultural e a oferta de produtos com grande apelo em novos mercados (HOLLANDA JÚNIOR; MARTINS, 2008).

Pode-se perceber o crescimento apresentado no último censo do IBGE (2017), no qual os dados revelam que o crescimento da caprinocultura brasileira tem sido constante de 2006 a 2017, sendo que em 2017 o número de cabeças alcançou 8,55 milhões, um crescimento de 16% do efetivo rebanho comparado ao censo anterior divulgado em 2006. Dentre os Estados, o Maranhão é o 7º no ranking com mais de 356.302 cabeças (MAGALHÃES et al., 2017). Para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, a exploração caprina no Brasil tem como finalidade principal a produção de leite, na qual a relação de caprinos leiteiros e caprinos de corte é bem maior, embora os animais sejam na sua maioria de dupla aptidão (MAPA, 2005).

A carne caprina é considerada uma carne magra devido o baixo valor calórico, alto valor proteico, boa digestibilidade e aminoácidos essenciais. (HAENLEIN, 1992; LAWRIE, 2005). Não diferente, o leite de cabras é rico em gorduras (ácidos graxos de cadeia curta e saturada), proteínas (aminoácidos essenciais), vitaminas A e B e sais minerais (cálcio, selênio, fosfato) (CATUNDA et al., 2016) sendo, portanto, recomendado na alimentação humana principalmente infantil e de pessoas idosas.

Por mais que o mercado esteja em expansão e que novos investimentos estejam sendo feitos para a melhoria do aproveitamento de carne e leite destes animais, as endoparasitoses se constituem como um dos principais fatores limitantes na expansão deste setor no Brasil (RIET-CORREA et al., 2013), onde os prejuízos são mais acentuados na prevenção e tratamento dos animais doentes (VIEIRA, 2005).

1.3 Aspectos biológicos de *Eimeria* spp. em caprinos

Coccidiose ou eimeriose é uma infecção causada por protozoários intracelulares obrigatórios do Gênero *Eimeria* (VIEIRA et al., 2004) de ocorrência mundial, mas com ampla distribuição no Brasil (LIMA, 2004; MENEZES; HASSUM, 2005; BRITO et al., 2009) que afeta frangos de corte e pequenos ruminantes de todas as idades. Entretanto, é mais comum em animais jovens, recém-desmamados submetidos a diferentes sistemas de manejo (FOREYT, 1990; REBOUÇAS et al., 1992; PLATZER et al., 2005).

Para Foreyt, (1990) a infecção por esses protozoários intestinais é multiespecífica e embora haja semelhança morfológica dos oocistos das espécies parasitas de caprinos e ovinos,

existe uma estreita especificidade pelo hospedeiro, ou seja, as espécies pertencentes ao gênero *Eimeria* são específicas para cada espécie de hospedeiro (SHAPIRO, 2010).

Através da morfologia e morfometria é realizado a identificação das espécies de *Eimeria*. Diante disso, Lima (2004) apresentou as espécies mais patogênicas em quatro grupos de animais: (a) foram identificadas em bovinos *Eimeria bovis* e *E. zuernii*; (b) em búfalos *E. ahsta*, *E. bakuensis* e *E. ovinoidalis*; (c) ovinos *E. arloingi*, *E. alijevi*, *E. hirci*, *E. christenseni*; (d) caprinos considerada apenas uma, *E. ninakolhyakimovae*. Smith e Sherman (1994), verificaram que cerca de 16 espécies de *Eimeria* podem parasitar caprinos, mas apenas três tem uma patogenicidade de moderada a severa *E. arloingi*, *E. caprina*, *E. christenseni* e, apenas uma é considerada patogênica severa *Eimeria ninakolhyakimovae* concordando com Lima (2004). Enquanto Mancebo (2002) das 16 espécies, considera duas *E. arloingi* e *E. ninakohlyakimovae* com patogenicidade severa que podem levar até a morte do animal. As espécies *E. arloingi*, *E. alijevi* e *E. ninakohlyakimovae* de caprinos também foi relatado como as mais patogênicas no continente Europeu (YVORÉ et al., 1981; RUIZ et al., 2006) e nos Estados Unidos. Lima (1980) encontrou a prevalência de 98,8% de *E. arloingi* e *E. ninakohlyakimovae* 33,3%. Coccídios de pequenos ruminantes estão presentes em todo o mundo e é difícil dizer que uma distribuição geográfica é particular para uma outra espécie de coccidia.

A patogenicidade também varia de acordo com a espécie de *Eimeria* onde umas são consideradas mais patogênicas a ponto de apresentarem sinais clínicos, enquanto outras não são capazes de induzirem o aparecimento dos sinais (VIEIRA et al., 2004). As espécies *E. ninakohlyakimovae* e *E. arloingi* são consideradas as mais patogênicas em caprinos, que levam aos primeiros sinais clínicos. Além dos efeitos patogênicos dos parasitas devido à destruição das células epiteliais do intestino, a infecção coccidial interage com a microbiota digestiva (GOUET et al., 1984).

A doença pode ser identificada de duas formas, subclínica e clínica ou aguda: a forma subclínica é a mais comum da doença e, por não ser facilmente identificada, seu efeito tem impacto considerável em termos de eficiência de produção e saúde do rebanho (LIMA, 2004). A forma clínica ou aguda da doença afeta principalmente os animais mais jovens, com idade entre três semanas e cinco meses criados em qualquer sistema de produção (ROSA, 1996), causando uma intensa diarreia nestes animais (SMITH & SHERMAN, 1994) visto que a imunidade deles é baixa em comparação a de um animal adulto, tornando-se um fator limitante

no ganho de peso e, conseqüentemente, no crescimento do animal (KOUDELA & BOKOVA, 1998; LIMA, 2004; SAHINDURAN, 2012).

Considerada uma doença insidiosa, a eimeriose pode apresentar vários graus de infecção de assintomática a severa com a presença de fezes diarreicas de coloração escura, com sangramento, perda da mucosa intestinal, desidratação, perda de apetite e, conseqüentemente, perda de peso (LIMA, 2004), causando impacto diretamente na redução da produção.

As perdas econômicas são significativamente maiores por causa da redução da taxa de crescimento, no ganho de peso e susceptibilidade a doenças em animais afetados que propriamente por prejuízos ocasionados por morte (FITZGERALD, 1980; FOREYT, 1990; VIEIRA, 2005).

1.4 Taxonomia e ciclo biológico

O gênero *Eimeria* pertence ao reino Protista, subreino Protozoa, filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, subordem Eimeriina e família Eimeriidae (LEVINE et al., 1980). Os oocistos de *Eimeria* têm características morfológicas próprias, onde em cada oocisto apresenta quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada, totalizando oito esporozoítos por oocisto (Fig. 1), estes infectam as células intestinais para completar seu ciclo (FORTES, 1997; LIMA, 2004).

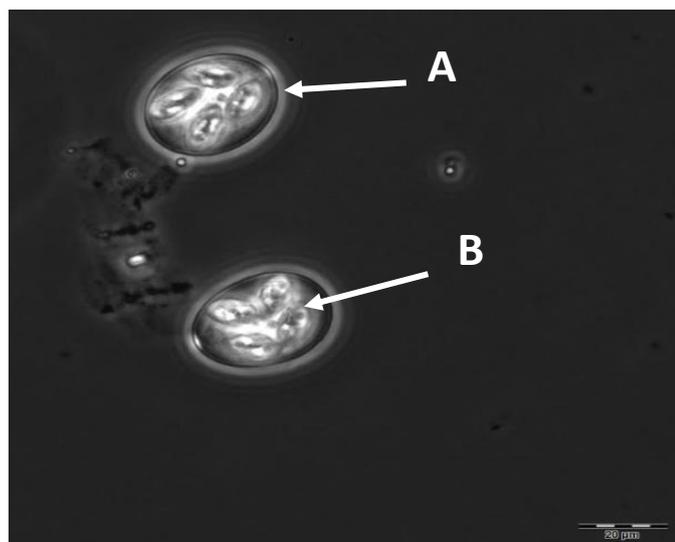


Figura 1. Forma infectante de *E. arloingi*. Oocisto esporulado (A) e esporozoítos (B). (Fonte: próprio autor)

Todos os membros do gênero *Eimeria* são monóxenos, ou seja, necessitam apenas de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida. Estes parasitas têm seu ciclo de vida dividido em duas fases: endógena e exógena. A fase endógena ocorre no hospedeiro, onde o parasita desenvolve suas fases nas células epiteliais do intestino e a exógena ocorre no ambiente, com a esporulação dos oocistos (VIEIRA, 2002).

O ciclo biológico inicia com a infecção dos animais que ocorre através da ingestão de água e alimento contaminado por oocistos esporulados. Ao chegarem no lúmen intestinal os esporozoítos são liberados dos oocistos com ação de enzimas digestivas, estes infectam as células intestinais, multiplicam-se de forma assexuada chamada de esquizonia, formando esquizontes de primeira geração. Essa fase ocorre no intestino delgado ou no início do intestino grosso, dependendo da espécie de *Eimeria* envolvida (LIMA, 2004; CHARTIER & PARAUD, 2012). Estes esquizontes originam centenas de merozoítos de primeira geração, levando ao rompimento da célula e liberando os merozoítos que infectam novas células.

Geralmente, a fase de merogonia (esquizogonia), formação de merozoítos com a infecção de novas células, ocorrem uma ou mais vezes (DENIZ, 2009) na última geração de merozoítos estes mudam para trofozoítos, diferenciam-se em macrogametas (feminino) e outros em microgametas (masculino), dando início à fase sexuada (gametogonia) (VIEIRA, 2002). Estes invadem células que possuem macrogameta, ocorre a fertilização e formação da parede dos oocistos, a célula se rompe e os oocistos não esporulados são liberados para o ambiente através das fezes (LIMA, 2004).

No meio ambiente ocorre a divisão por esporogonia, formando quatro esporozoítos em cada oocisto, tornando-se infectante e possibilitando a infecção por outro animal. Para que ocorra a esporulação, os oocistos necessitam de quantidade adequadas de umidade, temperatura e oxigênio (DENIZ, 2009). Durante todo o ciclo biológico a multiplicação dos coccídios causam alterações e destruição das células epiteliais, ocasionando desprendimento da mucosa intestinal e conseqüentemente hemorragia que são observadas nas fezes do animal (LIMA, 2004).

1.5 Tratamento e formas de controle

As estratégias de tratamento e controle da eimeriose devem ser realizadas considerando as características dessa enfermidade, caracterizadas como doença de rebanho. O controle é

realizado com a utilização de fármacos associados a medidas sanitárias e de manejo objetivando a redução da prevalência e do aparecimento de animais com sinais clínicos e pode ser procedido considerando cada categoria do rebanho. Já o tratamento é realizado com quimioterápicos em animais infectados objetivando a diminuição ou desaparecimento da apresentação clínica da doença (LIMA, 2004).

As medidas sanitárias como a limpeza diária das instalações, remoção das fezes do ambiente e o manejo da água e o acesso a água nas propriedades visam o impedimento ou a diminuição da ingestão dos oocistos esporulados (LIMA, 2004; MONTEIRO, 2011).

Os quimioterápicos são classificados como coccidiostáticos e coccidicidas e são utilizados geralmente após o aparecimento dos sinais clínicos como diarreia e desidratação e apresentam bons resultados quando administrados no início do aparecimento dos sinais (LIMA, 2004). Os coccidiostáticos, como as salomicinas, triazinonas e amprolio, atuam na fase assexuada do parasita (GRILLO & CARVALHO, 2014) e os coccidicidas, como as sulfamidas e os nitrofuranos, proibidos no Brasil devido a resíduos da droga na carne do animal, atuam na eliminação total do parasita estes (BRASIL, 2003; ORDAZ, 2011).

Grilo & Carvalho (2014) relatam que o fármaco mais utilizado, inclusive no Brasil, é o toltrazuril, pois apresenta uma redução significativa nos sinais clínicos. O toltrazuril age nos estágios de desenvolvimento intracelular, esquizogonia e gametogonia, interferindo na cadeia respiratória e na síntese de DNA do parasita (ALTREUTHER et al., 2011).

A falha no tratamento ou o uso constante e incorreto destas drogas podem colaborar para consequências danosas, como resíduos da droga na carne e no leite do animal e uma possível resistência do protozoário aos antiparasitários, poluição ambiental causado por tais drogas (HIDALGO ARGUELLO & CORDERO DEL CAMPILLO, 1999; MC EVOY, 2002; PEEK & LANDMAN, 2003; SOARES & DIAS, 2013), além de aumentos nos custos de produção (ABBAS et al., 2011). Nessa situação, os elementos citados indicam a necessidade do desenvolvimento de estratégias de controles alternativos.

1.6 Controle alternativo

A utilização de plantas medicinais, com fins terapêuticos, desperta o interesse para as investigações no intuito de desenvolver fitoterápicos (BITTENCOURT et al., 2002), que auxiliam no tratamento e controle de doenças provocadas por parasitas gastrintestinais. Diante

disso, estudos utilizando produtos naturais vem sendo realizados em pesquisas com os mais diferentes parasitos (REMMAL et al., 2011; FERNANDES et al., 2017; BATISTA et al., 2018; LÓPEZ et al., 2018). No entanto, são escassos os estudos envolvendo controle *Eimeria* de caprinos com produtos naturais ou extratos vegetais, considerando a grande variedade de espécies encontradas em todo o Brasil.

1.6.1 Características de *Lippia gracilis* e suas aplicações

O gênero *Lippia* possui muitas espécies de interesse medicinal e reúne cerca de 200 espécies representados por ervas, arbustos e pequenas árvores que são frequentemente aromáticas, com distribuição tropical e cerca de 150 espécies que estão distribuídas em campos rupestres e cerrados no Brasil (SALIMENA, 2002). *Lippia gracilis* é um arbusto caducifólio (Fig. 2), conhecido como alecrim-da-chapada. Essa espécie é endêmica da Caatinga, ocorrendo nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Sergipe, Piauí (LORENZI & MATOS, 2002), no semiárido do Estado de Pernambuco e em pequena parte do Rio Grande do Norte (MARRETO et al., 2008).

De suas folhas e flores é isolado o óleo essencial que apresenta atividade antimicrobiana, fungicida e leishmanicida, sendo utilizado para o tratamento de doenças cutâneas, queimaduras, feridas e úlceras (PASCUAL et al., 2001; MELO et al., 2013).



Figura 2: Planta de *Lippia gracilis*. (Adaptado de Neto, 2018).

Por esta razão, as espécies de *Lippia* vêm sendo exploradas para uso em diversas áreas da medicina veterinária, como na microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu potencial bioativos e à facilidade de produção agrônômica em escala (SOARES; TAVARES-DÌAS, 2013). Essa espécie também apresenta ação na redução da ocorrência de insetos em produtos armazenados, afetando o crescimento, desenvolvimento e reprodução de alguns insetos herbívoros (OLIVEIRA et al., 2011). Cruz et al., (2013) constataram que carvacrol e timol são os constituintes majoritários do óleo e estes têm potencial acaricida (COSTA-JÚNIOR, 2016).

Em relação a estudos com a utilização de óleos essenciais em protozoários de pequenos ruminantes, não foram encontrados na literatura, trabalhos científicos que reportam ação. Existem apenas alguns estudos *in vitro* e *in vivo* com a utilização de óleos essenciais em *Eimeria* de frango de corte (Quadro 1). Dentre os estudos, consta apenas um em que utilizaram extrato metanólico de frutos, no qual apenas López et al., (2018) testaram em oocistos e esporozoítos de *Eimeria ninakohlyakimovae* de caprinos. Diante disso, observa-se a necessidade de mais estudos sobre ação de compostos de plantas em eimeriose, uma vez que no decorrer dos anos tem demonstrado resultados satisfatórios para o controle destas doenças parasitárias.

Quadro 1: Óleos essenciais analisados em ensaios para o controle de coccídios gastrointestinais.

Espécie	Componente majoritário	Animal	Teste	Eficiência	Referência
<i>Origanum compactum</i>	Carvacrol:30,5% Timol:27,5%; γ-terpineno: 18,2%	Frango de corte	<i>In vitro</i>	Destruição dos oocistos	Remmal et al,2011.
<i>Artemisia absinthium</i>	P-tuiona: 64%; 1,8 cineol: 18%; P-cimeno: 9,6%; Sabineno: 7,8%	Frango de corte	<i>In vitro</i>	Reduziu em aproximadamente em 70% o número de oocisto	Remmal et al.,2011
<i>Eschinacea purpúrea</i>	*NA	Frango de corte	<i>In vitro</i>	Ocorreu a diminuição da invasão dos esporozoítos em células epiteliais	Burt et al., 2013
<i>Origanum vulgare</i>	Timol: 82% Carvacrol:18%	Frango de corte	<i>In vivo</i> . Suplementação do óleo na ração	Efeito na prevenção da coccidiose	Mohiti-Asli & Ghanaatparast-Rashti, 2015.
<i>Pandurata boesenbergia</i>	Tras-b-ocimeno:26,81% Cânfora: 23,17% 1,8-cineol: 16,92%	Frango de corte	<i>In vitro</i>	Com 70% de inibição da esporulação	Jitviriyanon et al., 2016
<i>Ruta pinnata</i>	NA	Caprinos	<i>In vitro</i>	Capacidade de inibição da esporulação	López et al., 2018

*NA: Não avaliado

1.6.2 Características da lectina de *Canavalia brasiliensis* e suas aplicações

As lectinas compõem um grupo de proteínas estruturais de origem não imunes capazes de reconhecer e se ligar a carboidratos. Elas estão presentes em todos os organismos vivos, sobretudo em vegetais onde atuam como mecanismo de proteção (CAVADA et al., 2001; POVIONELI, 2002). Nos vegetais as lectinas tem sido relatada e purificada de qualquer parte da planta, mas é nas sementes de muitas plantas que são encontradas e constituem até 10% do conteúdo total de proteínas de extratos de sementes maduras (BOLINI e CHRISPPEELS, 1978; WANG E NG, 1998). Devido suas características e propriedades bioquímicas, as lectinas vêm sendo utilizadas em diversas pesquisas médicas e biológicas, com atividade antifúngica (WANG & NG 2003; WANG & BUNKERS, 2000), antibacteriana (ORDÓÑEZ et al. 2006) e como antiparasitária (BATISTA et al., 2018).

Em protozoários, a função das lectinas está relacionada ao reconhecimento celular, aumento da adesão às células do hospedeiro durante os estágios iniciais (VIEIRA et al., 2012) e ligação do parasita a outras células, microrganismos (WOOTTON et al., 2007) e tecidos, aumentando assim a virulência (VIEIRA et al., 2012).

Canavalia brasiliensis é uma espécie pertencente ao gênero *Canavalia*, conhecido popularmente como feijão-de-porco, com distribuição no Nordeste, principalmente no Estado do Ceará. Das suas sementes (Fig. 3) são extraídas uma lectina (ConBr) que tem afinidade por glicose/manose. Esta lectina apresenta 99% de homologia com a lectina *Canavalia ensiformes* (ConA) nas suas propriedades físicas (SANZ-APARICIO et al., 1997; CAVADA et al., 2001). Diversas funções foram atribuídas a ConBr como, atividade anti-helmíntica (BATISTA et al., 2018), antifúngica (VASCONCELOS, 2010) e afeta o crescimento bacteriano (VASCONCELOS et al., 2012).



Figura 3: Vegetal arbustivo com inflorescência e folhas (A). Inflorescência de *C. brasiliensis* (B). Legume plano (C) e sementes monocromadas (D). Fonte: plantasdobrasil; <http://chaves.rcpol.org.br/>.

A estrutura cristalina da ConBr é demonstrada abaixo (Fig. 4), na qual mostra a conformação tetrâmero e a localização relativa das quatro subunidades, com as posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 (SANZ-APARICIO et al., 1997). A lectina de *C. brasiliensis* é que ConBr pode se ligar a estruturas de carboidratos que podem ser semelhantes ou idênticas, embora expostas de maneira diferente nas superfícies celulares, desencadeando a resposta de diferentes populações celulares ou diferentes efeitos quantitativos nas mesmas células (SANZ-APARICIO et al., 1997).

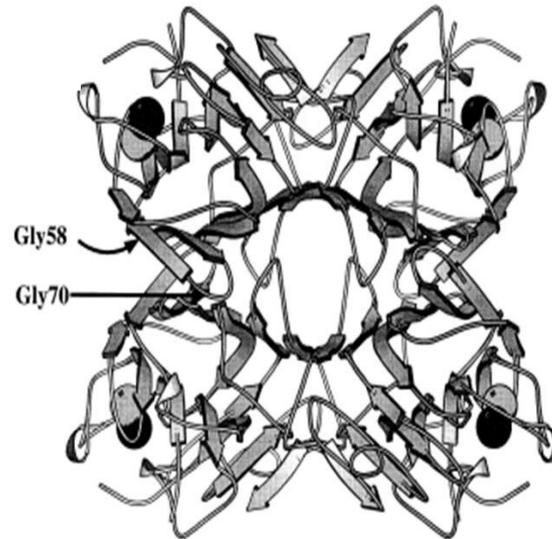


Figura 4: Estrutura global do tetrâmero de ConBr e a localização das quatro subunidades. As esferas cinza e pretas representam os sítios de ligações dos metais de transição Mn^{2+} e Ca^{2+} . (Adaptado de Sanz-Aparicio et al., 1997)

No quadro 2, estão apresentados os 3 (três) trabalhos envolvendo lectina vegetal nos demais parasitas de caprinos. Os estudos foram realizados *in vitro*, sendo o primeiro realizado em helmintos com a utilização da lectina de *C. brasiliensis* em ovos e larvas (L3) de *Haemonchus contortus*, no qual obtiveram a inibição do desenvolvimento larvar (BATISTA et al., 2018). No segundo trabalho, Fuller & McDougald (2002), estudaram 19 lectinas vegetais em esporozoítos de *Eimeria tenella* (*Eimeria* de frangos), no qual constataram que as lectinas específicas de manose, *Lens culinaris* e *Canavalia ensiformes*, se ligaram na superfície do parasita diminuindo sua viabilidade. No terceiro trabalho, Silva et al., (2019) utilizaram a lectina purificada de *Parkia platycephala* associada a Gentamicina nos testes *in vitro* contra ovos e larvas (L3) de *H. contortus* e observaram ação na inibição larvar.

Quadro 2: Análise de ensaios com lectinas vegetais realizados em parasitas gastrointestinais

Espécie	Parte	Parasita	Teste	Eficiência	Bibliografia
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Sementes	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i> em ovos e larvas	Inibição do desenvolvimento de <i>H. contortus</i>	Batista et al., 2018
<i>Lens culinaris</i> e <i>Canavalia ensiformes</i>	Sementes	<i>Eimeria tenella</i>	<i>In vitro</i> em esporozoítos	Ligaram-se a superfície dos esporozoítos diminuindo a viabilidade.	Fuller & McDougald, 2002
<i>Parkia platycephala</i>	Sementes	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i> em ovos e larvas	Inibição no desenvolvimento de larvas (L3) e aumento da atividade antibiótica da gentamicina contra cepas bacterianas multirresistentes	Silva et al., 2019

1.6.3 Características gerais dos monoterpenos carvacrol, ρ -cimeno e γ -terpineno

O monoterpeno carvacrol 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol é encontrado em diversas plantas aromáticas sendo biossintetizados a partir do γ -terpineno e do ρ -cimeno (NOSTRO & PAPALIA, 2012). O carvacrol também é conhecido como isopropil-o-cresol, ρ -cimeno-2-ol, 5-isopropil-2-timol ou iso-timol (DE VINCENZI et al., 2004). Apresenta-se na forma líquida em temperatura ambiente cuja solubilidade em água é de 830 ± 10 ppm (NOSTRO & PAPALIA, 2012). Outros compostos de natureza terpênica são encontrados no óleo essencial de *L. gracilis* como: ρ -cimeno e γ -terpineno (CRUZ et al., 2013; DOS SANTOS, 2016). Segundo Poulouze e Croteau (1978) a biossíntese de timol e carvacrol têm início na aromatização do ρ -cimeno a partir do γ -terpineno, que em seguida através de uma orto ou meta hidroxilação é, então, convertido a carvacrol ou timol, respectivamente (Fig.5). Segundo Santos et al., (2016), a biossíntese destes monoterpenos na planta em especial a espécie *L. gracilis* é afetada por fatores como: época de colheita, idade da planta, clima, estágio de desenvolvimento e características do solo desta forma, variando sua quantidade nas plantas.

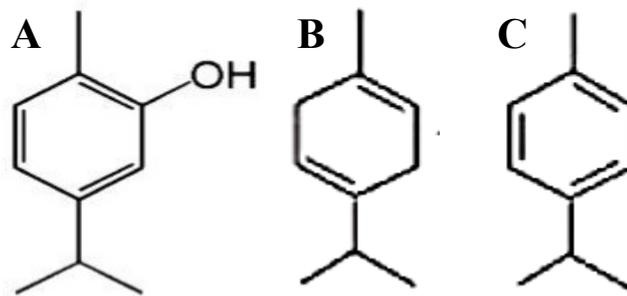


Figura 5: Estrutura molecular do carvacrol (A) ρ -cimeno (B) e γ -terpineno (C) extraído de: (PEIXOTO-NEVES et al., (2010)

1.7 Importância dos estudos *in vitro*

Considerando que os parasitas do Gênero *Eimeria* são altamente específicos para o hospedeiro e que suas reações intracelulares ou que induzem ao acionamento do sistema imune são muito específicas (ROSE, 1987; DALLOUT et al., 2007), é essencial que pesquisas sejam realizadas sobre suas formas infectantes. A realização de estudos *in vitro* sobre eficácia de diferentes associações de anticoccídeos tem se tornando uma ferramenta essencial para

entender a biologia do parasita e seu controle (ROSE, 1987; DALLOUT et al., 2007; TAUBERT et al, 2008; LÓPEZ-OSÓRIO et al., 2018; LÓPEZ et al., 2018).

1.8 Referências Bibliográficas

ABBAS, R.Z. ABBAS, Z. IQBAL, D. BLAKE, M.N. KHAN, M.K. Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. **World's Poult. Sci. J.**, 67, pp. 337–350, 2011.

ALI, B., AL-WABEL, N.A., SHAMS, S., AHAMAD, A., KHAN, S.A., ANWAR, F. Essential oils used in aromatherapy: a systemic review. **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.** 5,601–611, 2015.

BATISTA, K. L., SILVA, C. R., SANTOS, V. F., SILVA, R. C., ROMA, R. R., SANTOS, A. L., & COSTA-JÚNIOR, L. M. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and biochemical parasitology**, 225, 67-72, 2018.

BURT, S.A., TERSTEEG-ZIJDERVELD, M.H.G., JONGERIUS-GORTEMAKER, B.G.M., VERVELDE, L.,VERNOOIJ, J.C.M. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. **Vet. Parasitol.** 191, 374–378, 2013.

BRITO, D.R.B.; SANTOS, A.C.G.; TEIXEIRA, W.C.; GUERRA, R.M.SN.C. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciê. Anim. Brasil.** 10 (3):967-974, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de Junho de 2003 a. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos principais ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 4, Acesso em: 22 de dez. de 2018.

CATUNDA, K. L. M.; AGUIAR, E. M. de; SILVA, J. G. M. da; RANGEL, A. H. do N.. Leite caprino: características nutricionais, organolépticas e importância do consumo **Revista Centauro** v.7, n.1, p 34 - 55,On-line ISSN 2178-7573, 2016.

CAVADA, B. S; BARBOSA, T; ARRUDA, S; GRANGEIRO, T. B; BARRAL-NETTO M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, Hilversum, v.2, nº 2, p.123-135, Jun. 2001.

- CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF -1 ed. 603 p., 2009.
- CAVALCANTE, T.T.A.; MATIAS DA ROCHA, B.A.; CARNEIRO, V.A.; ARRUDA, FVS.; FERNANDES DO NASCIMENTO, A.S; SÁ, N.C.; SANTIAGO DO NASCIMENTO, K.; CAVADA B.S.; TEIXEIRA, E.H. Effect of lectins from diocleinae subtribe against oral streptococci. **Molecules**, 16,3530-3543, 2011.
- CAVALCANTE, A. C. R., TEIXEIRA, M., MONTEIRO, J. P., & LOPES, C. W. G. *Eimeria* species in dairy goats in Brazil. **Veterinary parasitology**, 183(3-4), 356-358., 2012.
- CHARTIER, C.; PARAUD, C. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. **Small Ruminants Research**, v.103, n.1, p.84-92, 2012.
- COSTA-JÚNIOR, L.M; MILLER, R.J; ALVES, P.B; BLANK, A.F; LI, A.Y; PÉREZ DE LEÓN, A.A. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**. 228: 60-64, 2016.
- CRUZ, O.M. ELIZANGELA DE; JUNIOR, C.M. LÍVIO; PINTO, O.A. JÉSSIKA; SANTOS, A. DARLISSON DE; ARAÚJO, A. SANDRA DE; BLANK, A.F. MARIA DE; BACCI, L.; ALVES, B. PÉRICLES; CAVALCANTI, H. C. SÓCRATES DE.;BLANK, F. ARIE. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 195, 198-202, 2013.
- DALLOUL, R. A., BLISS, T. W., HONG, Y. H., BEN-CHOUIKHA, I., PARK, D. W., KEELER, C. L., & LILLEHOJ, H. S. Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*. **Molecular immunology**, 44(4), 558-566, 2007.
- DE VASCONCELOS, M. A. Atividade das lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento “in vitro” de *Rhizobium tropici*. **Dissertação**. Universidade Federal do Ceará, 2010.
- DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, 75, 801-804, 2004.
- DE VASCONCELOS, M. A., CUNHA, C. O., ARRUDA, F. V. S., CARNEIRO, V. A., MERCANTE, F. M., DO NASCIMENTO NETO, L. G., ... & DOS SANTOS, R. P. Lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds (ConBr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* in vitro. **Molecules**, 17(5), 5244-5254, 2012.
- DENIZ, A. Coccidiose Ovina: Revisão Bibliográfica. **Albéitar**, v.3, p.4-11, 2009
- DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Industrial Crops and Products*, London, v. 79, p. 205-210, Jan. 2016.
- EMBRAPA – Caprinos e Ovinos. Sistemas de Produção. 2005. ISSN 1809-1822 –Versão Eletrônica.

FULLER, A.L.; MCDUGALD L.R., Lectin-binding by sporozoites of *Eimeria tenella*, *Parasitol. Res.* 88, 118–125. 2002.

FOREYT, W.J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. **Veterinary Clinics North American Food Animal Practice**, v.6, n.3, p.655-670, 1990

HAENLEIN, G.F.W. Chevon – meat cuts , 1992. <http://www.inform.umd.edu/EdRes>. Acesso em 16/12/2018.

HASSUM, I.C., MENEZES, R.C.A.A., 2005. Infecção Natural por Espécies do Gênero *Eimeria* em Pequenos Ruminantes Criados em Dois Municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 14, 95–100.

HASLAM S.M., G.C. COLES, A.J. REASON, H.R. MORRIS, A. DELL. The novel core fucosylation of *Haemonchus contortus* N-glycans is stage specific, **Mol. Biochem. Parasitol.** 15 (1998) 143–147.

HOLANDA JÚNIOR, V.; MARTINS, E. C. Análise da produção e do mercado de produtos caprinos e ovinos: o caso do território do sertão do Pajeú em Pernambuco. **Infoteca EMBRAPA**. 2008. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 06 fev. 2019

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Índice de Produção Pecuária: produção da pecuária municipal: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/19573-criacao-de-caprinos-e-ovinos-e-destaque-no-sertao-do-ceara>. Acesso: 22/06/2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Índice de Produção Pecuária: produção da pecuária municipal: Dados de 2006 e 2017. <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuário-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>. Acesso em: 13/05/2019.

IORDACHE, F. IONITA, M., MITREA, L.I. C. FAFANEATA, A. POP, Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins, **Curr. Pharm. Biotechnol.** 16,152–161, 2015.

JITVIRIYANON, S.; PHANTHONG, P.; LOMARAT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; PORNTRAKULPIPAT, S.; PARAKSA, N..*In vitro* study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, n. 228, p. 96-102. 2016

KOUDELA, B.; BOKOVA, A. Coccidiosis in goats in the Czech Republic. **Vet. Parasitol.**, 76:261–267, 1998.

LAWRIE, R. A. Ciência da carne. 6. ed. São Paulo: **Artmed**. 2005. 384 p.

LIMA, J. D. Coccidiose dos ruminantes domésticos **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1. Ouro Preto, MG, 2004.

LIMA, J.D. Eimeriose dos ruminantes. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2, Fortaleza. **Anais**. Brasília Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária: Embrapa, p. 7997, 1980.

LÓPEZ, A. M., MUÑOZ, M. C., MOLINA, J. M., HERMOSILLA, C., TAUBERT, A., ZÁRATE, R., ... & RUIZ, A. Anticoccidial efficacy of Canary rue (*Ruta pinnata*) extracts against the caprine apicomplexan *Eimeria ninakohlyakimovae*. *Journal of animal science*, 97(1), 101-110, 2018.

LÓPEZ-OSORIO, S., SILVA, L. M., TAUBERT, A., CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J., & HERMOSILLA, C. R. Concomitant in vitro development of *Eimeria zuernii*-and *Eimeria bovis*-macromeronts in primary host endothelial cells. *Parasitology international*, 67(6), 742-750, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2002. 512p.

MARRETO, R. N.; et al. Thermal analyses and gás chromatography coupled mass spectrometry analyses of hidroxipropylmetry analyses of hidroxipropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochemica Acta**. v. 475. p.53- 58. 2008.

MANCIBO, O. A.; ACEVEDO, C. M.; ROSSITER, A.; SUÁREZ, M. D.; GUARDIA, N.; RUSSO, A. M.; MONZÓN, C. M.; BULMAN, G. M., Coccidiosis em cabritos em la província de Formosa (Argentina). *Vet. Arg.*, v. XIX, n. 185, p. 342-348, 2002.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso em: 22/03/2019 <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprilinos-e-ovinos/saiba-mais>.

MAGALHAES, K., MARTINS, E., HOLANDA FILHO, Z. F., & de LUCENA, C. C. Pesquisa Pecuária Municipal: efetivo dos rebanhos caprilinos e ovinos. **Embrapa Caprilinos e Ovinos-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2017.

MENEZES, R.C.A.A.; LOPES, C.W.G. Epizootologia da *Eimeria arloingi*em caprilinos na Microrregião Serrana Fluminense. **Revista Universidade Rural, Ciência da Vida**, Rio de Janeiro, v.17, n.2, p.5-12, 1995.

MC EVOY, J. D.G. Contamination of animal feeding stuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. **Anal. Chim. Acta**, 473, pp. 3–26, 2002.

MOHITI-ASLI, M., & GHANAATPARAST-RASHTI, M. Dietarv oregano essential oil alleviates experimentally induced coccidiosis in broilers. **Preventive veterinary medicine**, 120(2), 195-202, 2015.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T.; Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.**, 7, 28-35, 2012.

ORDÓÑEZ, R. M., ORDÓÑEZ, A. A., SAYAGO, J. E., MORENO, M. I. N., & ISLA, M. I. Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**, 27(6), 1187-1191, 2006.

- ORDAZ, J. **La coccidiosis ovina, una enfermedad que limita la producción y es causa de mortandad de cordeiros.** (2011). Acesso em: 2 de nov. de 2018. Disponível em: <http://www.uno.org.mx/sistema/pdf/sanidad/lacoccidiosisovinaunaenfermedad.pdf>.
- OLIVEIRA, J.E.Z.; AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D. *Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais.* Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livroorg/medicinaismelhoramento.pdf>. Data de acesso: 11 de Novembro, (2019).
- PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review.* **Journal of Ethnopharmacology** 76, 201–214, 2001.
- PEEK, H.; LANDMAN, W.J.M. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2000. **Avian Pathology**, v.32, n.4, 2003.
- POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F., As múltiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP. , v.24, p.135-156, dez., 2002.
- POULOSE, A. J.; CROTEAU, Rodney. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 187, n. 2, p. 307-314, Apr. 1978.
- REMMAL, A.; ACHAHBAR, S.; BOUDDINE, L. CHAMI, N.; CHAMI, F. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. **Veterinary Parasitology**. 182, p.121-126, 2011.
- REBOUÇAS, M. M.; AMARAL, V.; TUCCI, E. C.; SPOSITO FILHA, E.; ALBERTI, H.; MURAKAMI, T. O. Identificação de espécies do gênero *Eimeria* Schneider, 1875 parasitas de caprinos no estado de São Paulo, Brasil (Apicomplexa: Eimeriidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 61-64, 1992.
- RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F.; Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido nordestino: controle integrado das parasitoses gastrointestinais visando contornar a resistência anti-helmíntica. **Pesq. Vet. Bras.** 33, 901-908, julho 2013.
- ROSE, M.E. Immunity to *Eimeria* infections **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 17, 333-343, 1987.
- ROSA, I. M. N. Contribuição para o estudo dos parâmetros considerados importantes para a determinação das cargas parasitárias presentes em três espécies 284 de Ruminantes (Ovinos, Caprinos e Bovinos). **Dissertação de Mestrado.** Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa, 535 pp. 1996.
- RUIZ, A., BEHRENDT, J. H., ZAHNER, H., HERMOSILLA, C., PÉREZ, D., MATOS, L., ... & TAUBERT, A. Development of *Eimeria* ninakohlyakimovae in vitro in primary and permanent cell lines. **Veterinary parasitology**, 173(1-2), 2-10, 2010.

SAHINDURAN, S. Protozoan Diseases in Farm Ruminants. **In A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine**. Dr. Carlos C. Perez-Marin. Intech. Rijeka. 473-500, 2012.

SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). 2002. **Darwiniana**. 40:121-125.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **IFEB Letters** 405, p.114-118, 1997.

SILVA, L. M., CHÁVEZ-MAYA, F., MACDONALD, S., PEGG, E., BLAKE, D. P., TAUBERT, A., & HERMOSILLA, C. A newly described strain of *Eimeria* arloingi (strain A) belongs to the phylogenetic group of ruminant-infecting pathogenic species, which replicate in host endothelial cells in vivo. **Veterinary parasitology**, 248, 28-32, 2017.

SHAPIRO, L.S. Endoparasites of Large Animals. **In Pathology & Parasitology for Veterinary Technicians**. 2th Ed. Shapiro, L.S. Delmar. Clifton Park. 184, 2010.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. (Eds.). **Coccidiosis. Goat medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.73-79. 1994.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.

TAUBERT A., HERMOSILLA C., SUHWOLD A., ZAHNER H., Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria* bovis primary and challenge infected

VASCONCELOS, M. A.; CUNHA, C.O.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; MERCANTE, F.M.; NETO, L. G. N.; SOUSA, G.S.; ROCHA, B. A. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; SANTOS, R. P. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds (ConBr) Is a Valuable Biotechnological Tool to Stimulate the Growth of *Rhizobium tropici* *in vitro*. **Molecules**, v.17. p. 5244-5254, 2012.

VIEIRA, L. S. *Eimeria* ninakohlyakimovae. Yakimoff & Rastegaieff, 1930 Emend. Levine, 1961: biologia, ultraestrutura e aspectos clínicos da infecção em caprinos experimentalmente infectados. 135 f. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1996.

VIEIRA, L. S. Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Sobral: Embrapa Caprinos**, 32 p., 2005.

VIEIRA, L.S. Eimeriose caprina: aspectos clínicos e de controle. **Ciência animal**, v.10, n.1.p. 31-33, 2000.

VIEIRA, L.S. Eimeriose de pequenos ruminantes: panorama da pesquisa no Nordeste do Brasil. Série Documentos 28. Sobral, CE: **Embrapa Caprinos**, 23p., 2002.

VIEIRA, P. B. et al. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de Mucosa: Entamoeba histolytica, Giardia lamblia e trichomonas vaginalis. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 58 - 70, 2012.

WANG, H. X.; BUNKERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 669-673, 2000.

WANG, H.X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

WOOTTON, E. C. et al. Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. **Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 216 – 222, Jan. 2007.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar a atividade anticoccidílica de produtos naturais em *Eimeria* de caprinos.

2.2 Específicos

- Avaliar *in vitro* ação anti-coccidílica de óleo essencial de *Lippia gracilis* e monoterpeno em oocistos de *Eimeria* sp.;
- Avaliar *in vitro* ação anti-coccidílica da lectina ConBr em esporozoítos de *Eimeria arloingi*;
- Determinar as concentrações de destruição (LC₅₀) e inibição (IC₅₀) dos compostos nos organismos testados.

3 **CAPÍTULO II - Avaliação da atividade coccidicida do óleo essencial de *Lippia gracilis* e monoterpenos em oocistos de *Eimeria* sp.**

Avaliação da atividade coccidicida do óleo essencial de *Lippia gracilis* e monoterpenos em oocistos de *Eimeria* sp.

3.1 Resumo

Eimeriose é uma doença endogastrointestinal causada por um protozoário do Gênero *Eimeria*, provocando prejuízos na produção de caprinos. Seu controle é realizado com produtos químicos, no entanto, há a necessidade de métodos alternativos de controle para eimeriose, haja vista que surge a resistência de populações ao tratamento tradicional baseado na utilização de bases químicas. Utilização de plantas do cerrado com potencial terapêutico vem sendo cada vez mais estudado. Dentre as espécies do cerrado, destaca-se a *Lippia gracilis*. *L. gracilis* é uma planta popularmente conhecida como “alecrim-da-chapada” endêmica do cerrado com potencial bactericida, leishmanicida, fungicida e acaricida. Diante disso, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficácia do óleo essencial de *L. gracilis* e monoterpenos na destruição e inibição da esporulação dos oocistos de *Eimeria* de caprinos. Diferentes concentrações de óleo essencial de *L. gracilis* (10; 7,0; 4,9; 3,43; 2,40; 1,68; 1,17 e 0,82 mg/mL) e dos monoterpenos carvacrol, p-Cimeno e γ -Terpineno foram testadas (2,4; 1,2; 0,6; e 0,1 mg/mL) em oocistos de *Eimeria* spp. no intuito de determinar as concentrações letal e de inibição na esporulação para oocistos. As análises mostraram que o genótipo 201 do óleo essencial *L. gracilis* apresentou LC₅₀ de 4,56 mg/mL na destruição dos oocistos e os genótipos 108 e 109, destruíram 44,3% e 34,8% dos oocistos submetidos à 10 mg/mL. A inibição da esporulação foi verificada apenas com o monoterpeno carvacrol na concentração inibitória de (IC₅₀) de 0,42 mg/mL e para a destruição obteve-se uma LC₅₀ na destruição de 0,96 mg/mL. Os monoterpenos p-Cimeno e γ -Terpineno isoladamente não apresentaram eficácia. Deste modo, o presente estudo demonstrou a descrição da ação do óleo essencial e monoterpenos sobre oocistos de *Eimeria* spp. isoladas de pequenos ruminantes. Além disso, este estudo fornece dados importantes relacionados a *Eimeria* sp. de pequenos ruminantes, bem como testar produtos naturais que venham a contribuir para o controle deste parasito

Palavras-chave: Eimeriose; controle; *Lippia gracilis*; monoterpenos.

Coccidicidal activity evaluation of *Lippia gracilis* essential oil and monoterpenes in *Eimeria* sp. oocysts

3.2 Abstract

Eimeriosis is an endogastrointestinal disease caused by a protozoan of the genus *Eimeria*, causing damage to goat production. Its control is carried out with chemicals, however, there is a need for alternative control methods for eimeriosis, given that the resistance of populations to traditional treatment based on the use of chemical bases arises. Use of cerrado plants with therapeutic potential has been increasingly studied. Among the cerrado species, *Lippia gracilis* stands out. *L. gracilis* is a plant popularly known as endemic cerrado "chapada rosemary" with bactericidal, leishmanicidal, fungicidal and acaricidal potential. Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficacy of *L. gracilis* essential oil and monoterpenes in the destruction and inhibition of sporulation of goat *Eimeria* oocysts. Different concentrations of *L. gracilis* essential oil (10; 7.0; 4.9; 3.43; 2.40; 1.68; 1.17 and 0.82 mg/mL) and the carvacrol monoterpenes, p-Cimene and γ -Terpinene were tested (2.4; 1.2; 0.6; and 0.1 mg/mL) on *Eimeria* spp. to determine lethal and sporulation inhibition concentrations for oocysts. The analyzes showed that *L. gracilis* essential oil genotype 201 presented LC₅₀ of 4.56 mg/mL in the destruction of oocysts and genotypes 108 and 109 destroyed 44.3% and 34.8% of oocysts submitted to 10 mg/mL. Inhibition of sporulation was verified only with the monoterpene carvacrol at the inhibitory concentration of (IC₅₀) of 0.42 mg/mL and for the destruction an LC₅₀ at the destruction of 0.96 mg/mL was obtained. The monoterpenes p-Cimeno and γ -Terpineno alone were not effective. Thus, the present study demonstrated the description of the action of essential oil and monoterpenes on *Eimeria* spp. isolated from small ruminants. In addition, this study provides important data related to *Eimeria* sp. small ruminants, as well as testing natural products that may contribute to the control of this parasite

Keywords: Eimeriosis; control; *Lippia gracilis*; monoterpenes.

3.3 Introdução

Os caprinos estão distribuídos por todo planeta, no entanto, percebe-se o maior efetivo do rebanho em regiões áridas e semi-áridas, devido a facilidade de adaptação por estes animais (MARTINS et al., 2016). No Brasil a caprinocultura é de elevada importância socioeconômica para produtores rurais, principalmente na região Nordeste, esta região abriga cerca de 92,5% do rebanho total (IBGE, 2016). Embora que o rebanho esteja em crescimento, a ocorrência de doenças gastrointestinais nesses animais merece estudo e controle, devido principalmente ao fato de serem atividades espalhadas geograficamente (CARDOSO et al., 2015).

Dentre as doenças causadas por parasitos gastrointestinais, destaca-se a eimeriose, doença causada por um protozoário do gênero *Eimeria*, que ao infectar o hospedeiro, provoca alterações gastrointestinais, diminuição do apetite e redução do ganho de peso (VIEIRA, 2000; LIMA, 2004) sendo responsável por perdas na produção e mortalidade no rebanho de caprinos e ovinos. Desta forma, essa enfermidade atua como um dos principais desafios na produção de caprinos (VIEIRA, 2005), limitando e exigindo medidas de controles urgentes.

No entanto, o uso frequente e de forma incorreta dos quimioterápicos, podem ser responsável pela seleção de populações resistentes de *Eimeria* tornando difícil o controle (MC EVOY, 2002; PEEK & LANDMAN, 2003). Atualmente, pesquisas estão focadas nas características fitoquímicas e farmacológicas de espécies do reino Plantae e nas suas diferentes aplicações. Os compostos oleosos aromáticos se destacam como umas das partes mais estudadas, pois têm demonstrado eficiente atividade antimicrobiana frente à patógenos de interesse médico-sanitário (DANTAS et al., 2010). No Brasil, pesquisas são realizadas com espécies do bioma Caatinga (MATOS, 1999) dentre as espécies, a *Lippia gracilis*, popularmente conhecida como alecrim-da-chapada, possui folhas simples e flores aromáticas.

No óleo essencial extraído desta espécie possui forte atividade bactericida, leshmanicida, carrapaticida e inseticida devido à presença dos componentes majoritários carvacrol, γ -Terpineno e p-Cimeno. (ALBUQUERQUE et al., 2006; BURT, 2007; DANTAS, et al 2010). Contudo, não se conhece a biotividade do óleo essencial de *L. gracilis* sobre protozoários de pequenos ruminantes.

Diante do potencial de utilização dessa planta e a necessidade de controle alternativos para *Eimeria* em caprinos, o presente trabalho objetivou-se avaliar *in vitro* ação anti-coccidicida de óleo essencial de *Lippia gracilis* e seus componentes majoritários carvacrol, p-Cimeno, γ -Terpineno em oocistos de *Eimeria* spp. de caprinos.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Obtenção e análise do óleo essencial de *L. gracilis* e monoterpenos

O óleo essencial de *L. gracilis* com seus genótipos 108, 109 e 201, usados no presente estudo, foram isolados e caracterizados sua composição química por Cruz et al., (2013) (Quadro 3), obtidos da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Partes aéreas e folhas coletadas no mesmo horário foram hidrodestiladas utilizando o aparelho Clevenger por 3 horas (GUENTHER, 1972).

A análise da composição química do óleo essencial foi feita através da cromatografia gasosa (Shimadzu, modelo QP5050A) acoplada a um espectrômetro de massa (GC-MS). A análise quantitativa dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia de gás de ionização de chama (FID), utilizando um Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os componentes do óleo essencial foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com os espectros disponíveis na base de dados de (NIST05 e WILEY8) (CRUZ et al., 2013).

Quadro 3. Compostos majoritários dos óleos essenciais de três genótipos de *L. gracilis* isolados por Cruz et al., 2013.

Constituinte	LGRA*-108	LGRA-109	LGRA-201
p-Cimeno	11,75 a	13,02 a	13,74 a
γ -Terpineno	8,81 b	8,55 b	21,11 a
Carvacrol	47,10 a	48,99 a	35,28 b

LGRA: *Lippia gracilis*. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Scott e Knott ($p < 0,05$) (Fonte: Cruz et al., 2013).

Além disso, considerando os compostos majoritários detectados nos óleos essenciais isolados de *L. gracilis* supracitados, foram utilizados também os monoterpenos carvacrol, p-Cimeno e γ -Terpineno isolados e adquiridos da empresa fabricante SIGMA-ALDRICH®.

3.4.2 Obtenção dos oocistos

Foram utilizados caprinos sem raça definida (SRD) de diferentes propriedades da região de Chapadinha – MA. Os oocistos foram obtidos pelos métodos de Gordon & Whitlock (1939) e Ueno e Gonçalves (1998) onde as fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, armazenadas em envelopes plásticos e acondicionadas em caixas térmicas com gelo (4-8°C).

No Laboratório de Parasitologia Aplicada da Universidade Federal do Maranhão, foi feita análise quantitativa e qualitativa através do Oopg (Oocisto por grama de fezes). Foram utilizadas 2 g de fezes, estas foram diluídas em 28 mL solução saturada de NaCl, procedida a filtração em quatro camadas de gazes e realizada a leitura dos oocistos em câmara de McMaster. Após análise de todas as amostras, foi realizada a limpeza e isolamento dos oocistos através do método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose saturada (SHEATHER, 1923). Cerca de 1,5 g de fezes foram maceradas, lavadas com solução fisiológicas (NaCl 0,9%) e depois centrifugadas a 1000 x G, por 10 min a 4 °C. Descartado o sobrenadante, foi ressuscitado o pellet em 50 mL de solução de sacarose e centrifugado novamente a 250 x G durante 10 min a 4 °C. Após esta segunda centrifugação, foi recuperado 10 mL do sobrenadante e diluído em 40 mL de solução de NaCl 0,9% e centrifugado a 2000 x G por 10 min a 4°C, logo em seguida o pellet foi recuperado e suspenso em 500 µL de solução NaCl 0,9%, foi feita contagem na câmara de Neubauer e cerca de 5×10^5 oocistos foram isolados. O material analisado foi armazenado em refrigeração a 4°C até a análise.

3.4.3 Testes in vitro da destruição dos oocistos

Os testes de destruição e inibição dos oocistos de *Eimeria* foram realizados seguindo metodologia descritas por Remmal et al. (2011) e Jitviriyanon et al. (2016), com algumas adaptações.

Inicialmente, foi feita a análise da destruição dos oocistos com óleo essencial de *Lippia gracilis* (genótipos 108, 109 e 201), foram utilizadas as concentrações iniciais de 10,0; 7,0; 4,9; 3,43; 2,40; 1,68; 1,17; 0,82 mg/mL, em triplicata, diluídas em Triton X-100 a 1%. Os controles foram diluídos em Triton X-100 a 1% em triplicata.

As soluções foram preparadas em tubos de ensaios de volume de 10 mL e depois foi transferido 1 mL de cada diluição para eppendorf de 2 mL. Posteriormente, foram adicionados 500µL de suspensão de oocistos isolados (item 4.1.2) contendo aproximadamente 1500 oocistos em cada concentração e nos respectivos controles. Foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 2000 x G por 10 min, a 4°C o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em eppendorf contendo Dicromato de Potássio (K₂Cr₂O₇) a 2,5% em volume final de 1500 µL, depois foram mantidos em presença de oxigênio a temperatura ambiente por 48 horas. Após esse período os oocistos foram quantificados de acordo com Gordon & Whitlock (1939), com algumas adaptações e analisados quanto a sua esporulação. As adaptações versaram principalmente na diluição onde foram utilizadas 50 µL da suspensão de oocistos para cada 750 µL de solução saturada de NaCl, em duplicata, para ser procedida a contagem e mensuração dos oocistos com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Oocistos deformados, sem micrópila e degenerados alguma parte da sua morfologia original, foram considerados destruídos.

3.4.4 Teste *in vitro* da inibição da esporulação dos oocistos

A análise da inibição da esporulação dos oocistos foi realizada com os monoterpenos p-Cimeno, carvacrol e γ -Terpineno (SIGMA-ALDRICH®). Foram utilizadas concentrações iniciais de 4,8; 2,4; 1,2; 0,6; 0,3 e 0,15 mg/mL, em triplicata, diluídas em Triton X-100 a 1%. Os controles foram diluídos em Triton X-100 a 1%. Todos os procedimentos adicionais seguiram a metodologia descrita do teste anteriormente no item “Testes *in vitro* da destruição dos oocistos”.

3.4.5 Análise estatística para os testes *in vitro*

Após a incubação final a porcentagem de oocistos viáveis foi calculada em comparação ao controle, segundo a fórmula: (média de oocistos expostos/média de oocistos controle) x 100, e a porcentagem dos oocistos esporulados e não esporulados foram determinadas para cada concentração dos materiais avaliados. As concentrações letais (CL₅₀) e inibitórias (IC₅₀) para

50% da população foram calculadas após transformação logarítmica dos valores das diluições, empregando o programa Graph Pad Prism Versão 6.

3.4.6 Resultados

Na análise sobre ação do óleo essencial de *Lippia gracilis* na destruição dos oocistos de *Eimeria*, na figura 6, os resultados demonstraram que o óleo essencial citado tem capacidade de interferir na viabilidade, conformação da morfologia normal dos oocistos, apresentando eficiente atividade coccidicida. A partir da concentração de 2,4 mg/mL de óleo essencial de *L. gracilis* nota-se ligeira diminuição na viabilidade dos oocistos (Fig. 6). O número de oocistos viáveis diminuiu consideravelmente a medida que havia o aumento da concentração do óleo essencial de *L. gracilis*, considerando assim sua eficácia na destruição dos oocistos de *Eimeria*. Essa diminuição se intensifica até a total destruição dos oocistos na concentração de 7,0 mg/mL, apresentando concentração letal (LC₅₀) de 4,56 mg/mL (Tab. 1).

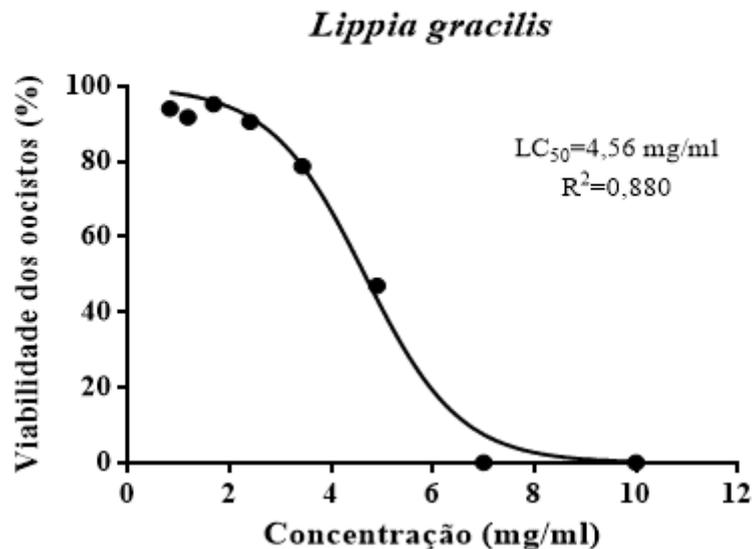


Figura 6. Gráfico representativo do número de oocistos destruídos após o tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de *L. gracilis*.

Quando expressa em relação a concentração letal 50% (LC₅₀), os nossos resultados mostram que a concentração do óleo essencial de *L. gracilis* tem sua eficiência em 4,56 mg/mL,

isso significa que nesta concentração foi possível a destruição de 50% dos oocistos de *Eimeria*. Em relação aos efeitos dos genótipos 108 e 109 de *L. gracilis*, foram destruídos 44,3% e 34,8% dos oocistos submetidos a estes genótipos, respectivamente. Nesse sentido, para esses genótipos não foi possível proceder aos estudos de LC₅₀ e IC₅₀ (Tab. 1).

Tabela 1. Eficácias e concentração letal dos efeitos do óleo essencial de *L. gracilis* em oocistos de *Eimeria* spp.

<i>Lippia gracilis</i>	Eficácia*	LC ₅₀	IC 95%	R ²
Genótipo LGRA-201	100,0%	4,56	4,07-5,11	0,880
Genótipo LGRA-108	44,3%	**	**	**
Genótipo LGRA-109	34,8%	**	**	**

*Eficácia em 10mg/mL; **Não avaliado

No presente estudo, o carvacrol obteve efeito coccidicida com concentração letal (LC₅₀) de 0,96 mg/mL (Tab. 2), com aumento da destruição dos oocistos até a concentração de 7,0 mg/mL (Fig. 6) e com 9,92% de oocistos viáveis. Os resultados evidenciam a capacidade do monoterpeno carvacrol de interferir na viabilidade dos oocistos demonstrando atividade coccidicida.

A inibição da esporulação dos oocistos pelo carvacrol foi observada na concentração inibitória (IC₅₀) de 0,42 mg/mL (Tab. 2). Em concentrações acima de 1,2 mg/mL, somente 20%, aproximadamente, dos oocistos esporularam, indicando ação coccidiostáticas ou inibitória, e a concentração inibitória (IC₅₀) de 0,42 mg/mL, foi responsável pela inibição da esporulação de 50% dos oocistos de *Eimeria* (Fig. 7).

Da mesma forma de modo isolado, os monoterpenos γ -Terpineno e p-Cimeno não obtiveram resultados ótimos na inibição e destruição dos oocistos (Tab. 2).

Tabela 2. Concentrações letais e inibitória, para oocistos de *Eimeria* dos principais monoterpenos presentes no óleo essencial de *L. gracilis*.

Monoterpenos	Eficácia (%)*	IC ₅₀ /LC ₅₀	IC 95%	R ²
	100,0	CI ₅₀ 0,42	0,35-0,50	0,970
Carvacrol	100,0	CL ₅₀ 0,96	0,87-1,07	0,972
γ-Terpineno	64,4	** **		**
p-Cimeno	31,1	** **		**

*Eficácia em 10 mg/mL; **Não avaliado

Os testes realizados com carvacrol para avaliar os efeitos da inibição da esporulação dos oocistos, mostraram resultados satisfatórios. As concentrações acima de 1,2 mg/mL, somente 20%, aproximadamente, dos oocistos esporularam, indicando ação coccidiostática ou inibitória, e a concentração inibitória para monoterpeno carvacrol (IC₅₀) detectada foi de 0,42 mg/mL, concentração esta que foi responsável pela inibição da esporulação de 50% dos oocistos de *Eimeria* (Fig. 8).

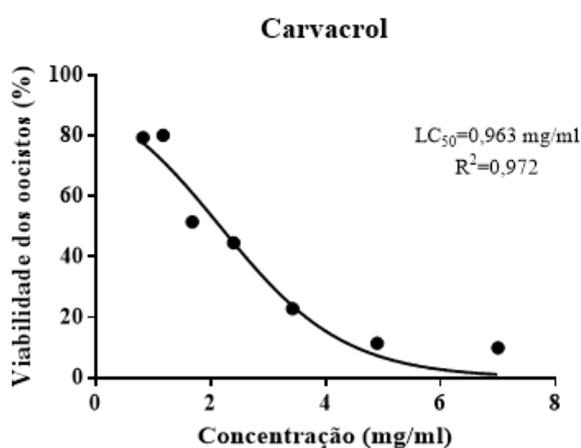


Figura 7: Efeito das concentrações de carvacrol na destruição dos oocistos de *Eimeria*.

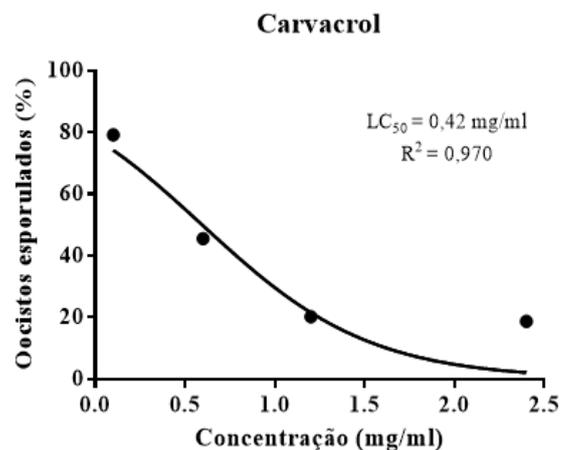


Figura 8: Efeito das concentrações de carvacrol na inibição da esporulação dos oocistos de *Eimeria*.

3.4.7 Discussão

Estudos relacionados atividade de óleos essenciais em parasitos de pequenos ruminantes são escassos, no entanto, *L. gracilis* tem sido descrita com alta atividade antimicrobiana por ter em sua composição como componente majoritário o carvacrol que associado ao timol, podem ter a capacidade de desintegrar a membrana externa de bactérias liberando lipopossacarídeos ao ponto de resultar a morte da célula bacteriana, conforme descrito por Knowles et al., (2005). Essa interação positiva pode ter relação com o sinergismo aonde dois ou mais agentes em combinação exercem efeito inibitório maior que cada agente isolado (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

Há evidências de que alguns componentes presentes em menor quantidade que os compostos fenólicos, como γ -terpineno e p-cimeno, interferem na atividade antimicrobiana por também produzirem efeito sinérgico entre os demais componentes (PASTER et al., 1995).

Os óleos essenciais em sua maioria são constituídos por monoterpenos e suas combinações podem levar a efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos. (DUBEY et al., 2003) e de acordo com o relato de Greay & Hammer (2011), monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória, o que pode interferir na esporulação dos oocistos.

O resultado encontrado com o genótipo 201, evidencia um possível sinergismo responsável pela ação coccidicida. No presente estudo, como já mencionado, o carvacrol é o composto majoritário encontrado no genótipo 201 do óleo essencial de *L. gracilis*, genótipo que obteve LC_{50} 4,56mg/mL. Além disso os monoterpenos γ -Terpineno e p-cimeno também são compostos com concentrações altas nesse óleo essencial e o γ -Terpineno se apresentou como composto secundário apenas no genótipo 201 (quadro 3). Considerando que os genótipos 108 e 109 não apresentaram eficácia na concentração de 10 mg/mL, e que esses dois genótipos citados também possuem o carvacrol como composto majoritário e apenas o p-cimeno como composto secundário, percebe-se a importância da alta concentração do monoterpeno γ -Terpineno (21,11%), para a ação sinérgica com o a alta concentração do carvacrol (35,28%) encontrada no genótipo 201 do óleo essencial de *L. gracilis*. Remmal et al., (2011) afirmam que os efeitos encontrados em seu estudo, podem ter relação com o sinergismo, principalmente relacionado ao timol que representou 27,5% da composição do óleo essencial de *Origanum*

vulgare (Orégano). A atividade do OE foi devido à capacidade de romper a barreira de permeabilidade da membrana dos microrganismos, inibindo a respiração (Remmal et al., 2011). No entanto, no presente estudo, o timol corresponde a 5,78% do óleo essencial de *L. gracilis*.

O número de oocistos viáveis diminuiu significativamente à medida que havia o aumento da concentração do monoterpeno, constatando assim a sua eficácia na destruição dos oocistos de *Eimeria*. Confirmando com os resultados obtidos por Remmal et al., (2011) onde observou que o número de oocistos diminuiu com o aumento das concentrações de dois fármacos antiparasitários testados.

Quando expressa em relação à concentração letal 50% (LC₅₀), os nossos resultados mostram que a concentração do monoterpeno tem sua eficiência em 2,4 mg/mL, isso significa que nesta concentração foi possível a destruição de 50% dos oocistos de *Eimeria* isoladas. Achahbar et al., (2012) concluíram, em seu trabalho com frangos que 4 mg/mL de carvacrol foi suficiente para destruir 90% dos oocistos de *Eimeria* por um período de quatro horas. Ahmad et al., (2011), estudando a atividade fungicida do timol e do carvacrol para interromper a biossíntese do ergosterol e integridade da membrana contra *Candida*, demonstraram que o carvacrol inibiu o crescimento de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, sendo que a concentração inibitória mínima para as espécies sensíveis variou de 75 a 90 µg/mL e para as resistentes a concentração inibitória mínima variou de 75 à 100 µg/mL.

Franco (2017) analisando o efeito *in vitro* do monoterpeno carvacrol sobre larvas não ingurgitadas de *Amblyomma dubitatum*, constatou que o percentual de mortalidade de 100% foi obtido a partir da concentração de 15 mg/mL, porém sendo estatisticamente similar a concentração de 7,5 mg/mL e 10 mg/mL.

3.4.8 Conclusão

Dentre os três genótipos testados de *Lippia gracilis*, apenas o genótipo 201 teve efeito na destruição dos oocistos de *Eimeria* spp., com a concentração de destruição (DC₅₀) de 4,56 mL. Para a inibição da esporulação dos oocistos o monoterpeno Carvacrol demonstrou uma possível atividade coccidicida com na concentração de inibição (IC₅₀) de 0,42 mL e (LC₅₀) de 0,42 mL.

O conhecimento atual dos potenciais efeitos anticoccidianos através da utilização de óleos essenciais ou monoterpenos, como apresentado neste estudo, pode fornecer orientações para o uso de componentes naturais no controle da coccidiose.

3.4.9 Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, C. CAVALCANTI DE; CAMARA, T. R.; MARIANO, R DE LIMA R.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian archives of biology and technology: an international journal**. V.49, n. 4, p. 527-535, Jul. 2006

BURT, SARAH ANN. Antibacterial activity of essential oils: potential application in food. Netherlands, **Utrecht: Utrecht University**. ISBN/EAN: 978-90-393-4661-7, 2007.

CRUZ, O.M. E. DE; JUNIOR, C.M. L.; PINTO, O.A. J; SANTOS, A. D. DE; ARAÚJO, A. SANDRA DE; BLANK, A.F. M. DE; BACCI, L.; ALVES, B. P.; CAVALCANTI, H. C. S. DE.;BLANK, F. ARIE. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 195, 198-202, 2013

CARDOSO, M., PINO, F., FEDERSONI, I., LUCCHESI FILHO, A., & FELÍCIO, A. Caracterização da caprinocultura e ovinocultura no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, 82(1), 1-15., 2015.

DANTAS, L. I. S., DA ROCHA, F. Â. G., DE MEDEIROS, F. G. M., & DOS SANTOS, J. A. B. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* schauer sobre patógenos de importância na indústria dealimentos. **Holos**, 5, 114-123, 2010.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R.; An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **J. Biosci.**, 28, 637–646, 2003.

GREAY, SJ & HAMMER, KA. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, abr. 2011.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A. New technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Índice de Produção Pecuária: produção da pecuária municipal: Dados de 2006 e 2017. <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuário-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>. Acesso em: 13/05/2019.

MARTINS, E. C., MAGALHAES, K., DE SOUZA, F., GUIMARAES, V., BARBOSA, C., & HOLANDA, F. Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. *Embrapa*

Caprinos e Ovinos-Artigo de Avances de la Investigación Sobre Producción Animal y Seguridad Alimentaria en México, 2016.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; SILVA, M.G.V. Medicinal plants of northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. and *Lippia gracilis* H.B.K. (Verbenaceae). **J. Essent. Oil Res.** 11, 666-668,1999.

MC EVOY, J.D.G. Contamination of animal feeding stuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. **Anal. Chim. Acta**, 473, pp. 3–26, 2002.

PEEK, H.; LANDMAN, W.J.M. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2000. **Avian Pathology**, v.32, n.4, 2003.

REMMAL, A.; ACHAHBAR,S.; BOUDDINE, L. CHAMI, N.; CHAMI, F. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. **Veterinary Parasitology**. 182, p.121-126, 2011.

SHEATHER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. **J Comp Ther.** 36:266-75., 1923.

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

VIEIRA, L.S. Eimeriose caprina: aspectos clínicos e de controle. **Ciência animal**, v.10, n.1.p. 31-33, 2000.

VIEIRA, L. S. Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Sobral: Embrapa Caprinos**, 32 p., 2005.

4 **CAPÍTULO III - Avaliação *in vitro* do efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em esporozoítos de *Eimeria arloingi*.**

Avaliação *in vitro* do efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em esporozoítos de *Eimeria arloingi*.

4.1 Resumo

Eimeria arloingi é um protozoário que causa a doença eimeriose. É considerada um dos parasitas endogastrointestinais mais importantes que atingem caprinos em todo o mundo, causando prejuízos na caprinocultura. Dentro do gênero *Eimeria*, esta espécie é altamente patogênica devido a formação de macromerontes e lesões intestinais graves. Nesse contexto, a utilização de produtos à base de plantas pode ser um método de controle eficaz para *E. arloingi*, haja vista uma possível resistência deste parasita aos fármacos anticoccidiais. Existem nas superfícies de esporozoítos do gênero *Eimeria* estruturas de glicanos que são reconhecidos e podendo se ligar por lectinas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar atividade anti-coccidicida da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em esporozoítos de *Eimeria arloingi*. A lectina foi diluída em NaCl 0.15 M, posteriormente foram procedidas as cinco diluições seriadas com concentrações de 1; 0.5; 0.25; 0.125 e 0.0625 mg/ml em triplicata. Foram adicionados cerca 3.3×10^3 esporozoítos em cada concentração e incubadas por 3 hs. A viabilidade dos esporozoítos foi analisada quanto a sua motilidade e quanto à refração da luz na microscopia ótica. A proteína da lectina de *C. brasiliensis* apresentou concentração letal (LC₅₀) de 0,167 mg/mL (LC 95% 0,10-0,27; R2 0,67) para esporozoítos de *E. arloingi*. Houve a redução da motilidade dos esporozoítos à medida que havia o aumento das concentrações da ConBr. Dessa maneira, os nossos achados sugerem que ação da lectina está relacionada ao reconhecimento de glicanos presentes na superfície desses esporozoítos, no entanto, ainda não foi possível identificar. Este trabalho é o primeiro a relatar ação de lectina vegetal em protozoário de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: *Eimeria arloingi*; ConBr; atividade anti-coccidicida;

***In vitro* evaluation of the effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) on *Eimeria arloingi* sporozoites.**

4.2 Abstract

Eimeria arloingi is a protozoan that causes eimeriosis disease. It is considered one of the most important endogastric parasites affecting goats worldwide, causing damage to goats. Within the genus *Eimeria*, this species is highly pathogenic due to the formation of macromerons and intestinal lesions. In this context, the use of herbal products may be an effective control method for *E. arloingi*, and there may be a possibility of resistance of this parasite to anticoccidic drugs. There are glycan structures on the surfaces of genus *Eimeria* sporozoites that are recognized and can be activated by lectures. Thus, the aim of the present study was to evaluate the anticoccidic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr) in *Eimeria arloingi* sporozoites. One class was diluted in 0.15 M NaCl, then processed as five serial 1 dilutions; 0.5; 0.25; 0.125 and 0.0625 mg / mL in triplicates. About 3.3×10^3 sporozoites were used at each concentration and incubated for 3 h. The viability of sporozoites was analyzed for motility and refraction of light microscopy. One lectin protein from *C. brasiliensis* had a lethal concentration (LC_{50}) of 0.167 mg / mL (95% LC 0.10-0.27; R^2 0.67) for *E. arloingi* sporozoites. Sporozoite mobility decreased as ConBr variations increased. Thus, our suggested results on the action of the speaker are subject to the recognition of glycans present on the surfaces of these sporozoites, however, it has not yet been possible to identify. This work is the first to report a protozoan plant reading action of small ruminants.

Keywords: *Eimeria arloingi*; ConBr; anti-coccidicidal activity.

4.3 Introdução

Eimeria arloingi é um protozoário do filo Apicomplexa que infecta caprinos, altamente patogênico devido a formação de macromerontes e lesões intestinais graves (RUIZ et al., 2006; SILVA et al., 2017). E é considerado um dos parasitos mais importantes na caprinocultura, devido aos gastos com prevenção dos animais saudáveis e tratamentos dos animais doentes (LIMA, 2004).

O controle é realizado com fármacos anticoccidiais no entanto, ao longo dos anos com a utilização frequente e de forma incorreta, podem ser responsáveis pela seleção de populações resistentes de *Eimeria* tornando difícil o controle, além da contaminação da carne e leite do animal pelos resíduos da droga (MC EVOY, 2002; PEEK & LANDMAN, 2003). Com isso, aumenta a necessidade de desenvolvimento de drogas que sejam alternativas e eficazes.

Os parasitas possuem moléculas na sua superfície que podem atuar como moléculas-chaves para alvo de uma nova droga como, os glicanos. Esta molécula foi identificada na superfície de *Haemonchus contortus* e possui potencial na imunomodulação e imunidade protetora, como moléculas alvo para anticorpos antiglicanos ou lectinas com efeitos antiparasitários (PASCHINGER & WILSON, 2015; BATISTA et al., 2018).

Cavada et al., (2001) definem lectina como um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, de origem não imunes que são capazes de unir a carboidratos ou glicoconjugados com alta especificidade. Devido suas características e propriedades bioquímicas, as lectinas vêm sendo utilizadas em diversas pesquisas médicas e biológicas, com atividade antifúngica (WANG & NG 2003; WANG & BUNKERS, 2000), antibacteriana (ORDÓÑEZ et al. 2006) e como antiparasitária (BATISTA et al., 2018). Em protozoários, a função das lectinas está relacionada ao reconhecimento celular, aumento da adesão às células do hospedeiro durante os estágios iniciais (VIEIRA et al., 2012) e ligação do parasita a outras células, microrganismos (WOOTTON et al., 2007) e tecidos, aumentando assim a virulência (VIEIRA et al., 2012).

Estas moléculas mediam frequentemente as interações entre células hospedeiras por parasitas do filo Apicomplexa *in vitro*, moléculas semelhantes a lectina localizadas na superfície dos esporozoítos (STROUT et al., 1994). A reação das lectinas, com carboidratos na superfície dos esporozoítos de *Eimeria* já foram relatadas em *E. stiedae* (JOHN et al., 1999), *E. tenella* (BABA et al., 1996) e *E. nieschulzi* (CHBOUKI e DUBREMETZ 1982; TILLEY & UPTON 1990).

ConBr, é uma lectina isolada da leguminosa *Canavalia brasiliensis* e possui afinidade por glicose/manose (CAVADA et al., 2001). Sua sequência de aminoácidos é 99% homóloga a sequência de Con-A (*Canavalia ensiformes*) e apresenta a mesma especificidade a glicose/manose (SANZ-APARICIO et al., 1997), mesmo sendo semelhantes estruturalmente, podem apresentar atividades biológicas distintas (RAMOS et al., 2002).

A ação antiparasitária por lectinas vegetais ainda é pouco estudada no entanto, já existem alguns estudos que demonstram efeitos sobre os diferentes parasitos. Fuller & MCDolgald, (2002) constataram que a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA) tem ação em esporozoítos de *Eimeria tenella*. E recentemente, Batista et al., (2018) verificaram ação anti-helmíntica da ConBr, quando analisado em larvas e ovos de *Haemonchus contortus*.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar *in vitro* o efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* em esporozoítos de *Eimeria arloingi* e determinar a concentração letal de 50% (LC₅₀).

4.4 Material e Métodos

4.4.1 Purificação da lectina *C. brasiliensis* (ConBr)

A lectina utilizada neste estudo foi isolada e purificada por Batista et al., (2018), conforme descrito por Moreira e Cavada (1984) na Universidade Federal do Maranhão, campus de Chapadinha, no Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular. Sementes de *C. brasiliensis* foram utilizadas em forma de pó fino, moídas com auxílio de um moinho de café e as proteínas solúveis foram extraídas a 25 ° C por agitação contínua com NaCl 0,15 M [1:10 (p: v)] por 4 h, seguido de centrifugação a 10.000 × G a 4 ° C por 20 min. A purificação das proteínas foi realizada pelo protocolo de cromatografia de afinidade, conforme descrito por Moreira e Cavada (1984), utilizando uma coluna Sephadex G-50 (2 × 10 cm). Esta fração (lectina de *C. brasiliensis* - ConBr) foi liofilizada e testada quanto à pureza por SDS-PAGE Laemmli (1970).

4.4.2 Preparação de *E. arloingi*

A presente metodologia foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Parasitologia da Justus Liebig University Gießen na Alemanha.

Os oocistos foram obtidos a partir de fezes de caprinos infectados com cepa de *Eimeria arloingi* (> 95% de pureza) isoladas em estudo desenvolvido por Silva et al., (2017), a partir do 18º dia pós infecção, durante cinco dias consecutivos. Os caprinos eram mantidos em condições de isolamento sanitário no instituto supracitado. As fezes sem contato direto com o ambiente, foram coletadas, lavadas com água corrente com auxílio de peneiras de inox nos tamanhos de 850 µm, 250 µm e 80 µm, e deixado em baldes para sedimentar por 24 h. Depois, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi misturado com solução de açúcar de 1:1 e em seguida foram transferidas para bandejas enchendo até a borda e em seguida foi colocada uma placa de vidro por no mínimo 2 h. Passado esse tempo, o vidro foi retirado e lavado, este material retirado do vidro foi colocado na geladeira à 4 °C por no máximo 5 dias ou até terminar todos procedimentos de coleta.

Todo o material foi centrifugado a 2000 rpm/10 min./Brake 0 posteriormente colocado em Dicromato de Potássio à 2,5% (Hermosilla et al., 2002) e levado para ser oxigenado até que 70-80% dos oocistos estavam esporulados, fez se contagem da quantidade de oocistos por mL com a câmara de Neubauer. Em seguida, foi colocado em frascos T75 com tampa de filtro, feito a identificação e levado para o refrigerador à 4°C para serem utilizados nos estudos.

4.4.3 Obtenção dos esporozoítos *E. arloingi*

Foi utilizado no total $3,3 \times 10^3$ esporozoítos de *E. arloingi*, obtidos de acordo com os protocolos de excitação de oocistos de Hermosilla et al., (2002) com algumas modificações. Inicialmente, foi adicionado à solução de Hipoclorito de Sódio à 4% em 20 mL de solução de oocistos, descartado o sobrenadante e o pellet foi agitado magneticamente no balde de gelo por 20 min. Em seguida, os oocistos foram misturados em um vortex por 15 s e depois centrifugado a 1100 rpm x 5 min. O sobrenadante foi coletado e misturado com água destilada 1:1 e o pellet foi centrifugado à 1700 rpm x 15 min, os oocistos estavam no pellet. Posteriormente, foi filtrado com utilização de filtro de 40 µm e 10 µm, centrifugado novamente à 1700 rpm x 15 min, depois disso foi descartado o sobrenadante e ressuspendido com 5 mL de L-cisteína estéril HCl/0,2 M e incubado por 20 h à 37° C a 100% de CO₂.

No segundo dia, os oocistos foram ressuspendido com Hank's solução salina equilibrada (HBSS, Gibco) contendo 0.4% de tripsina (Sigma-Aldrich) e 8% bile bovina esterilizada obtida de um talho local até 37°C à 5% de CO₂ atmosférico. Foi observado a cada hora os oocistos esporulados e os esporozoítos liberados utilizando o microscópio invertido (IX81, Olympus®)

para estimar o número de esporozoítos livres. Depois os esporozoítos foram lavados duas vezes com ECGM suplementado (ECGM-PromoCell) diluído na proporção de 3:7 em meio M199 (Gibco); 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% soro fetal bovino -FKS, Biochrome) e depois disso contado em câmara de Neubauer.

4.4.4 Ensaio de viabilidade de esporozoítos com a lectina ConBr

A lectina foi diluída em NaCl 0,15 M e preparada na concentração inicial de 2 mg/mL, totalizando 2,5 mL. Posteriormente foram procedidas as cinco diluições seriadas com concentrações de 1; 0.5; 0.25; 0.125 e 0.0625 mg/mL em triplicata, sendo colocado em cada eppendorf, 1 mL de NaCl 0,15 M adicionado de 1 mL das devidas concentrações de lectinas advindas das diluições seriadas. Como controle foi utilizado NaCl 0,15 M. O restante da lectina diluída em 2 mg/mL foi congelada a -80°C para a realização dos testes seguintes e ao utilizar a lectina, esta era devidamente descongelada em temperatura ambiente.

A viabilidade dos esporozoítos foi analisada quanto a sua motilidade Fuller & McDougald, (2002) e quanto à refração da luz na microscopia ótica. Para isso, solução de Tripán Blue (10 µL de Trypan blue; 80 mL de ECGM suplementado; 10 µL de solução com lectinas e esporozoítos) foi adicionado aos esporozoítos e mantidos em contato com os parasitas por 5 (cinco) minutos. Posteriormente foram contados com auxílio da câmara de Neubauer utilizando microscópio invertido acoplado com câmera digital (IX81, Olympus®), analisados e registrados em fotografias e vídeos.

4.4.5 Análise estatística para os testes *in vitro* da viabilidade do esporozoítos de *E. arloingi*

Após a incubação final a porcentagens de esporozoítos viáveis foi calculada em comparação ao controle, segundo a fórmula: (média de esporozoítos expostos/média de esporozoítos controle) x 100, e a porcentagem dos esporozoítos viáveis e não viáveis foram determinadas para cada concentração dos materiais avaliados. As concentrações letais (CL₅₀) e inibitórias (IC₅₀) para 50% da população foram calculadas após transformação logarítmica dos valores das diluições, empregando o programa Graph Pad Prism Versão 6.0

4.5 Resultados

A ConBr do presente estudo foi isolada e caracterizada por Batista et al., (2018), conforme descrito por Moreira e Cavada (1984). O cromatograma mostrou dois picos, o primeiro (PI) correspondendo à fração de proteína não ligada e o segundo (PII) correspondendo à fração protéica retida (Fig. 9A). Em SDS-PAGE, PII mostrou três bandas (Fig. 9B), a primeira banda correspondendo à cadeia α (25,5 kDa), a segunda à cadeia β (14 kDa) e a terceira à cadeia γ (12 kDa) da ConBr.

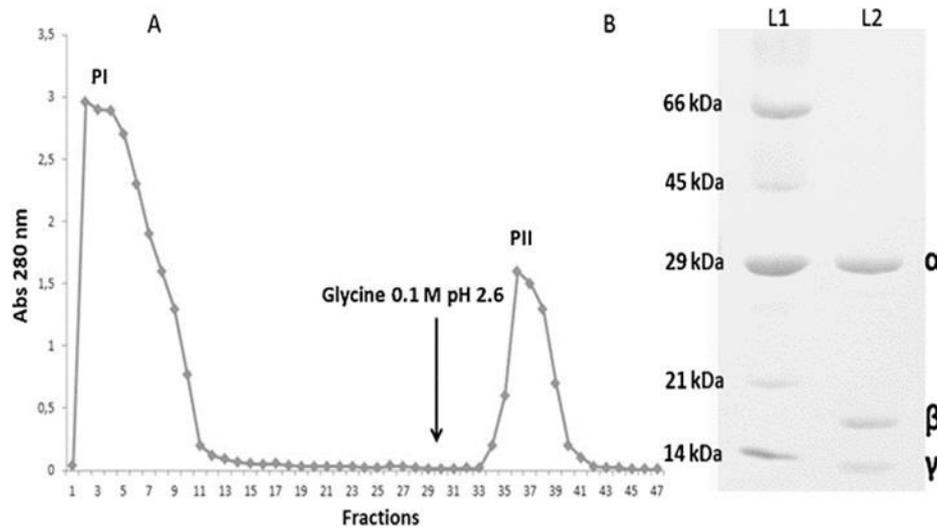


Figura 9. Purificação de ConBr por cromatografia de afinidade (A) Cromatograma de extrato bruto de *Canavalia brasiliensis* em coluna Sephadex G-50. (B) SDS-PAGE. Pista1: Marcadores de massa molecular (fosforilase b, 97 kDa; albumina de soro bovino, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; anidrasw carbica, 29 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa e –Lactalbumina, 14,4 kDa); Pista 2: PII

Os resultados indicam que a lectina de *C. brasiliensis* tem potencial coccidicida em esporozoítos de *E. arloingi*, uma vez que após 2 h de incubação em contato com a lectina, os esporozoítos reduziram sua viabilidade considerando as concentrações estudadas (0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 e 0.01 mg/ml). A lectina de *C. brasiliensis* apresentou concentração letal (LC_{50}) de 0,16 mg/ml (IC 95% 0,10-0,27; R^2 0,67) para esporozoítos de *E. arloingi* (Fig. 10). Notavelmente nenhuma diferença na morfologia e motilidade dos esporozoítos foram encontrados nos controles com meio de cultivo ECGM e NaCl 0.15M, visto que estas soluções não tiveram qualquer efeito na viabilidade dos esporozoítos.

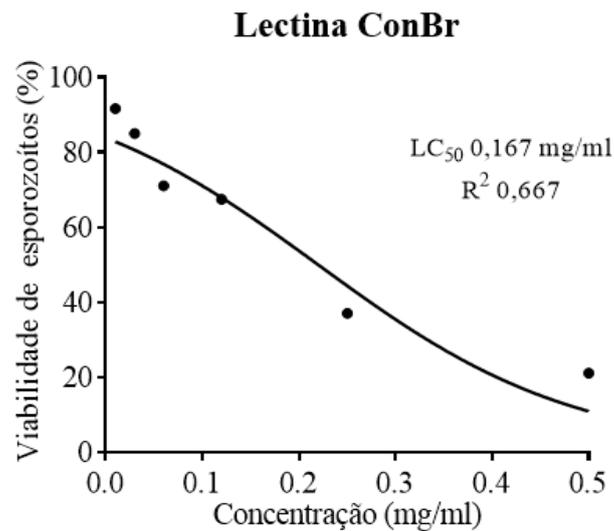


Figura 10. Efeito das concentrações da lectina de *C. brasiliensis* (ConBr) na viabilidade dos esporozoítos de *E. arloingi*.

Pôde ser analisado, também, por meio das menores porcentagens de esporozoítos viáveis nas concentrações de 0,5 e 0,25 mg/ml (35,90% e 39,40% respectivamente) e maiores proporções de esporozoítos inviáveis (64,10% e 60,60%). Na figura 10, a concentração inicial de 0,01 mg/ml de ConBr houve a diminuição significativa na viabilidade dos esporozoítos, isso se intensificou a medida que havia o aumento da concentração da lectina, considerando desta forma a sua eficácia na diminuição da viabilidade de esporozoítos de *E. arloingi*.

No presente estudo, a capacidade coccidicida da lectina foi identificada através da inibição da motilidade dos esporozoítos de *E. arloingi* e mudanças na sua morfologia, tornando-se inviáveis. No que se refere às características morfológicas dos esporozoítos de *E. arloingi* após serem expostos a lectina, e em seguida ao Trypan Blue (Sigma Aldrich ®) responsável pela coloração de esporozoítos viáveis, podemos observar que a parede do esporozoítos se manteve incolor para esporozoítos viáveis e com movimento de motilidade constantes com torção circular (Fig.11A), enquanto os esporozoítos inviáveis tinham como principais características a diminuição da sua motilidade, com apenas raros movimentos deslizante e com sua membrana interna escura (Fig.11B). Não houve aglutinação nos esporozoítos.

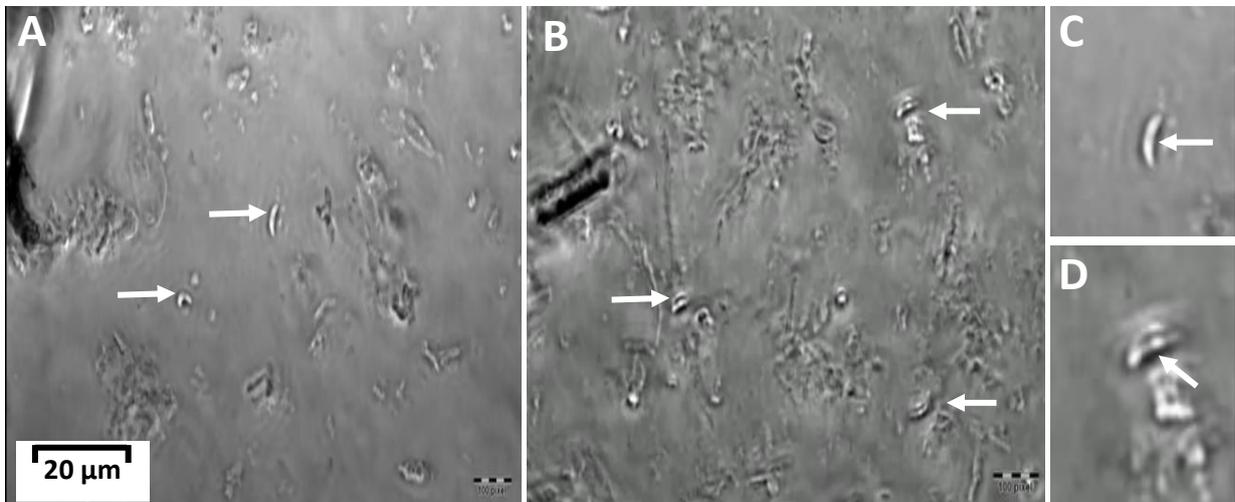


Figura 11: Esporozoítos de *Eimeria arloingi* após contato com lectina de *Canavalia brasiliensis*. Esporozoítos viáveis (A) e na figura B, esporozoítos inviáveis de acordo com sua motilidade e morfologia. Nas figuras C e D estão representados de forma mais visíveis as características morfológicas. (Fonte: próprio autor)

4.6 Discussão

A coccidiose é uma doença economicamente importante foi relatada na Europa, África, América e Ásia (REHMAN et al., 2011; CHARTIER & PARAUD, 2012). Os coccídios são um grupo de parasitas protozoários que infecta gado, cabras, ovelhas e muitas espécies de animais. Dentre as espécies que atingem os caprinos, a *Eimeria arloingi* é uma das mais patogênicas (VIEIRA, 2005) e a utilização de plantas com eficácia terapêutica que muitas plantas medicinais possuem, sendo muitas vezes usadas não só para tratamento, como também para a prevenção de doenças parasitárias (MELO et al., 2017).

Iordache et al., (2015) retratam que, lectinas são proteínas quem tem papéis biológicos distintos, como identificação de carboidratos, atuam como sinalizadores célula-célula, comunicação célula-hospedeiro, citotoxicidade. No entanto, poucos estudos sobre agentes antiprotozoários de pequenos ruminantes, com materiais à base de plantas foram realizados, tampouco com a utilização de lectinas em parasitas do gênero *Eimeria*.

No único trabalho disponível na literatura sobre a ação de lectinas em esporozoítos de *Eimeria* em aves (FULLER & MCDOLGALD, 2002), foi estudado *in vitro* 19 lectinas vegetais em esporozoítos de *E. tenella* (*Eimeria* de frangos), em concentrações decrescentes de 500µg/ml a 25µg/ml. Dentre as 19 lectinas testadas, as lectinas *Lens culinaris* (lentilha), que contém sítios de ligações específicos de manose e *Canavalia ensiformes* (Con-A), popularmente conhecida como feijão-de-porco, tiveram efeitos se ligando a superfície dos esporozoítos e com a ocorrência de aglutinação, sendo que a lectina Con-A na concentração de 25µg/ml foi mais ativa no processo da aglutinação dos esporozoítos. No nosso estudo, a intensidade de ligação não se correlacionou com a concentração de lectina ConBr, necessária para aglutinar esporozoítos de *E. arloingi*.

No que diz respeito à interação lectina-protozoário, Iordache et al., (2015) em seu trabalho aponta que a patogênese de protozoários parece estar correlacionada com suas propriedades de superfície, como revelado por interações com lectinas. Na qual, ligação de lectinas com alguns açúcares nos protozoários poderia causar interferência em processos químicos ou biológicos que eventualmente levam a morte desses parasitas (ENDRIGA et al., 2005).

Os glicoconjugados são importantes na interação célula-célula e estão constituintes das células da superfície de parasitas, atuando como árbitros em importantes interações parasita-hospedeiro, como localização e penetração celular (JACOBSON & DOYLE, 1996). E as lectinas servem como ferramentas importantes na detecção e descrição de glicogonjugados nas superfícies celulares.

Nos resultados de Fuller & Mcdolgald, (2002) realizado em esporozoítos de *Eimeria tenella* mostram que uma grande variedade de lectinas se liga à superfície dos esporozoítos e estruturas internas a superfície e o carboidrato ligado a membrana intracelular deste parasito. Na qual *E. tenella* tem uma superfície complexa que pode ter muitos sítios de importância na localização e ligação para estas lectinas. Para esporozoítos viáveis ou vivos os autores do mesmo estudo, sugerem que existem baixos números de glicoconjugados particulares na superfície do esporozoíto, ou que certos glicoconjugados não são tão estruturalmente importantes quanto aqueles que participam da aglutinação.

Desta forma, a utilização de lectina aplicada em estudos com parasitas têm demonstrado significativo aumento da sua importância e alcançando avanços e expansão. Em estudo realizado por Cavalcante et al., (2011) foi apresentado que a lectina de *C. brasiliensis* (ConBr)

tem efeitos inibitórios contra bactérias planctônicas *Streptococcus mutans*. Esta mesma lectina *in vivo* mostrou atividade protetora contra *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETTO et al., 1996) e atua *in vitro* na inibição do desenvolvimento de *Haemonchus contortus*, como foi observado por Batista et al., (2018). Andrade e colaboradores (1999), revelam que a ConBr é capaz de induzir a produção de óxido nítrico, sabendo que o óxido nítrico atua nas atividades antitumorais e antiparasitárias.

4.7 Conclusão

A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) teve efeito significativo quando analisado sobre a viabilidade dos esporozoítos de *E. arloingi*, apresentando eficiência sobre os esporozoítos na concentração de inibição IC₅₀ 0,16 mg/mL e com alterações visíveis nas características morfológicas.

4.8 Referências Bibliográficas

ANDRADE, J.L; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.

BATISTA, K. L., SILVA, C. R., SANTOS, V. F., SILVA, R. C., ROMA, R. R., SANTOS, A. L., & COSTA-JÚNIOR, L. M. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and biochemical parasitology**, 225, 67-72, 2018.

BARRAL-NETTO M., R.L. VON SOHSTEN, M. TEIXEIRA, W.L. SANTOS, M.L. POMPEU, R.A. MOREIRA, J.T. OLIVEIRA, B.S. CAVADA, E. FALCOFF, A. BARRAL, In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*, **Acta Trop.** 60, 237–250, 1996

CAVADA, B. S; BARBOSA, T; ARRUDA, S; GRANGEIRO, T. B; BARRAL-NETTO M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons

from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, Hilversum, v.2, n° 2, p.123-135, Jun. 2001.

CAVALCANTE, T.T.A.; MATIAS DA ROCHA, B.A.; CARNEIRO, V.A.; ARRUDA, FVS.; FERNANDES DO NASCIMENTO, A.S; SÁ, N.C.; SANTIAGO DO NASCIMENTO, K.; CAVADA B.S.; TEIXEIRA, E.H. Effect of lectins from diocleinae subtribe against oral streptococci. **Molecules**, 16,3530-3543, 2011.

CHARTIER, C.; PARAUD, C. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. **Small Ruminants Research**, v.103, n.1, p.84-92, 2012.

ENDRIGA, M.A.; MOJICA, E.R.E.; MERCA, F.E.; LACSAMANA, M.S.; DEOCARIS, C.C. Evaluation of some lectins as anti-protozoal agents. **J. Medical Sci.**, 5, 31-34, 2005.

FULLER, A.L.; MCDUGALD L.R., Lectin-binding by sporozoites of *Eimeria tenella*, **Parasitol. Res.** 88, 118–125. 2002.

GRAPHPAD PRISM VERSION 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California

HERMOSILLA, C., BARBISCH, B., HEISE, A., KOWALIK, S., & ZAHNER, H. Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin–Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. **Parasitology research**, 88(4), 301-307, 2002.

IORDACHE, F. IONITA, M., MITREA, L.I. C. FAFANEATA, A. POP, Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins, **Curr. Pharm. Biotechnol.** 16,152–161, 2015.

LEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, **Nature** 227 680–685, 1970.

LIMA, J. D. Coccidiose dos ruminantes domésticos **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1. Ouro Preto, MG, 2004.

MOREIRA, R. A.; GAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, 1984, 26.2: 113.

- MC EVOY, J.D.G. Contamination of animal feeding stuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. **Anal. Chim. Acta**, 473, pp. 3–26, 2002.
- SILVA, L. M., CHÁVEZ-MAYA, F., MACDONALD, S., PEGG, E., BLAKE, D. P., TAUBERT, A., & HERMOSILLA, C. A newly described strain of *Eimeria arloingi* (strain A) belongs to the phylogenetic group of ruminant-infecting pathogenic species, which replicate in host endothelial cells *in vivo*. **Veterinary parasitology**, 248, 28-32, 2017.
- MELO, C. R., LIRA, A. B., ALVES, M. F., & LIMA, C. M. B. L. O Uso de plantas medicinais para doenças parasitárias. **Acta Brasiliensis**, 1(1), 28-32, 2017.
- ORDÓÑEZ, R. M., ORDÓÑEZ, A. A., SAYAGO, J. E., MORENO, M. I. N., & ISLA, M. I. Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**, 27(6), 1187-1191, 2006.
- PASCHINGER, KATHARINA; WILSON, IAIN BH. Two types of galactosylated fucose motifs are present on N-glycans of *Haemonchus contortus*. **Glycobiology**, 2015, 25.6: 585-590.
- RAMOS, M. V., CAVADA, B. S., MAZARD, A. M., & ROUGÉ, P. Interaction of Diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(2), 275-279, 2002.
- REMMAL, A.; ACHAHBAR,S.; BOUDDINE, L. CHAMI, N.; CHAMI, F. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. **Veterinary Parasitology**. 182, p.121-126, 2011.
- RUIZ, A., BEHRENDT, J. H., ZAHNER, H., HERMOSILLA, C., PÉREZ, D., MATOS, L., & TAUBERT, A. Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* in vitro in primary and permanent cell lines. **Veterinary parasitology**,173(1-2), 2-10, 2010.
- SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAADA, B. S.The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **IFEB Letters** 405, p.114-118, 1997.

STROUT R.G; ALROY J; LUKACS N.W; WARD, H.D; PEREIRA, M.E. Developmentally regulated lectins in *Eimeria* species and their role in avian coccidiosis. **J Parasitol** 80:946-951.

SILVA, L. M., CHÁVEZ-MAYA, F., MACDONALD, S., PEGG, E., BLAKE, D. P., TAUBERT, A., & HERMOSILLA, C. A newly described strain of *Eimeria arloingi* (strain A) belongs to the phylogenetic group of ruminant-infecting pathogenic species, which replicate in host endothelial cells in vivo. **Veterinary parasitology**, 248, 28-32, 2017.

VIEIRA, L. S. Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Sobral: Embrapa Caprinos**, 32 p., 2005.

VIEIRA, P. B. et al. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de Mucosa: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *trichomonas vaginalis*. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 58 - 70, 2012.

WANG, H. X.; BUNERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 669-673, 2000.

WANG, X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

WOOTTON, E. C. et al. Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. **Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 216 – 222, Jan. 2007.