UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA - EEL

RENATO DA SILVA TEIXEIRA

**Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos
sobre *Haemonchus contortus* em ovinos**

Lorena – SP
2011

RENATO DA SILVA TEIXEIRA

**Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos
sobre *Haemonchus contortus* em ovinos**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientação: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP
Outubro, 2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Teixeira, Renato da Silva

Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos sobre *Haemonchus contortus* em ovinos. / Renato da Silva Teixeira. – ed. reimpr., corr.– 2011.
79 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2011.

Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Probióticos 2. Lactobacilos 3. *Haemonchus contortus* 4. Ovinos . I. Título

663.1 - CDU

Aos meus pais, Luiz e Marli. Com amor e carinho, me educaram; com muito esforço e incentivo, me deram à oportunidade de estudar. Pais, esta conquista também pertence a vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por me dar força, proteção e por iluminar e colocar em meu caminho pessoas maravilhosas, para os quais vão os meus sinceros agradecimentos a seguir.

Ao meu orientador, professor Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pela confiança, atenção e principalmente pelos ensinamentos transmitidos, os quais contribuíram para meu amadurecimento profissional.

À minha família, em especial aos meus pais, ao meu irmão Renann, a minha tia Cida, as minhas avós Marcionila e Dilza e aos meus avôs que já se foram, por me transmitirem princípios e valores que foram fundamentais para minha formação pessoal.

À Kryseine (Krys), pelo companheirismo e amor dados constantemente, por me apoiar quando me via em dificuldades e por compreender, que às vezes, minha ausência era necessária para eu alcançar esta conquista.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Sanches Pereira. “Carlinhos”, muito mais que um mestre e amigo, te considero um “paizão”, serei eternamente grato a confiança depositada em meu trabalho, as oportunidades e incentivos oferecidos, aos conselhos e cobranças que me fizeram crescer e por servir de modelo para minha vida profissional. Agradeço também por permitir minha presença no Lacon, para realização dos exames hematológicos e bioquímicos.

Ao meu grande amigo Ronie Cabral, pelas caronas nas viagens até Lorena, sou muito feliz em tê-lo como um irmão. Também agradeço sua mãe, Maria Aparecida Cabral (Dona Tida), por me hospedar em sua casa e me tratar como membro da família.

À minha amiga Priscila Filgueiras, pela confiança, incentivo e oportunidades oferecidas.

Ao amigo professor Dr. Mauro Sérgio Cruz Souza Lima, pelas sugestões dadas para melhoria do trabalho, pelos ensinamentos em bioestatística e por despertar em mim o gosto pelo estudo em Parasitologia.

Ao pesquisador científico José Roberto Pereira, do Laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) de Pindamonhangaba-SP, pelos exames parasitológicos.

Ao responsável da Fazenda Joamar, José Donizete de Souza Xavier, por ceder gentilmente os animais e o espaço para o experimento. Aos funcionários, Divanil César Rodrigues

(Nil), Edson da Silva (Zinho) e Thalyta Baldim Xavier, por se dedicaram ao experimento. Sem o auxílio de vocês no manejo dos animais, o trabalho seria muito difícil.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca, pelas contribuições que enobreceram o meu trabalho.

BIOGRAFIA

Renato da Silva Teixeira, filho de Luiz Cláudio Teixeira e Marli Lima da Silva Teixeira, nasceu em 28 de abril de 1987 na cidade de Volta Redonda - RJ.

Em 2008, conclui o curso de graduação em Ciências Biológicas no Centro Universitário Geraldo Di Biase (UGB, Volta Redonda - RJ), tendo desenvolvido atividades em nível de iniciação científica e monitoria, no Laboratório de Microbiologia, focando suas pesquisas sobre probióticos.

Em 2009, iniciou a Pós-Graduação em nível de Mestrado em Biotecnologia Industrial, na Escola de Engenharia de Lorena – USP, sob a orientação do Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha.

Em janeiro de 2011, foi contratado pela Secretária de Educação do Estado do Rio de Janeiro para ocupar o cargo de professor em Biologia. Nesta mesma data foi contratado pelo Colégio do Instituto Batista Americano para lecionar a disciplina Parasitologia no Curso Técnico em Análises Clínicas, onde permanece até a presente data.

Em abril de 2011, conclui o curso de Pós-Graduação “Latu Sensu” em Análises Clínicas pelo Centro Universitário de Barra Mansa (UBM, Barra Mansa - RJ).

“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar”;
É melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final;
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder;
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ...”

Martin Luther King

RESUMO

TEIXEIRA, R. S. **Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos sobre *Haemonchus contortus* em ovinos.** 2011. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2011.

A infecção por *Haemonchus contortus* é a principal parasitose que afeta a ovinocultura, provocando consideráveis perdas econômicas. Sua patogenia é caracterizada por uma intensa anemia, além de hipoproteinemia e reduções nos níveis séricos de ferro. Devido ao aumento da resistência desse parasito aos anti-helmínticos comumente encontrados no mercado, surge a necessidade de tratamentos alternativos, como por exemplo, o uso de produtos probióticos. Probióticos são alimentos funcionais que contém micro-organismos vivos, que ingeridos, com frequência e em doses adequadas trazem benefícios aos hospedeiros por meio de diferentes mecanismos de ação. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma preparação probiótica constituída de diferentes espécies de *Lactobacillus* (*L. casei* ATCC 7469, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. acidophilus* ATCC 4536) na forma de “pool” sobre *H. contortus* em ovinos. Para tanto foram estudados 40 animais naturalmente infectados e distribuídos em 4 grupos e por 90 dias submetidos a diferentes tratamentos, a saber: Grupo A (controle): os animais não receberam nenhum tratamento, Grupo B os animais receberam em 3 dias por semana (2ª, 4ª e 6ª feiras) uma dose de 10 mL da preparação probiótica, Grupo C os animais receberam, no dia 0 dose única de Diantel® (1 mL para cada 10 Kg de PV) e Grupo D os animais receberam, no dia 0, dose única de Diantel® (1 mL para cada 10 Kg de PV) e após 30 dias passaram a receber em 3 dias por semana 10 mL da preparação probiótica, sendo interrompido no 60º dia. A cada 15 dias foram realizados exames parasitológicos para quantificação de OPG de fezes, hemograma completo, dosagem de proteínas e ferro. Os resultados demonstraram que os animais do Grupo B (probiótico) apresentaram uma eliminação de OPG de fezes significativamente menor ($p<0,05$) em relação aos demais grupos com uma eficácia de ação máxima de 66,3%, além dos animais se apresentarem em melhores condições fisiológicas. Maiores concentrações de hemoglobina, hematócrito e ferro também foram observadas nesse grupo, que podem ser explicadas pela ação imunomoduladora apresentada pelas espécies de *Lactobacillus* avaliadas, além de facilitar a absorção de nutrientes pelo animal hospedeiro. Em relação aos animais do Grupo C (Diantel®), após 45 dias ocorreu um aumento significativo ($p<0,05$) na contagem de OPG de fezes indicando uma maior atividade parasitária, levando a redução dos valores de hemoglobina e hematócrito. O uso do anti-helmíntico no Grupo D apresentou eficácia máxima de 90,3% após 15 dias. A inclusão da preparação probiótica, na dieta dos animais deste grupo após 30 dias, não contribuiu para se evitar a reinfecção, possivelmente devido a sensibilidade das cepas utilizadas ao princípio ativo closantel, tendo sido evidenciada a necessidade de uma nova dosagem do anti-helmíntico após 60 dias, como indicado pelo fabricante.

Palavras-chave: Probióticos. Lactobacilos. *Haemonchus contortus*. Ovinos.

ABSTRACT

TEIXEIRA. R. S. **Evaluation of the effects of probiotic microorganisms on *Haemonchus contortus* in ovines**. 2011. 79 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2011.

The infestation by *Haemonchus contortus* is the main parasite that affects the ovine farms, causing a significantly economic loss. Its pathogenesis is characterized through an intense anemia, besides hypoproteinemia and blood iron level reduction. Due to the parasite resistance increasing to anti-helminthics usually found in the market, a need of an alternative treatment is evident, as example, the use of probiotics microorganisms. Probiotics are functional food that contains live microorganisms that when ingested in appropriate amount bring benefits to the hosts through different action mechanisms. Thus, this research had as purpose to study the effect of a probiotic preparation formed by a pool of *Lactobacillus* species (*L. casei* ATCC 7469, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. acidophilus* ATCC 4536) on *H. contortus* in ovines. Therefore, 40 naturally infected animals were distributed in 4 groups and during 90 days they were submitted to different treatments: Group A (control): the animals did not receive any treatment, Group B: The animals received 3 times a week (2^o, 4^o, 6^o) a 10 ml dose of the probiotic preparation, Group C: the animals received on 0 day, a Diantel single dose (1 ml /10 kg of LW) and in group D: the animals received on 0 day, a Diantel single dose (1 ml /10 kg of LW) and after 30 days they started receiving 3 times a week 10 ml of the probiotic preparation, ending at the 60th day. In each fifteen days parasitological exams were realized to check the amount of EPG of feces, complete blood exam, protein and blood iron analysis. The results showed that the animals in group B (probiotic) had “EPG” of feces elimination significantly minor (p 0,05) related to the other groups with a efficacy of 66,3% besides, the animals presented better physiological conditions. An increasing of hemoglobin, hematocrit and blood iron level were also observed in this group, which can be explained by the immunomodulator action presented by the *Lactobacillus* species, which contribute to the nutrients absorption by the host animal. In relation to group C animals (Diantel), it was observed, after 45 days, a significantly increasing (p 0,05) in the EPG counting, resulting in a major parasitary activity, decreasing the hemoglobin and hematocrit values. The usage of anti-helminthic in group D showed a efficacy of 90,3% after 15 days. The probiotic preparation administered to the animals of group D did not contribute to avoid the re-infestation, probably due to the strains sensibility regarding to the active principle (closantel) of Diantel, being necessary another anti-helminthic dose administration after 60 days as indicated by the manufacturer.

Keywords: Probiotics. *Lactobacillus*. *Haemonchus contortus*. Ovines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aparelho bucal	26
Figura 2 – Ciclo biológico do <i>Haemonchus contortus</i>	28
Figura 3 – Punção venosa	38
Figura 4 – Contagem relativa dos linfócitos dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	48
Figura 5 – Concentração de hemoglobina nos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	51
Figura 6 – Valores da OPG e do hematócrito dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	52
Figura 7 – Concentração de proteínas totais no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos	53
Figura 8 – Concentração de albumina no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	54
Figura 9 – Concentração de globulina no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	54
Figura 10 – Concentração de ferro no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais micro-organismos utilizados em preparações probióticas	19
Tabela 2 – Variáveis e níveis estudados	35
Tabela 3 – Experimentos realizados conforme o planejamento fatorial completo 2^2 ..	35
Tabela 4 – Características do Método Famacha	37
Tabela 5 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de OPG de fezes dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	41
Tabela 6 – Valores de eficácia de redução de OPG nas fezes de animais submetidos a diferentes tratamentos	43
Tabela 7 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da leucometria (Leucócitos/ μ L) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	45
Tabela 8 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem diferencial de células leucocitárias dos animais submetidos a diferentes tratamentos	46
Tabela 9 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de hemácias ($n^\circ \times 10^6/\mu$ L) dos animais submetidos a diferentes tratamentos	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 PROBIÓTICOS	19
2.1.1 Probiótico na saúde animal.....	21
2.1.2 Uso de probiótico como antiparasitário.....	23
2.2 HEMONCOSE.....	25
2.2.1 Patogenia.....	26
2.2.2 Ciclo biológico	27
2.2.3 Controle e tratamento	29
2.3 DROGAS ANTI-HELMÍNTICAS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 MICRO-ORGANISMOS E PREPARAÇÃO PROBIÓTICA.....	34
3.1.1 Lactobacilos.....	34
3.1.2 Preparado probiótico.....	34
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	37
3.3.1 Exame parasitológico e coprocultura.....	37
3.3.2 Coleta sanguínea	38
3.3.3 Exame do tecido hematopoético	38
3.3.4 Dosagens de ferro e proteínas totais e frações.....	39
3.3.5 Exame para verificação do estado anêmico dos animais “ <i>in situ</i> ”	39
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 AVALIAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE <i>Haemonchus contortus</i>	41
4.2 AVALIAÇÃO DO TECIDO HEMATOPOÉTICO	44
4.2.1 Leucograma	44
4.2.2 Eritrograma.....	49
4.3 NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNAS E FERRO	52
5 CONCLUSÕES.....	57
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
REFERÊNCIAS.....	59

APÊNDICES..... 70

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira, antes voltada apenas para a produção de lã, passou por um difícil momento na década de 90, devido à utilização de materiais sintéticos na indústria têxtil internacional, porém, com o aumento do consumo de carne de cordeiros nos últimos dez anos, verifica-se o aumento do agronegócio de ovinos no país (NETO, 2007). O Brasil possui um efetivo de aproximadamente 17 milhões de cabeças (IBGE, 2010), mas apesar de apresentar um constante crescimento, este número ainda é muito discreto no cenário mundial representando apenas 1,7% do rebanho em todo o mundo. Calvette; Villwock (2007) afirmam que o mercado de ovinos no país é bastante promissor, uma vez que a demanda é maior que a oferta, mas que como em todo sistema de produção, a criação de ovinos possui alguns pontos de entrave importantes e que devem ser bem conhecidos e controlados para otimizar e tornar essa atividade viável.

A infecção por parasitos gastrointestinais é considerada por muitos o principal fator que afeta a ovinocultura e dentre eles *Haemonchus contortus* é o que mais se destaca (FERNANDES et al., 2004; AMARANTE, 2004; RISSI et al., 2010).

Haemonchus contortus é um nematóide da família Trichostrongylidae e agente etiológico da hemoncose. Essa doença é caracterizada por uma intensa anemia provocada pelos hábitos hematófagos do parasito, além disso, são observadas reduções nos níveis sanguíneos de proteínas e ferro. Essa patogenia gera consideráveis perdas econômicas como mortalidade elevada, reduções na taxa de conversão alimentar e consequentemente no crescimento dos animais afetados, má eficiência reprodutiva, baixa produção de lã e carne.

O tratamento geralmente é baseado pelo uso profilático e terapêutico de anti-helmínticos, porém, tem sido registrados inúmeros casos de resistência (RAMOS et al., 2002; MELO, 2005; SCZESNY-MORAES et al., 2010). Esse fato tem levado a busca por métodos alternativos de controle, visando o não estabelecimento dos parasitos no hospedeiro. Entre eles pode-se citar a seleção de raças de animais naturalmente resistentes aos nematóides; suplementação de proteínas na dieta dos animais, uso de fitoterápicos, fungos nematófagos e método baseado no controle seletivo como o Famacha.

De acordo com Pereira (2007) animais tratados com probióticos podem ter suas condições sanitárias preservadas, e quando infectados por endoparasitos a evolução para a cura poderá ser mais rápida, quando comparados àqueles que receberam apenas tratamento

homeopático ou alopático, reduzindo custos para o produtor e melhorando a qualidade de vida do animal.

Probióticos são considerados como suplemento alimentar natural, compostos de micro-organismos vivos, que possuem diversos efeitos benéficos a saúde do hospedeiro, e sendo constantemente utilizados visando ação reguladora da microbiota intestinal e manutenção do equilíbrio entre a microbiota normal e micro-organismos patogênicos no intestino, por meio de mecanismos antagônicos que podem ser mediados por exclusão competitiva por nutrientes ou por sítios de adesão e produção de compostos antimicrobianos como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas. Além disso, os probióticos atuam diretamente na saúde do hospedeiro, estimulando a imunidade pelo aumento dos níveis de anticorpos e/ou atividade dos macrófagos, reduzindo o nível de colesterol e na atividade anticarcinogênica.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de um método alternativo para o controle da hemoncose em ovinos, por meio da avaliação do efeito de micro-organismos probióticos como agentes antiparasitários sobre *Haemonchus contortus*. Especificamente avaliou-se a ação dos micro-organismos probióticos sobre a carga parasitária, o tecido hematopoético, bem como os níveis séricos de ferro e proteínas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROBIÓTICO

Fuller (1989) definiu probiótico como um suplemento alimentar à base de micro-organismos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal. Entretanto, a definição internacionalmente aceita é que probiótico são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

Vários micro-organismos são utilizados em preparações probióticas (Tabela 1), com destaque para espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* e leveduras do gênero *Saccharomyces* (COPPOLA; TURNES, 2004; GUPTA; GARG, 2009).

Tabela 1 – Principais micro-organismos utilizados em preparações probióticas

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas	Outros microrganismos
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa <i>nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp.	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Fonte: Coppola; Turnes, (2004).

Segundo Holzapfel; Schillinger (2002) para serem selecionados como probióticos, os micro-organismos devem manter a viabilidade celular durante o transporte e estocagem, serem resistentes a baixo pH e aos sais biliares, apresentar a capacidade de persistir no intestino, aderir no epitélio evitando a eliminação pelo peristaltismo, resistir a fagos, serem inócuos e para uma melhor eficácia, devem ser específicos dos hospedeiros.

Os probióticos têm sido constantemente avaliados considerando sua ação reguladora da microbiota intestinal e manutenção do equilíbrio entre a microbiota benéfica e micro-organismos que se tornam patogênicos no intestino (NEUMANN et al., 2008). Mecanismos de ação como competição por sítios receptores na superfície intestinal, competição por nutrientes, excreção de compostos com atividade antimicrobiana, estimulação do sistema imunológico através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos, e alteração do metabolismo microbiano através do aumento ou diminuição da atividade enzimática, tem sido relatados como propriedades que devem ser apresentadas pelos micro-organismos probióticos (DUGGAN; GANNON; WALKER, 2002; SAAD, 2006).

Os micro-organismos probióticos ocupam os sítios de ligações (receptores) na mucosa intestinal através da adesão e colonização, formando um tipo de barreira física, que evita a aderência dos micro-organismos indesejáveis. Assim, esses micro-organismos não conseguem se ligar a esses receptores e consequentemente são excluídos pela competição (LAVERMICOCCA et al., 2005).

Dentre os compostos antimicrobianos produzidos pelos micro-organismos probióticos, encontram-se os ácidos orgânicos como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Axe; Bailey (1995) acreditam que o efeito inibidor dos ácidos é principalmente causado pela penetração dessas moléculas na forma não dissociada, que são facilmente solúveis através da membrana celular, dos micro-organismos susceptíveis, para o citosol mais alcalino. Eventualmente, este fluxo contínuo interfere na permeabilidade da membrana e impede a fosforilação oxidativa a partir do sistema de transporte de elétrons. Este fluxo gera também o aumento de ânions intracelular, levando a acidificação do conteúdo celular, inibição da produção final do metabolismo e ATP, além de promover a perda de atividade de água, causando a morte da célula.

Segundo Cadenas (1989), o peróxido de hidrogênio causa stress oxidativo às células bacterianas podendo levar a alterações em componentes presentes na membrana celular como proteínas e lipídios, causando a morte da célula.

Diferentes mecanismos de ação das bacteriocinas têm sido propostos: destacando-se alteração da atividade enzimática, inibição da germinação de esporos e formação de poros na membrana citoplasmática desfazendo sua permeabilidade seletiva (DEEGAN et al., 2006). A formação de poros é o principal mecanismo, e acontece inicialmente pela atração eletrostática entre os fosfolipídios aniônicos presentes na membrana da célula alvo e a carga positivas das bacteriocinas, sendo que esta interação permite que as bacteriocinas

se insiram na bicamada fosfolipídica e se agregam lateralmente promovendo a formação dos poros. Consequentemente, a formação de poros resulta em ação sobre a permeabilidade da membrana, causando a perda de íons (principalmente íons fosfato, potássio e magnésio) e como consequência ocorre a dissipação da força próton-motriz, que está envolvida diretamente na síntese de ATP, fosforilação de proteínas e rotação dos flagelos. Na tentativa de manter a força próton-motriz, a célula afetada perde até 98% de ATP os quais são hidrolisados resultando em morte celular (BRUNO; MONTVILLE, 1994).

Segundo Coppola; Turnes (2004) inúmeras evidências demonstram que os probióticos têm efeito imunoestimulante em animais e no homem. Acredita-se que esse efeito pode estar relacionado à capacidade dos micro-organismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando os linfócitos B produtores de IgA e a migração dos linfócitos T no intestino, favorecendo a atividade fagocítica dos macrófagos, o aumento da atividade das células NK (natural-killer) e o aumento nos níveis de citocinas e imunoglobulinas (SAAD, 2006).

2.1.1 Probióticos na saúde animal

Ávila et al. (2000) estudando a eficiência de um probiótico no controle de diarreia em bezerros, demonstraram que o número de casos de diarreia foi de 30% entre os animais tratados e 68,9% nos animais controle. Dentre os que receberam o probiótico e ainda sim apresentaram diarreia, foi observado um predomínio de *Escherichia coli* nas fezes e o isolamento de *Lactobacillus* e *Streptococcus* foi dificultado, entretanto, nos animais sem diarreias ocorreu o inverso, confirmando que as bactérias probióticas foram capazes de impedir a colonização intestinal pela *Escherichia coli*.

Ao avaliar o potencial probiótico de *Lactobacillus fermentum* AD1 sobre a saúde de cães, Stropfová et al. (2006) demonstraram um aumento significativo do nível sérico de proteínas nos animais que receberam o micro-organismo quando comparados aos animais do grupo controle, provavelmente devido ao melhor aproveitamento e absorção das proteínas na alimentação.

Estudando a eficácia da adição de um probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*, ao leite sem resíduos antimicrobianos e ao leite de vacas em tratamento de mastite, sobre a saúde de bezerras, Batista et al. (2008) observaram que a adição ao leite sem resíduo antimicrobiano, reduziu

significativamente o número de diarreias nos animais em comparação aos que receberam o leite sem probiótico, o mesmo não ocorreu quando se utilizava leite de vacas tratadas contra mastite, demonstrando a possível sensibilidade dos micro-organismos probióticos aos compostos antimicrobianos ativos no leite. Os mecanismos apontados como causadores do efeito de redução de diarreias foram a exclusão competitiva e a estimulação do sistema imune das bezerras, uma vez que os agentes causadores de diarreia identificados nas fezes foram todos intracelulares: *Cryptosporidium*, Rotavírus e Coronavírus, e precisam invadir as microvilosidades intestinais para causarem danos.

Além dos efeitos benéficos a saúde do animal hospedeiro, os probióticos apresentam efeitos sobre o seu desempenho, favorecendo a conversão alimentar e ganho de peso (PINHEIRO; SOBRINHO; YAMAMOTO, 2007).

De acordo com Loddi et al. (2000) devido a essas propriedades, o uso dos probióticos, é uma alternativa para a substituição dos antibióticos, que a partir dos anos 50, passaram a ser utilizados como agentes terapêuticos e promotores de crescimento para animais domésticos. Entretanto, o uso dos antibióticos, tem sido restringido em diversos países, em virtude da possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada e da emergente exigência dos países importadores de produtos livres de resíduos de antibióticos (UTIYAMA et al., 2006). Os prováveis substitutos ao uso de antibióticos como alternativa para os promotores de crescimento de animais domésticos, devem manter as ações benéficas dos antibióticos e minimizar as indesejáveis, como a resistência bacteriana. Por outro lado, Marteau; Salminen (1998) observaram que pode haver risco de transferência de genes entre o probiótico e a microbiota endógena, sendo assim, motivo de preocupação quando se considera o uso de preparações probióticas constituídas de micro-organismos geneticamente modificados, pois estes poderiam abrigar genes de resistência a antibióticos.

Bernardeau; Vernoux; Gueguen (2002) utilizando *Lactobacillus rhamnosus* MA27/6B e *L. acidophilus* MA27/6R na dieta de camundongos jovens, relataram um aumento no ganho de peso de 28,9% e 31,7%, respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle que só recebiam ração e água.

Silva et al. (2009) avaliando o efeito do simbiótico comercial BioSyn MOS® sobre o ganho de peso de cordeiros confinados, demonstraram que ao final dos 45 dias de experimento, os cordeiros do grupo controle tiveram um ganho de peso médio de 238 g/dia, enquanto que os tratados com o simbiótico apresentaram um ganho de 280 g/dia, representando um aumento significativo de 17,59%.

Administrando probiótico composto por *Lactobacillus amylovorus* e *Enterococcus faecium* em suínos, Ross et al. (2010) não observaram diferença de ganho de peso entre os grupos controle e o grupo tratado, porém, neste último os animais consumiram uma quantidade significativamente menor de alimentos, demonstrando que o uso de probiótico contribui para a melhoria da taxa de conversão alimentar.

2.1.2 Uso de probiótico como antiparasitário

Singer; Nash (2000) realizaram estudos em camundongos e verificaram que a microbiota normal exercia um papel de proteção contra a infecção por *Giardia lamblia*. Ao analisar os componentes desta microbiota, observaram a presença de lactobacilos e sugeriram então que o uso de probióticos também poderia exercer um efeito benéfico sobre as parasitoses.

Pérez et al. (2001) analisaram o efeito de sobrenadante de culturas de diferentes cepas de lactobacilos sobre o crescimento de trofozoítos de *Giardia intestinalis*, em culturas de células humanas do epitélio intestinal linha Caco-2, e observaram que apesar de ocorrer à aderência dos trofozoítos as células, estes não conseguiam se proliferar devido à redução do pH do meio, provavelmente relacionada à produção de ácidos orgânicos pelos lactobacilos.

Tierney et al. (2004) estudaram os efeitos de espécies de *Lactobacillus*, isolados de diferentes partes do trato gastrointestinal de frangos, sobre a invasão de *Eimeria tenella*, empregando como modelo experimental culturas de células MDBK. Os autores observaram que as espécies de *Lactobacillus* aderiam às células, causando efeito de inibição sobre a invasão da *E. tenella* por efeito de exclusão competitiva.

Administrando *Zymomonas mobilis* em camundongos infectados experimentalmente por *Schistosoma mansoni*, Santos et al. (2004) observaram que os animais que receberam a cultura bacteriana após a infecção, desenvolveram uma resposta imunológica mais eficiente em relação àqueles que receberam a cultura preventivamente, resultando em 61% e 24% de redução da contagem de vermes adultos, respectivamente, quando comparados ao grupo controle.

Ensaio *in vivo*, foram realizados por Humen et al. (2005), em roedores conhecidos como esquilos da Mongólia (*Meriones unguiculatos*) contaminados com *Giardia intestinalis* e tratados com *Lactobacillus johnsonii* La1. Após 14 dias de infecção, seis dos

quatorze animais do grupo controle ainda apresentavam trofozoítos no intestino delgado enquanto os animais tratados não apresentavam infecção. Quanto à eliminação de antígenos fecais GSA65, nos animais do grupo controle os autores observaram que este antígeno nas fezes aumentou progressivamente a partir do 7º dia de infecção até o 21º. Em contrapartida no grupo constituído dos animais tratados, apenas no 14º dia foi detectado a presença deste antígeno em um animal. Além disso, nos animais tratados, a mucosa e a atividade enzimática intestinal se mantiveram íntegras diferentemente do grupo não tratado, demonstrando que o efeito antiparasitário do *Lactobacillus johnsonii* La1 foi devido à modulação do sistema imune do hospedeiro, tendo em vista a ausência de processos inflamatórios intestinais.

Em outro experimento, estudando o efeito do *Enterococcus faecium* SF68 sobre a melhora da resposta imune em camundongos infectados com *Giardia intestinalis*, Benyacoub et al. (2005) verificaram que a inclusão deste probiótico na dieta acarretou em quantidades significativamente menores de trofozoítos de *Giardia* no intestino e antígenos fecais em relação ao grupo controle. Esta redução foi atribuída ao aumento no percentual de linfócitos T-CD4⁺ e de anticorpos IgA da mucosa intestinal, provocada pelo probiótico.

Dalloul et al. (2005), trabalhando com frangos contaminados com *Eimeria acervulina* e alimentados com probiótico a base de lactobacilos, constataram que os animais tratados apresentaram redução de 14% na eliminação de oocistos nas fezes em comparação com o grupo controle. Observaram também um aumento dos níveis plasmáticos de Interferon-gama (INF- γ) e Interleucina-2 (IL-2) e aumento de INF- γ na mucosa intestinal do grupo tratado, fato que pode estar diretamente relacionado com a redução do número de oocistos, devido à estimulação da imunidade celular, afetando o ciclo do parasito.

Utilizando ratos infectados com *Trichinella spiralis*, Randazzo; Costamagna (2005) demonstraram que a administração de *Lactobacillus casei* produziu efeito adverso sobre a penetração das larvas na mucosa intestinal, o número médio de parasitos adultos recuperados da mucosa foi de 81 no grupo controle e apenas 12 no grupo tratado.

Como modelo de estudo para alterações metabólicas provocadas por síndromes que provocam irritabilidade intestinal, Martin et al. (2006) utilizaram ratos infectados com *Trichinella spiralis* e posteriormente suplementados com *Lactobacillus paracasei* em sua dieta. Foi observado nos animais não tratados com a suplementação probiótica, um aumento nos níveis de creatina, lactato e taurina, associados à hipertrofia muscular do jejuno, por outro lado, os animais que receberam o tratamento normalizaram sua atividade

muscular, seu metabolismo energético e apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas de glutamina, metionina e lisina, que podem estar relacionadas à modulação da resposta imunológica.

Avaliando o efeito de micro-organismos probióticos sobre *Eimeria* spp em *Rattus norvegicus*, Pereira (2007) demonstrou que o preparado probiótico ministrado foi eficaz no sentido de promover a interrupção da eliminação de oocistos nas fezes dos animais, ganho de peso, melhor conversão alimentar e aumento do número de neutrófilos segmentados no tecido hematopoético dos animais.

Coutinho (2008), analisando o efeito de micro-organismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos, observou que o uso preventivo do probiótico, gerou redução da eliminação de oocistos nas fezes e aumento do desempenho nutricional dos animais, devido à colonização da mucosa intestinal pelos lactobacilos que impediu a adesão pelas células parasitárias.

Para controle da infecção de *Haemonchus contortus* em ovinos, Gallina et al. (2009) utilizaram *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Dentre os micro-organismos estudados, apenas *S. cerevisiae* demonstrou uma inibição no estabelecimento dos parasitos no abomaso, porém, em relação a quantificação das larvas obtidas na coprocultura, não foi observado diferença significativa em relação ao grupo controle.

Em estudo sobre o uso de probiótico no combate a ancilostomíase canina, Coelho (2010) observou que os cães tratados com preparado probiótico composto de *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbruekii* e *L. plantarum*, na forma de “pool”, apresentaram uma redução de 88,83% do número de ovos por grama de fezes (OPG), além da avaliação parasitológica, o mesmo grupo de animais também obteve melhorias em relação ao número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e aumento do hematócrito, reduzindo a anemia provocada pelo nematóide.

2.2 HEMONCOSE

A hemoncose, uma das principais parasitoses que acometem ovinos, é uma doença causada pelo nematóide *Haemonchus contortus*, e ocorre preferencialmente em regiões tropicais e subtropicais. Taxonomicamente esta espécie pertence ao filo Nematoda, Classe

Secernentea, Ordem Strongylida, Família Trichostrongylidae e Gênero *Haemonchus* (CLIMENI; MONTEIRO; CICOTI, 2008).

Segundo Bricarello (2004), *H. contortus* é considerado o parasito que apresenta maior patogenicidade em pequenos ruminantes, localiza-se no abomaso de seus hospedeiros provocando anemia aguda devido ao hábito hematófago e destaca-se por apresentar resistência a anti-helmínticos.

De acordo com Amarante (2004) dos parasitas de ovinos, a espécie *H. contortus* encontra-se em primeiro lugar na ordem de prevalência em todo o território nacional. Em levantamento realizado por Rissi et al. (2010) sobre doenças de ovinos no Rio Grande do Sul, a hemoncose aparece no topo da lista das doenças infecciosas e parasitárias, confirmando a importância de seu estudo.

2.2.1 Patogenia

Conforme relatado por Radostitis et al. (2002) a patogenia relativa a hemoncose é caracterizada por uma anemia, que provoca perda considerável do volume sanguíneo na ordem de 0,05 mL por parasita por dia, de tal modo que um animal infectado por 5000 vermes de *H. contortus*, chega a perder 250 mL de sangue ao dia. Antes de atingir o estágio L₅, *H. contortus* desenvolve a lanceta perfurante (Figura 1) que lhe permite a obtenção do sangue dos vasos da mucosa abomasal. Em decorrência do parasitismo ocorre diminuição das concentrações de proteínas séricas e do valor do hematócrito (URQUHART et al., 1998).

Figura 1 – Aparelho bucal
Fonte: URQUHART et al. (1998)

A evolução da doença depende do número de parasitos e da habilidade do animal para compensar perdas agudas ou crônicas de proteínas plasmáticas, de hemoglobina e de outros constituintes do sangue. Nas infecções contínuas, o aumento na taxa de produção das hemácias provoca diminuição das reservas de ferro do organismo originando a deficiência desse elemento (STRAIN; STEAR, 2001).

Rosa (1996) descreve o edema submandibular ou papeira, como o sintoma que mais chama a atenção na hemonose, esse edema é caracterizado por uma inflamação de aspecto mole como uma bolsa de água sob a pele, embaixo da mandíbula e vem acompanhada sempre de uma severa anemia, perda de peso e apetite, finalizando com desidratação e morte. Geralmente não se observa a existência de diarreia, as fezes apresentam-se um pouco mais secas que o normal e, o apetite fica inalterado até o último momento. Na fase aguda observa-se uma anemia moderada, gastroenterite catarral, desidratação, retardo de desenvolvimento e crescimento, diarreia líquida ou pastosa e pêlos arrepiados e sem brilho. Na fase crônica, período mais avançado dos sintomas, observa-se debilidade orgânica geral, edema submandibular, diminuição significativa na produção de leite e carne, emagrecimento, anemia acentuada e morte. As diarreias podem aparecer ou não em verminoses crônicas.

2.2.2 Ciclo biológico

O *H. contortus* apresenta um ciclo evolutivo direto, com um período de desenvolvimento no hospedeiro, denominado fase parasitária e outra no ambiente, denominada de vida livre (Figura 2). O ciclo de vida começa quando fêmeas adultas põem ovos, que são eliminados junto com as fezes do animal, cerca de 5.000 a 10.000 ovos/dia. No solo a eclosão desses ovos é controlada pela temperatura, sendo considerada ideal entre 18 a 26 °C, e também umidade, que deve estar em torno de 80 a 100% (ONYAH; ARSLAN, 2005). Uma vez liberada, as larvas de primeiro estágio (L₁) sofrerão mudas para formarem as larvas de segundo estágio (L₂), sendo essas duas formas denominadas de vida livre e se alimentam de bactérias e outros materiais orgânicos fecais. As larvas no estágio L₂ por sua vez sofrerão uma nova muda formando as larvas de terceiro estágio (L₃), que não podem se alimentar devido à cutícula da L₂ que fica retida, sobrevivendo assim dos nutrientes acumulados nos primeiros estádios. Em condições ideais, conforme mencionado, esse desenvolvimento leva aproximadamente 5 dias (BOWMAN, 1995).

A infecção dos animais ocorre pela ingestão das larvas no estágio L₃ seguida de seu desencapsulamento no rúmen, após o que sofrem mais duas mudas tornando-se adultos imaturos (L₅). Antes mesmo de se tornarem larvas no estágio L₅, estas irão desenvolver uma lanceta perfurante que lhes permitem a obtenção do sangue dos vasos da mucosa do abomaso, local de fixação do parasito. Quando adultos, movem-se livremente na superfície da mucosa. O período pré-patente é de duas a três semanas (URQUHART et al., 1998).

Conforme Urquhart et al. (1998) em épocas que são desfavoráveis para o desenvolvimento de larvas e adultos, como estação de seca e frio intenso, ocorre o fenômeno da hipobiose, onde os parasitos param seu desenvolvimento dentro do hospedeiro até mudar o clima, quando retomam às suas atividades.

Figura 2 – Ciclo biológico do *Haemonchus contortus*
Fonte: Machen et al. (1998)

2.2.3 Controle e tratamento

O controle das infecções por nematóides em ruminantes consiste basicamente no pastejo rotacionado e aplicação de anti-helmínticos. Entretanto, o uso adequado das pastagens muitas vezes não é considerado e o uso indiscriminado de drogas tem levado a um aumento da resistência parasitária (SANGSTER, 1999).

Baseados em estudos epidemiológicos e no fenômeno da hipobiose do *H. contortus*, Vieira (2008) recomenda que o rebanho deva ser medicado no início, no meio e no final da época de seca e uma quarta medicação em meados do período chuvoso. Esta vermifugação estratégica é uma medida preventiva de controle de verminose, considerando que as medicações do período seco devem controlar os parasitas em seus hospedeiros, que são praticamente os únicos locais de sobrevivência dos nematódeos nessa época do ano, enquanto que a medicação no período chuvoso destina-se a evitar surtos de parasitismo clínico. Como consequência, este procedimento reduz gradualmente a contaminação das pastagens pelas larvas infectantes (L₃), diminuindo assim a transmissão no período chuvoso seguinte e reduz a mortalidade no rebanho respectivamente.

Alternativas de manejo que diminuem a probabilidade do contato entre parasito e hospedeiro associado aos medicamentos, também contribuem para o controle da hemoncose. De acordo com Veríssimo; Catelli; Molento (2004) uma alternativa é o pastejo em conjunto ou alternado com outras espécies de animais que não são hospedeiros do *H. contortus*, como bovinos e equinos. Por outro lado, a desvantagem desse método é a possível ocorrência da população de parasitos comuns entre as espécies como *Trichostrongylus axei* e *Cooperia* spp. Rocha et al. (2008) afirmam que além da especificidade parasitária ao seu hospedeiro, a longevidade das formas de vida livre no ambiente também deve ser considerada, sendo assim, a alternância das espécies dos animais nas áreas de pastagens devem ocorrer em longos períodos, sendo o ideal a cada três a seis meses.

Segundo Amarante (2004) a habilidade dos ovinos expressarem imunidade contra os parasitas deve ser explorada ao máximo, tendo em mente que a mesma é regulada geneticamente e que é influenciada pela condição nutricional. A criação de raças ovinas resistentes aos parasitas associada com práticas de manejo e com a suplementação de alimento de qualidade (com nível elevado de proteína), especialmente para os cordeiros e as ovelhas no periparto, pode permitir uma situação de equilíbrio na relação parasita x hospedeiro.

Outras formas de controle também vêm sendo estudadas, visando à redução da dependência de drogas anti-helmínticas e consequentemente da resistência parasitária aos mesmos (VIEIRA, 2008).

As plantas com atividade antiparasitária podem atuar diretamente sobre larvas infectantes (L₃) e parasitas adultos, com a diminuição da fecundidade das fêmeas ou indiretamente, aumentando o aproveitamento protéico da dieta pelo hospedeiro, melhorando a resposta imune deste contra os parasitos (JACKSON; MILLER, 2006).

Oliveira et al. (1997) obtiveram uma redução da carga parasitária em caprinos de 57,1% para *Haemonchus* sp., 70,4% para *Oesophagostomum* sp., 65,4% para *Trichostrongylus* sp. e de 59,5% para *Cooperia* sp., quando era administraram durante 25 dias folhas de bananeira.

O tratamento de ovinos infectados experimentalmente com larvas de *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando-se dose única do extrato hidroalcoólico da planta *Fumaria parviflora*, na dose de 183 mg/kg PV, resultou em 100% de redução no OPG e 78,2 e 88,8% de adultos de *H. contortus* e *T. colubriformis*, respectivamente, treze dias após o tratamento (HORDEGEN et al., 2003).

Ademola; Fagbemi; Idowu (2004) observaram redução de 88,8% no OPG de nematódeos gastrintestinais de ovinos tratados por via oral com o extrato etanólico da casca de *Khaya senegalensis* (mogno africano) na dose de 500 mg/kg PV.

Maciel et al. (2006) avaliando o extrato etanólico das sementes de *Melia azedarach* (lírio) no tratamento de coproculturas, obtiveram a inibição de 100% da eclosão de ovos de *H. contortus*. O efeito foi atribuído a taninos condensados, triterpenos e alcalóides presentes na planta.

Os fungos nematófagos vivem na matéria orgânica do solo, onde desenvolvem relações parasíticas ou predatórias com os nematóides, e são classificados como ovicidas, endoparasitas e predadores. A forma mais prática de se fornecer esses fungos aos animais é pela administração oral. Após passar pelo trato gastrintestinal e ser eliminado com as fezes no meio ambiente, o fungo coloniza o bolo fecal, estabelece contato com as larvas eclodidas, penetram na cutícula e digerem os tecidos internos, levando-as à morte (GIROTTTO et al., 2008).

Trabalhando com esporos do fungo *Duddingtonia flagrans* misturados à ração, PEÑA et al. (2002) obtiveram uma redução de 90% do número larvas de *Haemonchus contortus* em fezes de caprinos, quando estes recebiam durante 7 dias uma dose diária de 500 esporos.

O método seletivo Famacha, desenvolvido na África do Sul, consiste em classificar o estado anêmico do animal em cinco graus, baseado na avaliação da coloração da conjuntiva ocular que está significativamente correlacionada com o hematócrito. No método Famacha, apenas os animais que apresentam anemia clínica (Categoria 3, 4 e 5), recebem tratamento anti-helmíntico, desta forma, diminui o desenvolvimento da resistência (MOLENTO et al., 2004).

2.3 DROGAS ANTI-HELMÍNTICAS

Vários produtos anti-helmínticos vem sendo utilizados no tratamento de nematóides, tendo como princípio ativo benzimidazóis, avermectinas, imidazotiazóis e salicilanilidas, sendo este último amplamente utilizado contra *Haemonchus* spp. (BORGES, 2003).

Os benzimidazóis se conjugam com a tubulina, que é uma proteína estrutural, bloqueando sua polimerização e consequentemente impedindo a formação dos microtúbulos. Isto danifica as funções de integridade e transporte das células dependentes desta estrutura, interferindo nos neurotransmissores, na absorção de nutrientes, na divisão e na organização celular, levando o parasito à morte (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

As avermectinas são responsáveis por causar uma hiperpolarização da musculatura dos nematódeos, abrindo irreversivelmente os canais de cloro, provocando o aumento da liberação do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) acarretando em aumento da conjugação do GABA com seus receptores pós-sinápticos, tendo como consequência a paralisia dos músculos, principalmente do esôfago o que impossibilita a alimentação do parasito (MARTIN, 1997).

A atividade anti-helmíntica dos imidazotiazóis consiste em provocar uma paralisia espástica nos nematódeos, determinando uma contração muscular estável, o que facilita a eliminação do parasito (KÖHLER, 2001).

As salicilanilidas agem interferindo na produção de ATP nos parasitos, desacoplando as reações da fosforilação oxidativa mitocondrial. Segundo Swan (1999), o closantel representa a droga mais importante do grupo, sendo extensivamente usada no controle da infecção por *Haemonchus contortus*, *Fasciola hepatica* e *Oestrus ovis* em ovinos.

Estudos realizados por Lacerda et al. (2009) sobre as vias de aplicação (oral e intramuscular) do closantel no controle de helmintos gastrintestinais em ovinos, demonstraram que apesar de não haver diferença significativa entre as formas de aplicação, a administração por via oral possibilitou um maior controle apresentando 96% de eficácia, enquanto que por via intramuscular a eficácia foi de 73%.

Hennessy; Ali (1997) destacaram que a redução no consumo de alimentos antes da administração do closantel é de extrema importância, uma vez que, a diminuição do fluxo digestório prolonga o tempo de permanência do anti-helmíntico no trato gastrintestinal, aumentando sua absorção. Desta forma, os autores recomendaram jejum aos animais antes da administração de closantel. Após administração, o closantel entra na corrente sanguínea e se liga fortemente a albumina sérica, isso resulta no prolongamento dos níveis plasmáticos e da eficácia da droga, principalmente nos parasitos hematófagos, como o *Haemonchus contortus* (ROTHWELL; SANGSTER, 1997).

Ao administrarem closantel marcado radioativamente com carbono-14, Michiels; Meuldermans; Heykants (1987), puderam determinar que a concentração máxima alcançada pela droga no plasma sanguíneo é de 48 µg/mL, obtida 24 horas após a administração. Demonstraram ainda que sua meia-vida é de aproximadamente 2 a 3 semanas, o que possivelmente está relacionada com sua ligação a albumina, que apresenta uma meia-vida de 20 dias. Decorridos 56 dias da administração, os autores ainda encontraram resíduos da droga no plasma na concentração de 8,60 µg/mL.

A intoxicação por closantel em animais ocorre quando o produto é utilizado em sobredosagem, podendo provocar apatia, depressão acentuada, cólica, fraqueza dos membros, decúbito lateral, cegueira, alterações nervosas associados a *status spongiosus* (degeneração esponjosa) e até mesmo a morte (FURLAN et al., 2009). Segundo Cadioli et al. (2008) a dose de segurança varia entre 5 a 10 mg/Kg de peso vivo do animal.

Segundo Melo; Bevilaqua (2005) o aparecimento de cepas de nematóides resistentes aos anti-helmínticos pode ser explicado pela teoria da evolução, que tem como ponto básico a seleção natural, ou seja, os indivíduos mais adaptados sobrevivem e se reproduzem. Desta forma, Geary; Sangster; Thompson (1999) afirmaram que o fator mais importante para a resistência é a diversidade genética da espécie, onde aqueles que carregam genes que reduzem a susceptibilidade a uma droga serão selecionados.

Em estudo realizado por Prichard (2001), verificou-se que *Haemonchus contortus* tem uma taxa de mutação do DNA mitocondrial dez vezes maior que nos vertebrados e o DNA nuclear é extremamente diverso, demonstrando a grande variabilidade genética deste

parasito, que juntamente com a alta prolificidade da espécie, onde as fêmeas podem eliminar mais que 10.000 ovos por dia, potencializam a disseminação da resistência.

Conforme Wolstenholme et al. (2004), os mecanismos de resistência aos anti-helmínticos podem ser específicos ou inespecíficos, sendo que o primeiro estão associados à ação da droga anti-helmíntica, enquanto os outros se referem a alterações no receptor da droga ou na modulação da concentração do fármaco.

A resistência aos benzimidazóis, por exemplo, tem sido associada com modificações relacionadas à tubulina, onde ocorre uma mutação que causa a troca do aminoácido fenilalanina pela tirosina na posição 200 do gene da β -tubulina, isso acarreta na diminuição dos sítios de alta afinidade à droga nas subunidades protéicas dos microtúbulos (KWA; KOOYMAN; BOERSEMA, 1993), em relação aos imidazotiazóis, a resistência ocorre devido à alteração farmacológica dos receptores de acetilcolina (SANGSTER, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas instalações da Fazenda Joamar em Pindamonhangaba-SP, no Laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) de Pindamonhangaba-SP, no Laboratório de Análises Clínicas Lacon em Volta Redonda-RJ e no Laboratório de Probióticos do DEBIQ/EEL-USP.

3.1 MICRO-ORGANISMOS E PREPARAÇÃO PROBIÓTICA

3.1.1 Lactobacilos

No presente trabalho foram utilizados para a formulação da preparação probiótica, quatro cepas de lactobacilos: *Lactobacillus casei* ATCC 7469, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. acidophilus* ATCC 4536, que se encontram mantidas sob congelamento a -20°C em Caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe) contendo 40% de glicerol (PEREIRA, 2001).

3.1.2 Preparado probiótico

Para ativação, as culturas foram descongeladas a temperatura ambiente e repicadas três vezes consecutivas em caldo MRS esterilizado a 121°C/15 min. e incubadas a 37°C por 24 à 48 horas (BORIS et al., 1997).

Para a formulação da preparação probiótica, as respectivas cepas de *Lactobacillus* foram individualmente ativadas por três vezes consecutivas em caldo MRS, sendo do último repique retirada uma alíquota de 2 mL de cada cultura, a qual foi individualmente transferida para frascos Erlenmyer contendo 200 ml de caldo MRS esterilizado a 121°C/15 min., seguido de incubação a 37°C por 18 horas. Após este período os conteúdos dos 4 frascos foram juntados formando assim o “pool” de lactobacilos, contendo aproximadamente 10^{10} UFC/mL (PEREIRA, 2007). Este “pool” de micro-organismos foi

preparado a cada sete dias e armazenado a 5 °C até o momento da administração aos animais.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente trabalho, com duração de 90 dias, foram utilizados 40 ovinos da raça Santa Inês, fêmeas com idades entre 2 a 4 anos, naturalmente infectados com *Haemonchus contortus*, devidamente confirmado pela presença de ovos e larvas nas fezes. Durante o período diurno, os animais foram mantidos em piquetes no regime de pastagem natural e, no final da tarde encaminhados ao curral, recebendo água e volumoso composto de capim elefante, *ad libitum*.

Para realização do experimento, foi empregada a metodologia do planejamento fatorial, onde foram avaliados dois fatores: preparação probiótica e um anti-helmíntico comercial Diantel® (Closantel 10%). Cada variável foi avaliada em dois níveis de acordo com um planejamento fatorial completo 2² (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), conforme apresentado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Variáveis e níveis estudados

Variáveis Independentes	Variáveis Codificadas	Níveis	
		(Baixo) -1	(Alto) +1
Preparado probiótico	X ₁	0	"pool" contendo aproximadamente 10 ¹⁰ UFC/mL
Diantel®	X ₂	0	1 mL para cada 10 Kg de peso vivo

Tabela 3 – Experimentos realizados conforme o planejamento fatorial completo 2²

Experimentos	(X ₁) Preparado probiótico	(X ₂) Diantel® (Closantel 10%)
Grupo A	- 1	- 1
Grupo B	+ 1	- 1
Grupo C	- 1	+ 1
Grupo D	+ 1	+ 1

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais constituídos de 10 animais cada e submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo A: os animais não receberam nenhum tratamento durante o período do experimento (controle negativo).

Grupo B: os animais receberam em três dias da semana (segunda, quarta e sexta-feira) 10 mL da preparação probiótica durante o período do experimento (efeito probiótico).

Grupo C: os animais receberam, no dia 0 dose única de 1 mL de Diantel® para cada 10 Kg de peso vivo (efeito anti-helmíntico).

Grupo D: os animais receberam, no dia 0, dose única de 1 mL de Diantel® para cada 10 Kg de peso vivo e após 30 dias passaram a receber em três dias da semana (segunda, quarta e sexta-feira) 10 mL da preparação probiótica, sendo interrompido no 60º dia.

A preparação probiótica e o anti-helmíntico (Diantel®) foram administrados por via oral com auxílio de seringa descartável, introduzida diretamente na boca dos animais. Os animais que receberam Diantel® ficaram em jejum por no mínimo 12 horas.

A cada 15 dias, os animais, tiveram suas fezes coletadas e submetidas ao exame parasitológico para se proceder a contagem de ovos da família Trichostrongylidae por grama de fezes (OPG de fezes), por meio da técnica McMaster (1939) e a coprocultura para obtenção de larvas L₃ e identificação do gênero, em conformidade com o método de Roberts e O'Sullivan (1950).

No mesmo período amostras de sangue foram coletadas para realização do hemograma completo, dosagem de ferro e proteínas, além disso, foi realizada a avaliação da coloração da mucosa conjuntiva ocular, para determinar o grau de anemia “*in situ*” pelo método Famacha descrito por Van Wijk; Bath (2002), conforme apresentado na Tabela 4, sendo o tratamento interrompido quando os animais atingiram a categoria 4 ou 5.

Tabela 4 - Características do Método Famacha

Categorias	Coloração da Conjuntiva*	Hematócrito (%)	Conduta Clínica**
1	Vermelho robusto	30	Não vermifugar
2	Vermelho rosado	25	Não vermifugar
3	Rosa	20	Vermifugar
4	Rosa pálida	15	Vermifugar
5	Branco	10	Vermifugar

* O avaliador deve ser treinado para estimar corretamente a coloração e evitar a divergência de interpretação no momento do exame clínico.

** A indicação do tratamento antiparasitário no cartão é baseada unicamente na coloração da conjuntiva.

Fonte: Molento et al. (2004)

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 Exame parasitológico e coprocultura

As fezes dos animais foram coletadas diretamente da ampola retal e processadas pela técnica de McMaster, onde 4 g de fezes foram diluídas com 56 mL de solução saturada de cloreto de sódio 30 a 35% (densidade 1.120 a 1.200) em Becker com capacidade de 100 mL. Em seguida a câmara de McMaster foi preenchida com esta suspensão para proceder à análise por microscopia óptica (Nikon) em aumento de 100x. O valor encontrado nos dois campos da câmara foi dividido por dois para obtenção de uma média e multiplicado pelo fator 100 para a obtenção do OPG de fezes, para fezes semi-diarréicas e diarréicas o fator utilizado foram 200 e 600 respectivamente (NICIURA et al., 2009).

Para a coprocultura, as fezes foram depositadas em um recipiente de vidro e tampadas com uma placa de Petri, sendo borrifadas com água para aumentar a umidade, seguido de cultivo à temperatura ambiente por 10 dias. Transcorrido o tempo de cultivo, o frasco de vidro teve seu volume completado com água e, para recuperação das larvas, frasco e placa foram invertidos bruscamente, em seguida a placa de Petri também foi preenchida com água, após 4 horas seu conteúdo foi recolhido com pipeta, acondicionado em tubo de ensaio identificado e armazenado em geladeira por 3 horas para a decantação

das larvas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o sedimento analisado em microscopia óptica com aumento de 400x (NICIURA et al., 2009).

3.3.2 Coleta sanguínea

A coleta de sangue, foi realizada com auxílio de uma seringa descartável por meio de punção venosa na veia jugular (Figura 3), sendo 4 mL transferidos para tubo de ensaio contendo EDTA como anticoagulante e em seguida homogeneizado, para realização do hemograma. O restante da amostra (6 mL), foi transferido para tubo de ensaio seco e após coagulação do sangue, foi centrifugado por 600 x g por 10 min. para obtenção do soro, utilizado nas dosagens bioquímica de ferro e proteínas totais e frações.

Figura 3 – Punção venosa

3.3.3 Exame do tecido hematopoético

Após a coleta, com auxílio de um esfregaço em lâmina com as bordas cortadas, foi confeccionado filme sanguíneo que em seguida foi corado pelo método de Leishman (BAIN, 1998).

O hemograma foi realizado por meio de contador automático Cell-Dyn 3500, da marca Abbott. As contagens diferenciais dos leucócitos foram confirmadas, analisando-se os filmes sanguíneos, com auxílio do microscópio óptico em objetiva de 100x (Nikon).

3.3.4 Dosagens de ferro e proteínas totais e frações

Após a coleta de sangue e obtenção do soro, o mesmo foi aliquotado em tubo de soroteca e transferido para o analisador bioquímico Metrolab 2300, da marca Wiener lab. A dosagem de ferro, proteína total e albumina foram realizadas segundo as metodologias de Goodwin, biureto, e verde de bomocresol, respectivamente. A concentração de globulina foi determinada pela diferença entre a concentração de proteína total e a concentração de albumina conforme proposto pelo fabricante (Wiener lab).

3.3.5 Exame para verificação do estado anêmico dos animais “*in situ*”

A inspeção da mucosa conjuntiva ocular foi realizada em triplicata por técnicos devidamente treinados, onde compararam diferentes tonalidades, de vermelho-rosado até branco pálido, da conjuntiva com o cartão guia FAMACHA®. No cartão as tonalidades estão representadas com números de 1 a 5 que determinam o grau de anemia dos animais, onde quanto maior o grau Famacha, pior o estado anêmico. Os animais que atingiram um estado anêmico correspondente a categoria 4 ou 5, pelo teste Famacha foram tratados com anti-helmíntico Diantel® na dose de 1 mL para cada 10 Kg de peso vivo e excluídos do experimento (Van WYK; BATH, 2002).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e Dunnet para verificar as diferenças entre os tratamentos. Para avaliar a correlação entre a contagem de OPG de fezes e o percentual de hematócrito, foi utilizada a correlação de Pearson. Estes testes foram realizados utilizando os softwares Excel e BioEstat 5.0. Também foi

determinado a eficácia de cada tratamento conforme metodologia proposta por Niciura et al. (2009) empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Eficácia} = \frac{Média\ OPG_{controle} - Média\ OPG_{tratamento}}{Média\ OPG_{controle}} \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE *Haemonchus contortus*

No presente trabalho os ovinos foram distribuídos em 4 grupos no sentido de se verificar o efeito de micro-organismos probióticos, bem como do vermífugo Diantel® sobre *Haemonchus contortus*, cujos resultados, referentes a OPG de fezes, encontram-se apresentados na Tabela 5 (Apêndice A).

Verifica-se que os animais do grupo B (probiótico) apresentaram ao longo do experimento contagens de OPG inferiores aos do grupo C (Diantel®), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), através do teste ANOVA. Nota-se ainda que os animais do grupo B também apresentaram contagens de OPG inferiores ao grupo A (controle), porém não significativa ($p > 0,05$). Observa-se também que a contagem de OPG no grupo B, após 90 dias de experimento, manteve-se em níveis constantes demonstrando, desta forma, que o “pool” de micro-organismos probióticos apesar de não apresentar uma ação direta sobre *H. contortus*, foi capaz de manter o equilíbrio entre parasito e hospedeiro.

Tabela 5 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de OPG de fezes nos animais submetidos a diferentes tratamentos

Grupos	Tempo de Experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
A	930 $\pm$ 819	1030 $\pm$ 1226	2140 $\pm$ 3484	2490 $\pm$ 5528	1163 $\pm$ 1363	1063 $\pm$ 701	1257 $\pm$ 1465
B	744 $\pm$ 693	556 $\pm$ 450	722 $\pm$ 533	1263 $\pm$ 1449	788 $\pm$ 588	738 $\pm$ 494	763 $\pm$ 560
C	822 $\pm$ 822	633 $\pm$ 710	900 $\pm$ 694	3971 $\pm$ 3997	4750 $\pm$ 4772	4886 $\pm$ 5013	6000 $\pm$ 9193
D	775 $\pm$ 824	100 $\pm$ 94	457 $\pm$ 425	1643 $\pm$ 2774	3375 $\pm$ 4811	3288 $\pm$ 5167	3375 $\pm$ 7541

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2009) ao incluírem na dieta de cordeiros o simbiótico comercial “BioSyn MOS® ovinos e caprinos”, constituído por *Saccharomyces cerevisiae* ($4,1 \times 10^9$ UFC/g), *Lactobacillus casei* e *L. acidophilus*

($2,8 \times 10^7$ UFC/g), mananoligossacarídeo, biotina, histidina, vitaminas A, E, B12 e D3. Os autores reportaram que ao final de 45 dias de confinamento, o grupo simbiótico apresentou a contagem de 863 OPG contra 2863 OPG no grupo controle, destacando que o preparado simbiótico apresentou uma eficácia significativa ($p < 0,05$) de 70% na redução de OPG.

Gallina et al. (2009) infectaram experimentalmente ovinos com 5000 larvas de terceiro estágio (L_3 infectante) de *H. contortus*, 15 dias depois de incluir uma preparação probiótica constituída de *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *S. boulardii* e *S. cerevisiae* na dieta dos animais. Observaram que após 49 dias de infecção, ocorreu uma redução no número de ovos nas fezes dos animais dos grupos que receberam a referida preparação probiótica, porém, não significativa quando comparado ao grupo controle.

Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram ainda que a partir do 45º dia de tratamento, os animais do grupo C (Diantel®) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem OPG quando comparado aos grupos A (controle) e B (probiótico). Estes resultados demonstram a baixa eficácia apresentada pelo vermífugo Diantel® no controle de *H. contortus*.

Em relação ao grupo D no qual os animais receberam uma dose de Diantel® no início do experimento e entre os dias 30 e 60, receberam 10 mL da preparação probiótica em estudo, foi observada no primeiro mês de experimento, onde os animais estiveram sob o efeito do anti-helmíntico, que a redução do OPG foi significativa ($p < 0,05$) quando comparando ao grupo controle, porém, no segundo mês ocorreu um considerável aumento, alcançando no 60º dia contagem de OPG de 3375. Verifica-se, desta forma, que a preparação probiótica não exerceu efeito sobre a prevenção da infestação por *H. contortus*, tendo em vista, provavelmente a sensibilidade das cepas de *Lactobacillus* ao princípio ativo (closantel) do Diantel®. Acrescenta-se ainda que os níveis de OPG observados nos grupos C e D após 60 dias de tratamento sugerem uma nova aplicação de Diantel®, conforme preconizado pelo fabricante.

Neste contexto, vale salientar que em trabalho realizado por Hlasta et al. (1998) no sentido de identificar o farmacóforo (parte da estrutura química de um composto importante para a sua atividade biológica, onde substituições em sua composição podem ser feitas para aumentar a atividade ou eliminar os efeitos secundários indesejados) do closantel na tentativa de formar novos compostos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, estes autores verificaram por meio do MIC (Concentração Inibitória Mínima), que 1 µg/mL do closantel foi capaz de inibir o crescimento de cepas de

Staphylococcus aureus metilicina resistente e *Enterococcus faecium* vancomicina resistentes.

No que diz respeito à avaliação da eficácia de cada tratamento sobre a infestação por *H. contortus*, verifica-se na Tabela 6 que o valor máximo obtido para a preparação probiótica em estudo foi de 66,3% após 30 dias de tratamento. No tocante ao Diantel®, observa-se que a eficácia máxima (90,3%) foi obtida nos animais do grupo D, após 15 dias de experimento, sendo que, após 60 dias, a eficácia de ação foi mínima, o que sugere uma nova aplicação do vermífugo. Vale salientar que a discrepância nos valores obtidos entre os grupos C e D, se deve possivelmente, ao fato que alguns animais desses grupos pudessem estar hospedando parasitos resistentes ao closantel (CHARON, 2004)

Neste sentido, vale ressaltar que de acordo com Sreter; Molnar; Kassai (1994) a tolerância ao parasitismo pode variar entre indivíduos de raças diferentes e mesmo dentro da própria raça, provocando uma desuniformidade na distribuição dos helmintos no rebanho.

Tabela 6 – Valores de eficácia de redução de OPG nas fezes de animais submetidos a diferentes tratamentos

Grupos	Período de Tratamento (dias)					
	15	30	45	60	75	90
B	46,1%	66,3%	49,3%	32,3%	30,6%	39,3%
C	38,5%	57,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
D	90,3%	78,6%	34,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Inúmeros casos de resistência ao closantel tem sido registrados no país. Ramos et al. (2002), avaliando a atuação de anti-helmínticos em 65 rebanhos de ovinos do estado de Santa Catarina, identificaram resistência ao closantel em 13% dos rebanhos, sendo que 100% das larvas isoladas eram de *Haemonchus*.

Avaliando a eficácia de ação de diferentes anti-helmínticos sobre parasitos gastrointestinais de ovinos na Região Noroeste do Estado do Paraná, Ramalho et al. (2008) avaliaram 36 ovinos, distribuídos em três lotes, os quais receberam diferentes tratamentos a base de levamisole (5 mg/kg), closantel (5 mg/kg) e moxidectina (0,2 mg/kg). Os autores reportaram resistência dos parasitos a todos os anti-helmínticos avaliados, sendo que a

resistência por *H. contortus* aos três princípios ativos avaliados foi extremamente alta, tendo apresentado valores de 90,84% ao levamisole, e 100% ao closantel e moxidectina.

Resultado semelhante ao obtido no presente trabalho (57,9%) foi reportado por Falbo et al. (2009), onde registraram por meio da redução da contagem de OPG, eficácia de ação do closantel de apenas 55,2% em cordeiros naturalmente infectados com *Haemonchus* sp.. Empregando a mesma metodologia, Almeida et al. (2010) observaram uma múltipla resistência por *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos no estado de São Paulo, sendo que em nenhum dos animais tratados com closantel verificou-se uma redução na contagem do OPG. Em levantamento realizado no estado de Mato Grosso do Sul por Sczesny-Moraes et al. (2010), apenas 6,7% do rebanho apresentaram indivíduos sensíveis ao closantel.

Verifica-se desta forma que há necessidade de aplicação de uma nova dose do Diantel® após 60 dias e seus possíveis efeitos colaterais, como: apatia, depressão, cólica, decúbito lateral, cegueira, distúrbios neurológicos (FURLAN et al., 2009), podem ser observados.

4.2 AVALIAÇÃO DO TECIDO HEMATOPOÉTICO

4.2.1 Leucograma

Segundo Lee et al. (1998) o leucograma consiste de um exame que permite a identificação e verificação da evolução de diversos processos patológicos, onde se avalia tanto a contagem global (Leucometria), como também a contagem diferencial dos leucócitos.

Observa-se que, no tocante a leucometria (Tabela 7 e Apêndice B), os valores obtidos para os animais que receberam a preparação probiótica em estudo (Grupo B) foram estatisticamente ($p < 0,05$) inferiores aos obtidos com os animais que não receberam probióticos (Grupos A e C) ao longo do período do experimento. O mesmo foi observado em estudo realizado por Pereira (2007), quando se comparou animais tratados (com preparado probiótico) com animais infectados por *Eimeria* spp, segundo o autor esta diferença pode estar relacionada com a produção de citocinas, induzida pelos lactobacilos quando presentes na mucosa do intestino, que poderiam estar interagindo com as células da

corrente sanguínea. Estas estariam promovendo o deslocamento do “pool” central de células leucocitárias para o “pool” marginal, favorecendo desta maneira a diapedese, para em seguida exercer suas funções sobre o parasito (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Nota-se ainda que os resultados obtidos para os diferentes grupos avaliados, exceto grupo A (controle) após 45 dias, encontram-se dentre dos valores de referência reportado na literatura, que variam entre 4000 a 12000 / μ L (AIELLO, 2001).

Tabela 7 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da leucometria (Leucócitos/ μ L) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Grupos	Tempo de Experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
A	7930 $\pm$ 2285	9660 $\pm$ 3341	9040 $\pm$ 2234	12290 $\pm$ 3303	10775 $\pm$ 3287	8388 $\pm$ 2670	7513 $\pm$ 2168
B	6122 $\pm$ 1224	6378 $\pm$ 933	7000 $\pm$ 1320	9067 $\pm$ 1577	7900 $\pm$ 1284	6900 $\pm$ 1184	6000 $\pm$ 904
C	7833 $\pm$ 1955	7878 $\pm$ 2184	8433 $\pm$ 2277	11163 $\pm$ 2024	10186 $\pm$ 2331	9800 $\pm$ 3838	10900 $\pm$ 3258
D	8988 $\pm$ 2420	8738 $\pm$ 1701	8500 $\pm$ 1812	11163 $\pm$ 2932	10463 $\pm$ 2429	8463 $\pm$ 2365	8213 $\pm$ 2178

Zacharias (2004) em estudo sobre efeito de tratamento homeopático sobre a infecção causada por *H. contortus* em ovinos, com duração de 68 dias, também encontrou valores de leucometria normais, com médias de 9160/ μ L no grupo controle, 9070/ μ L no grupo tratado com anti-helmíntico e 8625/ μ L no grupo tratado com o homeopático.

Em relação à contagem diferencial dos leucócitos, verifica-se na Tabela 8 que os valores obtidos para eosinófilos, apresentaram alterações após 45 dias nos animais dos grupos C e D. Tendo em vista que os eosinófilos, através da ação tóxica de seus grânulos citoplasmáticos, estão diretamente envolvidos na resposta imune contra organismos não fagocitáveis, como os helmintos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), seu aumento se deve a maior atividade parasitária, observada através da contagem de OPG, que a partir na mesma data também aumentou significativamente.

Nota-se ainda (Tabela 8) que, em decorrência da diminuição do número de linfócitos, observou-se um aumento no número de neutrófilos segmentados nos grupos A, C e D. Quanto aos demais parâmetros avaliados (neutrófilos bastão, basófilos e monócitos), os valores obtidos não diferem estatisticamente entre si nos diferentes grupos estudados.

Tabela 8 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem diferencial de células leucocitárias dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Grupos	Tempo de Experimento (dias)											
	0						15					
	Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)	Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)
A	0.3 ± 0.7	55.4 ± 8.2	4.0 ± 3.0	0.1 ± 0.1	38.7 ± 10.8	1.5 ± 2.4	0.2 ± 0.4	56.1 ± 11.0	5.7 ± 4.0	0.0 ± 0.0	36.6 ± 11.0	1.4 ± 0.3
B	0.1 ± 0.3	48.6 ± 8.5	6.3 ± 2.1	0.0 ± 0.0	44.3 ± 9.0	0.7 ± 0.7	0.2 ± 0.4	53.1 ± 8.5	7.1 ± 6.6	0.0 ± 0.0	38.3 ± 9.8	1.3 ± 1.7
C	0.6 ± 1.1	50.4 ± 10.8	7.3 ± 4.6	0.1 ± 0.1	40.6 ± 10.5	1.0 ± 1.7	0.2 ± 0.4	53.0 ± 13.1	6.7 ± 4.9	0.0 ± 0.0	38.7 ± 9.8	1.4 ± 3.2
D	0.3 ± 0.5	45.5 ± 7.7	7.2 ± 5.8	0.1 ± 0.0	46.1 ± 11.7	0.8 ± 1.2	0.4 ± 0.5	47.5 ± 9.1	7.4 ± 2.8	0.0 ± 0.1	44.4 ± 7.7	0.3 ± 0.1

Tabela 8 – (continuação)

Grupos	Tempo de Experimento (dias)											
	30						45					
	Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)	Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)
A	0.5 ± 0.7	54.6 ± 8.3	5.5 ± 3.5	0.0 ± 0.0	38.0 ± 8.6	1.4 ± 2.0	0.3 ± 0.7	54.4 ± 8.7	7.8 ± 3.8	0.0 ± 0.0	36.0 ± 8.9	1.5 ± 2.4
B	0.1 ± 0.3	47.8 ± 9.5	9.8 ± 5.1	0.0 ± 0.1	41.2 ± 13.1	1.1 ± 1.6	0.1 ± 0.3	47.2 ± 12.7	9.2 ± 5.5	0.0 ± 0.0	43.0 ± 13.0	0.5 ± 0.7
C	0.1 ± 0.3	46.0 ± 11.2	9.9 ± 7.2	0.0 ± 0.0	42.3 ± 11.5	1.7 ± 2.9	0.2 ± 0.3	48.1 ± 10.4	10.9 ± 5.5	0.0 ± 0.1	40.0 ± 7.4	0.8 ± 1.3
D	0.3 ± 0.7	42.8 ± 7.8	8.0 ± 3.1	0.0 ± 0.0	48.7 ± 7.5	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.7	45.5 ± 7.0	11.1 ± 5.2	0.1 ± 0.2	41.0 ± 8.9	1.7 ± 2.7

Tabela 8 – (continuação)

Grupos	Tempo de Experimento (dias)											
	60						75					
	Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)	Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)
A	1.1 ± 1.5	54.8 ± 6.2	6.7 ± 3.9	0.1 ± 0.2	35.6 ± 7.1	1.7 ± 2.4	0.3 ± 0.7	57.7 ± 5.3	8.2 ± 2.3	0.1 ± 0.1	33.2 ± 7.1	0.5 ± 0.8
B	0.1 ± 0.3	45.8 ± 9.5	8.4 ± 5.5	0.0 ± 0.0	45.4 ± 10.3	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.2	45.7 ± 10.7	9.5 ± 3.9	0.1 ± 0.2	42.9 ± 12.5	1.7 ± 2.1
C	0.6 ± 0.8	49.9 ± 10.2	10.3 ± 7.8	0.0 ± 0.0	38.0 ± 6.8	1.2 ± 1.7	0.1 ± 0.1	50.5 ± 12.9	12.1 ± 6.2	0.1 ± 0.1	35.1 ± 10.7	2.1 ± 2.8
D	0.4 ± 0.7	49.0 ± 13.0	10.7 ± 7.4	0.1 ± 0.1	38.5 ± 7.6	1.3 ± 1.9	0.1 ± 0.3	49.2 ± 9.1	11.6 ± 6.8	0.1 ± 0.3	38.3 ± 6.7	0.7 ± 0.7

Tabela 8 – (continuação)

Grupos	Tempo de Experimento					
	90					
	Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)
A	0.1 ± 0.4	57.8 ± 7.2	5.1 ± 1.7	0.0 ± 0.0	35.4 ± 5.2	1.6 ± 1.4
B	0.1 ± 0.4	49.7 ± 11.0	6.2 ± 4.3	0.1 ± 0.2	41.9 ± 13.8	2.0 ± 2.7
C	0.3 ± 0.5	51.9 ± 12.5	10.8 ± 7.2	0.1 ± 0.2	35.4 ± 11.5	1.5 ± 3.4
D	0.3 ± 0.7	53.1 ± 8.6	10.9 ± 1.8	0.1 ± 0.2	34.7 ± 9.2	0.9 ± 1.1

Valores de Referência (AIELLO, 2001)

Nbast (%)	Nseg (%)	EOS (%)	BAS (%)	LIN (%)	MON (%)
0 - 1	10 - 50	0 - 10	0 - 3	40 - 75	0 - 6

Nbast = Neutrófilo bastão, Nseg = Neutrófilo segmentado, EOS = Eosinófilos, BAS = Basófilos, LIN = Linfócitos, MON = Monócitos

De acordo com Rahman; Collins (1991), os valores normais de leucometria nos casos de infecção por *Haemonchus* sp. seriam provocados pela linfopenia (redução dos linfócitos) causada pelo parasito, conforme observado no presente trabalho (Figura 4). Nota-se que os animais do grupo A apresentaram uma ligeira linfopenia, inferior a 40.0% (Aiello, 2001), durante todo experimento e os animais dos grupos C e D apresentaram uma redução após 45 dias, correlacionado com o aumento do número OPG.

Figura 4 – Contagem relativa dos linfócitos dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Avaliando o efeito de verminose na resposta imune de caprinos, Silva et al. (2002), estudaram 90 animais adultos, naturalmente infectados que foram distribuídos em três grupos com base na contagem de OPG nas fezes, sendo Grupo I de 0 a 500, Grupo II de 501 a 2000 e Grupo III > 2000 OPG. Os resultados demonstram que a contagem absoluta de linfócitos dos animais dos Grupos I e II esteve acima de 4100 cel/ μ L e os animais do Grupo III apresentaram média de 2600 cel/ μ L. Os autores concluíram que existe uma correlação negativa entre a contagem de OPG e o número de linfócitos.

Por outro lado, verifica-se (Figura 4) que número de linfócitos manteve-se normal nos animais do grupo B, diferindo estatisticamente do grupo A (controle), demonstrando que a inclusão da preparação probiótica na dieta dos ovinos apresentou um efeito imunomodulador positivo, estimulando a produção dos linfócitos.

Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune pelo aumento da produção de anticorpos,

ativação de macrófagos, proliferação de linfócitos T, produção de citocinas entre outros (BUDIÑO et al., 2004; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

Shu; Qu; Gill (2001) relataram que leitões tratados com *Bifidobacterium lactis* HN019 apresentaram diminuição na incidência de diarreia associada com Rotavírus e *Escherichia coli*, concomitante ao aumento dos títulos de anticorpos e da resposta proliferativa dos linfócitos T.

Benyacoub et al. (2005) atribuíram ao aumento no percentual de linfócitos T-CD4⁺ e de anticorpos IgA na mucosa intestinal, a redução do número de trofozoítos de *Giardia* no intestino de camundongos, provocada pela inclusão de probiótico na dieta dos animais.

Segundo Murphy; Travers; Walport (2009), a resposta imunológica contra os helmintos gastrintestinais é dependente dos linfócitos. Os antígenos dos helmintos promovem a polarização e consequente proliferação dos linfócitos T CD4⁺ para resposta Th2, os quais produzem e secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Essas citocinas em conjunto, suprimem a resposta imune celular e estimulam a produção de anticorpos, especialmente IgE pelos linfócitos B, a proliferação de mastócito e promovem o recrutamento de eosinófilos. Os eosinófilos são atraídos para os sítios de invasão dos helmintos por moléculas quimiotáticas liberadas pelos mastócitos e por meio de seus receptores se ligam as IgE que revestem a superfície do parasito, esta ligação desencadeia sua degranulação, com liberação de proteína e enzimas tóxicas para os helmintos.

4.2.2 Eritrograma

Segundo Radostitis et al. (2002), a principal característica da hemoncose é a anemia, provocada pelo hematofagia do parasito. Assim, anemia é uma doença caracterizada fisiologicamente pela insuficiência de hemoglobina (Hb), podendo ser provocada por produção diminuída, destruição aumentada ou perda excessiva de hemácias, conforme observado na hemoncose (AIELLO, 2001).

Tendo em vista a avaliação do efeito da preparação probiótica sobre o estado anêmico dos animais realizou-se o eritrograma (Apêndices C, D e E), que consiste no exame para determinação da contagem global de hemácias, concentração de hemoglobina, percentual de hematócrito, além dos índices hematimétricos (LEE et al., 1998), cujos resultados da contagem de hemácias encontram-se apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de hemácias ($n^\circ \times 10^6/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Grupos	Tempo de Experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
A	9.47 ± 0.80	9.15 ± 1.11	8.83 ± 1.40	7.91 ± 1.33	8.26 ± 0.46	8.01 ± 0.41	8.19 ± 0.61
B	9.4 ± 0.61	9.09 ± 0.73	8.92 ± 0.62	8.63 ± 0.67	8.83 ± 0.44	8.76 ± 0.48	8.73 ± 0.64
C	9.04 ± 0.67	8.81 ± 0.88	9.24 ± 0.74	8.82 ± 0.86	8.52 ± 1.00	7.84 ± 1.30	7.96 ± 1.27
D	9.73 ± 0.76	9.68 ± 0.69	9.70 ± 0.75	9.03 ± 0.84	9.25 ± 0.89	8.43 ± 0.79	8.61 ± 1.02

No que se refere ao número total de hemácias, Aiello (2001) reporta como valores normais para ovinos, contagens entre 9 a $15 \times 10^6/\mu\text{L}$. Observa-se desta forma, que apenas os animais do Grupo D apresentaram contagem dentro dos limites de referência até o 60º dia, enquanto que os animais dos grupos A (controle) e B (probiótico), após 30 dias apresentaram redução.

Os valores do número de hemácias situados abaixo dos valores de referência, condizem com o quadro de anemia dos animais resultante da infecção por *H. contortus*, onde um verme adulto pode consumir 0,05 mL de sangue por dia, provocando uma considerável perda sanguínea no animal hospedeiro (URQUHART et al., 1998).

De acordo com Aiello (2001) os valores fisiológicos normais de concentração de hemoglobina para ovinos, compreende a faixa entre 9 a 15 g/dL, enquanto o percentual de hematócrito varia entre 27 a 45%, sendo que valores abaixo podem indicar um certo grau de anemia.

A Figura 5 apresenta a variação da concentração de hemoglobina nos animais dos diferentes grupos durante o experimento.

Figura 5 – Concentração de hemoglobina nos animais submetidos a diferentes tratamentos

Nota-se uma redução constante da concentração de hemoglobina nos animais do grupo A (controle), sendo que após 45 dias de experimento estes valores atingiram 7,7 g/dL. Vale destacar que 2 animais foram eliminados do grupo e tratados com anti-helmíntico tendo em vista atingirem a categoria 4 e 5 na escala FAMACHA, correspondendo a 6,2 e 2,7 g/dL de hemoglobina e 17,8 e 8,5% de hematócrito, respectivamente.

Em relação aos animais do grupo C (Diantel®), observa-se uma intensa queda nos valores destes parâmetros após 45 dias, atingindo concentrações de 7,8 g/dL de hemoglobina e 23,4% de hematócrito ao final do experimento, sendo observado que dois animais apresentaram intensa anemia e receberam nova dose de vermífugo após 75 dias de experimento.

Quanto aos animais que receberam probióticos (Grupo B), observa-se que apenas nos dias 45 e 90 o valor de hemoglobina (8,9 g/dL) ficou abaixo do valor de referência em ambos os períodos. No que se refere aos animais do grupo D, nota-se que até o 30º dia do experimento estes valores se mantiveram constantes e a partir do 45º dia iniciou-se uma queda, persistindo até o final do experimento, onde a concentração de hemoglobina chegou a 8,8 g/dL.

Observa-se ainda que a queda dos valores de hemoglobina e hematócrito, coincidiu com o aumento do número de OPG, demonstrando, desta forma, a perda do efeito do anti-helmíntico sobre o parasito, conforme mostrado na Figura 6. Utilizando a correlação de Pearson verifica-se uma forte correlação negativa entre esses parâmetros nos animais do

grupo C ($r = -0,81$; $r^2 = 0,66$) e do grupo D ($r = -0,90$; $r^2 = 0,82$), sendo ambas estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Este efeito também foi observado por Kawano; Yamamura; Ribeiro (2001) e Oliveira (2008), que reportaram reduções nos valores hematológicos dos animais, coincidindo com o aumento no número de OPG, indicando uma maior atividade parasitária por meio da expoliação sanguínea e hemorragia nos pontos de fixação dos vermes na mucosa do abomaso, levando à necessidade de se repetir a vermifugação.

Figura 6 – Valores da OPG e do percentual de hematócrito dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Quanto aos animais que receberam probióticos durante todo o experimento (Grupo B), a correlação não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), comprovando o fato de que os micro-organismos em estudo promoveram maior tolerância a ação parasitária, mantendo as melhores condições hematológicas. Vale salientar ainda que, durante todo o período do experimento, nenhum animal deste grupo, apresentou-se em condições que levassem a necessidade da interrupção do tratamento e consequente aplicação do anti-helmíntico.

4.3 NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNAS E FERRO

De acordo com Strain; Stear (2001), a evolução da hemoncose depende da habilidade do animal em compensar as perdas de proteínas e de ferro, utilizado na biosíntese de hemoglobina na tentativa do organismo de se recuperar da anemia provocada

pela infecção. Desta forma, no presente trabalho as amostras de sangue dos animais submetidos aos diferentes tratamentos foram submetidas a dosagens de proteínas totais e suas frações e ferro, cujos resultados encontram-se representados nas Figuras 7, 8, 9 e 10 (Apêndices F, G, H e I).

Como valores de referência adotou-se aqueles propostos por Aiello (2001) para ovinos que consistem de 5,9 a 7,8 g/dL para proteína, 2,7 a 3,7 g/dL para albumina, 3,2 a 5,0 g/dL para globulina, e de 166 a 222 $\mu\text{g/dL}$ para ferro.

Os resultados representados na Figura 7 demonstram que, apesar dos valores de concentração de proteínas totais permanecerem dentro da faixa de referência, houve uma redução destes valores ao longo do experimento em todos os grupos.

Figura 7 – Concentração de proteínas totais no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos

No que se refere ao teor de albumina, observa-se (Figura 8) que, ao longo do experimento, os valores obtidos se mantiveram dentro da faixa de referência, com exceção para os animais dos grupos C e D que foram tratados com Diantel®. Nota-se então, que estes animais apresentaram valores de 2,4 e 2,6 g/dL de albumina após 75 e 90 dias de experimento, respectivamente, indicando o início de uma hipoalbuminemia, provocada pela perda sanguínea em detrimento da parasitose.

Figura 8 – Concentração de albumina no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Em relação ao teor de globulina (Figura 9), observa-se que os animais dos grupos B e D mantiveram o nível de globulina sem alteração em relação ao inicial, correspondendo a 4,0 e 4,3 g/dL, respectivamente. Por outro lado, verifica-se nos demais grupos, uma queda discreta ($p>0,05$) na concentração de globulina, assim como observado na concentração de proteínas totais. Nota-se que o menor valor (3,3 g/dL) foi observado com os animais do grupo A, após 60 dias de experimento.

Figura 9 – Concentração de globulina no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Conforme Silva et al. (2005) a globulina é uma fração protéica, sendo dividida em 05 subfrações: alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 e gama globulinas. A fração gama é formada pelos vários tipos de imunoglobulinas, entre elas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que por sua vez, são sintetizadas pelos linfócitos B.

Desta forma, tendo em vista que a IgE está diretamente envolvida na resposta imune sobre helmintos, seria importante se determinar a concentração desta imunoglobulina nos animais para obter melhores informações a respeito da imunidade, todavia, não existem kits comerciais para esta avaliação (ROSALINSKI-MORAES et al., 2008).

Estes resultados demonstram um efeito moderado de hipoproteinemia provocada pela hemoncose, resultando em uma redução discreta nos valores de concentração de proteínas totais, albumina e globulina. Acrescenta-se ainda que a preparação probiótica, administrada aos animais dos grupos B e D após 30 dias de experimento, não resultou em resposta positiva no tocante a manutenção do teor de proteínas totais e frações no sangue.

Diversos autores (VELOSO et al., 2004; BRICARELLO et al., 2005; NOGUEIRA; VOLTOLINI; MOREIRA, 2009) tem destacado a importância de uma suplementação protéica na dieta dos animais acometidos por hemoncose. Estes autores ressaltam que este aporte nutricional pode estar associado com a redução do número de OPG e pode resultar no aumento da imunidade, o que contribuiu para melhorar a capacidade dos ovinos de resistir ao efeito dos nematódeos gastrintestinais.

Quanto aos níveis de ferro, observa-se (Figura 10) que os micro-organismos probióticos exerceram efeito positivo sobre a absorção deste elemento. Nota-se então que, devido à hemoncose, nos animais do grupo A (controle) os níveis de ferro se mantiveram significativamente ($p < 0,05$) inferiores em relação ao grupo B, sendo que após 30 dias de experimento os animais desse grupo apresentaram níveis normais de ferro equivalente a 174 $\mu\text{g/dL}$, demonstrando que a preparação probiótica favoreceu a absorção do ferro.

Em relação aos animais dos grupos C e D observa-se que a variação do nível de ferro seguiu o mesmo comportamento verificado com a concentração de hemoglobina e percentual de hematócrito, que consistiu em um aumento gradativo até 45 dias de tratamento seguido de queda constante até o final do experimento. Esta observação revela que a queda dos níveis destes compostos coincide com o aumento do número de OPG, devido à redução do efeito do Diantel® o que sugere uma nova aplicação deste vermífugo, conforme recomendado pelo fabricante.

Figura 10 – Concentração de ferro no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos

O efeito positivo sobre o nível sérico de ferro demonstrado pelas cepas de *Lactobacillus* que compõem a preparação probiótica em estudo, pode ser explicado pela ação dessas espécies no trato gastrointestinal, influenciando favoravelmente a biodisponibilidade, a digestibilidade e a absorção de alguns nutrientes da dieta dos animais, conforme reportado por Saad (2006). Acrescenta-se ainda que, segundo Huaynate (2008), as respostas mais expressivas resultantes da administração de probióticos são notadas nos animais estressados, como por exemplo aqueles acometidos por verminoses.

Uma outra explicação para o efeito observado se deve ao fato que os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias lácteas levam à diminuição do pH intestinal, ocasionando a solubilização dos minerais e de seus complexos previamente formados. Estes elementos são melhores absorvidos pelos enterócitos na forma ionizada, atravessando com maior facilidade a membrana celular (YBARRA et al., 2003).

Huyanate et al. (2007), em estudo com suínos alimentados com dietas suplementadas com micro-organismos probióticos verificaram que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) no aproveitamento e absorção de ferro e outros minerais. Os autores ressaltaram que a ausência de resultados positivos pode estar relacionada ao baixo desafio sanitário ao quais os animais foram submetidos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A preparação probiótica constituída por 4 cepas de *Lactobacillus*, na forma de “pool”, apresentou uma eficácia máxima de 66,3% na redução do número de OPG, após 30 dias de tratamento.
- O anti-helmíntico avaliado apresentou uma eficácia máxima de 90,3% na redução do número de OPG, após 15 dias de tratamento, tendo sido evidenciado a necessidade de aplicação de uma nova dose após 60 dias.
- A preparação probiótica quando administrada, nas condições do presente trabalho, apresentou eficácia duradoura quando comparada ao anti-helmíntico avaliado, podendo ser considerada como uma alternativa viável no controle da hemoncose ovina.
- A preparação probiótica quando administrada 3 vezes por semana, 30 dias após o recebimento de uma dose do anti-helmíntico, não contribui positivamente para evitar ou retardar o processo de re-infecção.
- O “pool” de espécies de *Lactobacillus* estimulou o sistema imune dos animais, mantendo a contagem de linfócitos normais, que por sua vez, estão diretamente envolvidos na resposta imune contra os helmintos.
- Os animais que receberam a preparação probiótica em estudo apresentaram melhores condições fisiológicas no que se refere ao estado anêmico tendo em vista o aumento na concentração de hemoglobina, número de hematócrito e concentração de ferro.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando um melhor entendimento sobre a ação de espécies de micro-organismos probióticos sobre a infecção por *Haemonchus contortus*, os resultados do presente trabalho permitem sugerir a realização de novos experimentos, tais como:

- Estudar a resposta imune compreendendo a: Imunidade humoral, dosando citocinas e anticorpos específicos e a Imunidade celular avaliando-se a população e sub-população de linfócitos.

- Criar um grupo, onde os animais isentos de verminose, seriam tratados por meio da administração frequente da preparação probiótica e após 30 dias, seriam infectados experimentalmente com larvas L₃ de *Haemonchus contortus*, com a intenção de se avaliar o efeito da referida preparação probiótica na prevenção da infecção.

- Testar novas formas de preparação e administração da preparação probiótica, na intenção de se desenvolver um produto para ser utilizado na rotina das fazendas, facilitando assim, o manejo dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 574 p.
- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 151-164, 2004.
- AIELLO, S. E. **Manual Merck de Veterinária**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2001. 1861 p.
- ALMEIDA, F. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622–625, 2010.
- AMARANTE, A. F. T. **Controle de endoparasitoses dos ovinos**. Botucatu, 2004. 6 p. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/repman4.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2010.
- ÁVILA, F. A. et al. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 41-46, 2000.
- AXE, D. D.; BAILEY, J. E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 1, p. 8–19, 1995.
- BAIN, B. J. **Células sanguíneas**. Porto Alegre: Artmed, 1998. 118 p.
- BATISTA, C. G. et al. Desempenho e saúde de bezerras alimentadas com leite sem resíduo de drogas antimicrobianas ou leite de vacas tratadas contra mastite adicionado ou não de probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 185-191, 2008.
- BENYACOUN, J. et al. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 153, p. 1171-1176, 2005.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; GUEGUEN, M. Safety and efficacy of probiótico lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 19– 27, 2002.

BORGES, C. C. L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando-se a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitologia Latinoamericana**, v. 58, p. 142-147, 2003.

BORIS, S. et al. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 413-420, 1997.

BOWMAN, D. D. **Georgi's Parasitologia Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1995.

BRICARELLO, P. A. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 75-83, 2004.

BRICARELLO, P. A. et al. Infuence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 99-109, 2005.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, 1994.

BUDIÑO, F. E. L. et al. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 529-536, 2004.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual Review Biochemistry**, v. 58, p. 79-110, 1989.

CADIOLI, F. A. et al. Intoxicação aguda por closantel em cordeiros – relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 23, 2008.

CALVETTE, R.; VILLWOCK, L. H. Perfil da ovinocultura de lã e carne do Rio Grande do Sul e seus desafios para o futuro. In: CONGRESSO DA SOBER 45., 2007, Londrina. **Anais...** Londrina: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2007.

CHARON, K.M. Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. **Animal Science Papers and Reports**, v. 22, p. 135-139, 2004.

CLIMENI, B. S. O.; MONTEIRO, M. V.; CICOTI, C. A. Hemoncose ovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, 2008.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Efeito de probióticos na resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

COELHO, M. D. G. **Avaliação do uso de probióticos no controle da infecção causada por Ancylostomidae em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados**. 2010. 94 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

COUTINHO, T. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

DALLOUL, R. A. et al. Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by *Lactobacillus*-based probiotic. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 28, p. 351-361, 2005.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 8, p.1058-1071, 2006.

DUGGAN, C.; GANNON, J.; WALKER, W. A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 75, p. 789–808, 2002.

FALBO, M. K. et al. Atividade anti-helmíntica do triclorfon e closantel em cordeiros naturalmente infectados por *Haemonchus* sp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 926-930, 2009.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf Acesso em: 20 jun. 2010.

FERNANDES, L. H. et al. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p. 733-740, 2004.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FURLAN, F. H. et al. Intoxicação por closantel em ovinos e caprinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 89-93, 2009.

GALLINA, T. et al. **Utilização de probióticos no controle da infecção de *Haemonchus contortus* em ovinos.** Pelotas, 2009. 4 p. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA00710.pdf>> Acesso em 05 jan. 2010.

GEARY, T. G.; SANGSTER, N. C.; THOMPSON, D. P. Frontiers in anthelmintic pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 275-295, 1999.

GIROTTI, M. J. et al. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, p 21-28, 2008.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 202-209, 2009.

HENNESSY, D. R.; ALI, D. N. The effect of feed intake level on the pharmacokinetic disposition of closantel in sheep. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 1081-1086, 1997.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

HORDEGEN, P. et al. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 51-60, 2003.

HLASTA, D. J. et al. Novel inhibitors of bacterial two-component systems with Gram-positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening hit closantel. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 1923-1928, 1998.

HUMEN, M. A. et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1265-1269, 2005.

HUAYNATE, R. A. R. *et al.* Métodos de colheita de fezes e balanço de minerais em suínos alimentados com dietas suplementadas ou não com probiótico. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 29, n. 4, p. 395-401, 2007.

HUAYNATE, R. A. R. **Probiótico em dietas de suínos**. 2008, 66 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal 2009**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010, v. 37, 55 p.

JACKSON, F.; MILLER, J. Alternative approaches to control - quo vadit. **Veterinary Parasitology**, v.139, p. 371-384, 2006.

KAWANO, E. L.; YAMAMURA, M. H.; RIBEIRO, E. L. A. Efeitos do tratamento com anti-helmíntico em cordeiros naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais sobre os parâmetros hematológicos. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, v. 29, p. 113-121, 2001.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 336-345, 2001.

KWA, M. S.; KOOYMAN, F. N.; BOERSEMA, J. H. Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on β -tubulin isotype 1 and isotype 2 genes. **Biochemical Biophysics Research Communication**, v. 191, p. 413-419, 1993.

LACERDA, M. J. R. et al. Nota técnica: Vias de aplicação de Closantel como anti-helmíntico gastrintestinal em ovinos. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v. 17, n. 1, p. 55-59, 2009.

LAVERMICOCCA, P. et al. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4233-4240, 2005.

LEE, G. R. et al. **Wintrobe: hematologia clínica**. 9. ed. São Paulo: Manole, 1998. vol. 1, 1424 p.

LODDI, M. M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

MACHEN, R et al. A *Haemonchus contortus* management plan for sheep and goats in Texas. **Agricultural Communications The Texas A&M University System**, v. 4, p. 98-102. 1998.

MACIEL, M. V. et al. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 98-104, 2006.

MARTEAU, P.; SALMINEN, S. A inocuidade dos probióticos. Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal – In: SEMINÁRIO DE NESTLÉ NUTRITION 42., 1998 **Anais ...**, Suíça. p. 39-40.

MARTIN, F. P. J. et al. Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: interactions of *Trichinella spiralis* infection with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 2185-2193, 2006.

MARTIN, R. J. Review: modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v. 154, p. 11-34, 1997.

MELO, A. C. F. L. **Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil.** 2005. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 100, p. 141-146, 2005.

MICHIELS, M.; MEULDERMANS, W.; HEYKANTS, J. The metabolism and fate of closantel (flukiver) in sheep and cattle. **Drug metabolism reviews**, v. 18, p. 235-251, 1987.

MOLENTO, M. B. et al. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

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

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2010. 414 p.

NETO, J. P. N. **Panorama da ovinocultura brasileira**. 2007. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1471>>. Acessado em: 20 jun. 2010.

NEUMANN, M. et al. Utilização de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) visando à produção de cordeiros Ile de France super precoces em sistema de *creep-feeding*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2285-2292, 2008.

NICIURA, S. C. M. et al. **Determinação da Eficácia Anti-Helmíntica em Rebanhos Ovinos: Metodologia de Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário**. São Carlos, 2009. 29 p. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/documentos/documento s91.pdf>> . Acesso em: 10 jan. 2011.

NOGUEIRA, D. M.; VOLTOLINI, T. V.; MOREIRA, J. N. Efeito da suplementação protéica sobre os parâmetros clínicos e parasitológicos de cordeiros mantidos em pastagem de tifton 85. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1100-1109, 2009.

OLIVEIRA, D. B. et al. Atividade anti-helmíntica da babaneira (*Musa* sp.) em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA 15., 1997, Salvador. **Anais...** Salvador: SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 1997. p. 65.

OLIVEIRA, L. L. S. **Estudo da infecção por nematóides no período periparto de ovelhas Santa Inês**. 2008. 40 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Produção de Ruminantes). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga, BA.

ONYAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, p. 203-211, 2005.

PEÑA M. T. et al. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 259-265, 2002.

PEREIRA, C. A. S. **Propriedades probióticas de *Lactobacillus plantarum* E *Lactobacillus fermentum* e antagonismo frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e enterotoxigênica (ETEC).** 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Alimento – Microbiologia do Alimento). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ.

PEREIRA, C. A. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Eimeria* spp. em *Rattus norvegicus*.** 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

PÉREZ, P. F. et al. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an in vitro study. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5037–5042, 2001.

PINHEIRO, R. S. B.; SOBRINHO, A. G. S.; YAMAMOTO, S. M. Desempenho de cordeiros lactentes recebendo probióticos em comedouros privativos. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 38-42, 2007.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445-452, 2001.

RADOSTITIS, O. M. et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RAHMAN, W. A.; COLLINS, G. H. Changes in live weight gain and blood constituents in experimental infection of goats with a goat-derived compared with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 38, p. 145-153, 1991.

RAMALHO, L. et al. Resistência do *Haemonchus contortus* e outros parasitas gastrintestinais ao levamisol, closantel e moxidectina em um rebanho no noroeste do Paraná. In: OTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CESUMAR 4., 2008, Maringá. **Anais...** Maringá: CESUMAR – CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ, 2008.

RAMOS, C. I. et al. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 473-477, 2002.

RANDAZZO, V.; COSTAMAGNA, S. R. Effect of oral administration of probiotic agents *Trichinella spiralis*-infected mice. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 55-59, 2005.

RISSI, D. R. et al. Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul: 361 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 21-28, 2010.

ROCHA, R. A. et al. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Ruminants Research**, v. 75, p. 135-143, 2008.

ROSA, J. S. Enfermidades em Caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle – Embrapa Caprinos- Brasília – SPI/ Sobral: **Embrapa** – CNPC. p. 101-105, 1996.

ROSALINSKI-MORAES, F. et al. Produção de antígeno somático de *Haemonchus contortus* adultos e seu uso em ensaio imunoenzimático indireto para detecção de imunoglobulina G ovina. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 118-125, 2008.

ROSS, G. R. et al. Effects of probiotic administration in swine. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 545-549, 2010.

ROTHWELL, J.; SANGSTER, N. C. *Haemonchus contortus*: The uptake and metabolism of closantel. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 3, p. 313-319, 1997.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prébióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANGSTER, N. C. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycin. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 189-204, 1999.

SANTOS, J. F. et al. O efeito da cultura de *Zymomonas mobilis* na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 502-504, 2004.

SCZESNY-MORAES, E. A. et al. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 229-236, 2010.

SHU, Q.; QU, F.; GILL, H. S. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. **Journal Pediatric Gastroenterological Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 171-177, 2001.

SILVA, D. G. K. C. et al. Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no Hospital de Pediatria – Hosped / UFRN da cidade de Natal-RN. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 239-242, 2005.

SILVA, M. M. et al. Efeito da verminose na resposta imune em caprinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 15–19, 2002.

SILVA, K. C. F. et al. Efeito de um simbiótico sobre o ganho de peso e número de ovos por grama de fezes de cordeiros confinados. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 953–962, 2009.

SINGER, S. M.; NASH, T. E. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. **Journal Infectious Diseases**, v. 181, p. 1510–1512, 2000.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897 p.

SRETER, T.; MOLNAR, V.; KASSAI, T. The distribution of nematode egg counts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. **International Journal for Parasitology**, v. 24, p. 103-108, 1994.

STRAIN, S. A. J.; STEAR, M. J. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 527-531, 2001.

STROMPFOVÁ, V. et al. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. **Anaerobe**, v. 12, p. 75-79, 2006.

SWAN, G. E. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v. 70, n. 2, p. 61-70, 1999.

TIERNEY, J. et al. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion by indigenous chicken *Lactobacillus* species. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 171-182, 2004.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 273 p.

UTIYAMA, C. E. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, 2006.

Van WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, p. 509-529, 2002.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, L. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 83-104, 2008.

VELOSO, C. F. M. et al. Efeitos da suplementação protéica no controle da verminose e nas características de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 131-139, 2004.

VERÍSSIMO, C. J.; CATELLI, L.; MOLENTO, M. B. Integração de ovinos e bovinos: método Famacha, pastejo contínuo e baixa densidade animal no controle parasitário. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, (supl. 1), p. 292, 2004.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrointestinais em ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 2, p. 49-56, 2008.

WOLSTENHOLME, A. J. et al. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 469-476, 2004.

YBARRA, L. M. et al. Influência de probióticos e prebióticos na absorção de minerais. 2003. In: FERREIRA, C. L. L. F. Probióticos e probióticos: atualização e prospecção. **Suprema**, 79-102 p.

ZACHARIAS, F. **Controle alternativo da infecção por *Haemonchus contortus* em ovinos: avaliação do tratamento homeopático**. 2004. 130 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) – Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Contagem de OPG nas fezes dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	2300	1300	10000	1300	-	-	-
2	2000	1800	400	1200	1200	1000	1200
3	1900	2100	1000	0	4300	2200	4400
4	800	300	1600	300	800	2000	1000
5	800	1000	900	600	1200	1100	155
6	400	0	300	1200	1200	600	2300
7	400	3700	7100	18100	-	-	-
8	300	0	100	0	0	900	200
9	300	100	0	2100	600	300	100
10	100	0	0	100	0	400	700
Grupo B							
11	2400	1700	2000	1760	1300	400	1600
12	1400	700	500	1700	1800	1300	500
13	800	400	1000	700	1500	1900	870
14	740	560	720	765	690	640	660
15	700	400	500	600	0	500	100
16	400	600	700	4900	500	400	500
17	400	500	900	0	890	500	1800
18	300	0	300	0	100	840	800
19	200	500	600	400	500	500	100
20	100	200	0	1800	600	400	700
Grupo C							
21	2900	1200	600	6900	4300	2100	2200
22	1400	500	100	13500	13100	9300	10000
23	900	0	1000	2300	2500	3000	2000
24	820	630	600	2900	4700	-	-
25	700	2200	2400	6500	13800	15400	27100
26	400	0	700	710	900	790	500
27	400	900	1500	2500	2700	4000	6000
28	300	0	1000	2200	3000	3500	100
29	200	0	0	200	400	1000	100
30	200	900	1100	2000	2100	-	-
Grupo D							
31	2900	200	1200	9100	12400	15000	24500
32	1300	0	470	1400	1500	200	1200
33	950	100	500	600	1450	2500	3500
34	600	100	400	500	2500	4080	3250
35	500	0	0	0	200	0	100
36	500	100	900	3000	12400	10000	0
37	300	100	900	1330	1800	600	1100
38	300	300	0	100	300	0	0
39	200	100	100	200	500	200	0
40	200	0	100	200	700	300	100

APÊNDICE B – Leucometria (Leucócitos/ μ L) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	7800	13300	9900	13900	-	-	-
2	11500	10700	12400	20100	15400	13500	11100
3	7700	9300	5900	10900	8100	8500	5500
4	10400	8100	9800	11300	11100	8000	9500
5	8300	6900	8400	8100	9000	6700	6600
6	3900	16000	10700	12500	15900	10300	7800
7	5800	11800	11100	12900	-	-	-
8	9300	6900	9100	12100	10400	8400	7900
9	5800	4900	5400	8600	9500	7300	7500
10	8800	8700	7700	12500	6800	4400	4200
Grupo B							
11	6122	6378	6000	9067	7900	5900	6000
12	7300	7400	9100	9700	8800	6300	5900
13	4300	5300	6200	5800	6200	5600	4000
14	5900	4900	5400	8000	6700	5600	5700
15	5900	6800	7200	8700	10100	8200	7300
16	4500	5200	6900	10100	8300	7700	5300
17	7900	7200	8600	9900	6100	7200	6300
18	7700	7200	8500	11900	9000	7900	6300
19	6100	7100	5600	8600	7600	8600	6900
20	5500	6300	6500	8900	8300	6000	6300
Grupo C							
21	7833	7878	8433	12163	11186	-	-
22	8600	9400	9400	12500	10000	8200	10800
23	6100	6500	9600	10300	7000	7600	8700
24	6500	7700	8600	9100	8200	7900	8000
25	11400	11000	10900	12700	14000	16800	17100
26	10400	11300	11100	13400	10800	12100	13800
27	6100	4400	4000	8800	10186	7600	8900
28	9000	7500	9600	14000	13600	13100	12000
29	6300	7400	7200	8500	7700	5100	7900
30	6100	5700	5500	10163	9186	-	-
Grupo D							
31	7988	7738	7500	10163	9463	7463	7213
32	9988	9738	9500	12163	11463	9463	9213
33	8300	7100	5500	6500	7200	4900	6000
34	6300	7100	7900	9400	9300	6700	6700
35	5700	9400	8800	15900	10300	8800	7200
36	11200	9600	8100	8500	12000	8700	8800
37	13500	12200	12700	14000	11700	11100	10200
38	10700	6600	8200	10000	9200	7800	7400
39	7000	8300	8100	10500	8200	6600	6300
40	9200	9600	8700	14500	15800	13100	13100

APÊNDICE C – Contagem de hemácias (nº x 10⁶/µL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	9.20	8.63	8.23	7.34	-	-	-
2	8.51	8.18	7.57	6.96	7.29	7.51	7.37
3	10.12	9.68	9.48	8.78	8.62	8.30	9.06
4	9.30	9.26	8.81	7.74	7.98	7.47	7.28
5	10.10	9.82	10.00	9.11	8.45	8.46	8.58
6	10.33	10.00	9.51	8.52	8.27	7.99	8.20
7	7.80	6.50	5.54	4.73	-	-	-
8	9.96	9.89	10.03	9.12	8.74	8.57	8.66
9	9.67	10.05	9.62	8.46	8.45	7.80	8.19
10	9.67	9.49	9.51	8.34	8.27	8.00	8.15
Grupo B							
11	9.40	9.09	8.92	8.63	8.83	8.76	8.73
12	8.92	8.45	9.15	8.65	8.81	8.70	8.87
13	8.79	8.35	8.61	8.12	8.57	8.21	8.09
14	8.18	7.73	7.38	7.09	7.90	7.99	7.80
15	10.02	9.78	9.09	9.60	9.65	9.74	9.78
16	9.63	9.44	8.99	8.65	9.14	8.53	8.78
17	9.54	9.88	9.76	8.70	8.87	8.87	8.92
18	9.94	9.95	9.38	8.67	8.67	8.76	7.86
19	10.11	9.01	8.90	9.14	8.92	9.01	9.24
20	9.51	9.26	8.99	9.05	8.91	9.02	9.25
Grupo C							
21	9.04	8.81	9.28	8.84	8.56	-	-
22	9.97	10.08	10.33	9.48	8.71	8.03	8.00
23	8.33	7.86	7.78	6.99	6.87	6.23	7.00
24	9.84	9.89	9.76	9.18	8.78	8.41	8.43
25	8.58	7.78	8.32	7.99	7.39	5.52	5.27
26	9.55	9.16	9.38	8.85	8.43	8.60	8.49
27	9.31	9.26	9.10	9.17	8.54	8.95	9.01
28	7.98	8.79	9.88	10.22	10.72	9.15	9.18
29	9.27	9.01	9.36	8.68	8.74	7.82	8.30
30	8.50	7.44	9.20	8.80	8.50	-	-
Grupo D							
31	8.73	8.68	8.70	8.03	8.25	7.43	7.61
32	10.73	10.68	10.70	10.03	10.25	9.43	9.61
33	8.50	8.79	8.58	7.68	7.69	7.07	6.66
34	10.08	9.86	10.06	8.98	9.49	8.89	8.46
35	9.74	9.16	9.14	8.39	8.31	7.82	7.67
36	10.25	10.39	10.01	9.80	10.02	9.13	9.83
37	9.01	9.18	9.81	8.70	9.06	8.05	8.98
38	10.36	10.00	9.74	10.01	10.18	9.06	9.57
39	9.60	9.81	9.51	8.93	9.54	8.79	8.69
40	10.33	10.25	10.78	9.71	9.67	8.65	9.05

APÊNDICE D – Concentração de hemoglobina (g/dL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	9.8	8.8	8.2	6.2	-	-	-
2	8.7	8.1	7.2	6.2	6.5	7.1	7.0
3	10.3	9.8	9.5	8.6	8.8	8.2	9.0
4	10.1	10.0	9.2	7.5	7.7	7.0	7.1
5	11.5	11.0	11.3	9.9	8.5	8.7	8.5
6	11.9	11.3	10.4	8.8	8.2	8.0	8.7
7	7.5	5.4	3.9	2.7	-	-	-
8	11.2	11.0	11.3	9.9	9.0	8.9	8.7
9	10.7	11.3	10.5	8.7	8.5	7.6	8.1
10	10.7	10.4	10.4	8.6	8.2	7.9	8.0
Grupo B							
11	10.2	9.6	9.3	8.9	9.0	9.2	8.9
12	9.4	8.6	9.7	9.0	9.0	9.4	9.2
13	9.2	8.4	8.8	8.1	8.5	8.0	7.9
14	8.2	7.4	6.8	6.4	7.5	7.9	7.5
15	11.3	10.8	9.7	10.7	10.5	10.3	10.9
16	10.6	10.3	9.4	9.0	9.5	8.8	9.1
17	10.6	11.1	11.0	9.1	9.1	9.5	9.3
18	10.3	10.1	9.1	8.2	8.7	9.2	6.8
19	11.4	9.6	9.3	9.8	9.1	9.6	9.9
20	10.4	10.0	9.5	9.8	9.2	9.7	9.9
Grupo C							
21	9.5	8.7	9.7	9.2	8.4	-	-
22	11.2	10.2	10.8	9.5	8.9	8.0	7.8
23	8.3	7.6	7.5	6.2	5.9	5.0	6.1
24	9.8	9.9	9.8	8.9	8.9	8.7	8.5
25	8.8	7.4	8.3	7.9	6.7	4.0	3.7
26	10.4	9.8	10.1	9.4	8.4	8.9	8.6
27	10.2	8.8	8.5	9.9	8.4	9.5	9.5
28	7.8	9.2	10.6	11.0	11.3	10.0	9.8
29	10.1	9.6	10.2	9.1	8.8	7.6	8.6
30	8.6	6.2	9.3	8.8	8.4	-	-
Grupo D							
31	9.7	9.6	9.4	8.6	8.6	7.7	7.8
32	11.7	11.6	11.4	10.6	10.6	9.7	9.8
33	7.9	8.3	7.9	6.6	6.3	5.5	5.2
34	11.4	11.0	11.3	9.6	10.1	9.4	9.3
35	10.8	9.8	9.8	8.6	8.1	7.6	6.8
36	11.7	11.9	11.2	11.0	11.0	9.8	9.9
37	9.5	9.8	9.8	9.1	9.4	9.6	10.1
38	12.0	11.3	10.8	11.4	11.3	9.5	9.6
39	10.6	10.9	10.4	9.5	10.2	9.3	9.4
40	11.9	11.7	12.6	10.9	10.5	9.1	10.0

APÊNDICE E – Percentual de hematócrito (%) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	30.3	27.0	24.7	18.1	-	-	-
2	26.0	24.1	21.2	17.8	18.8	20.9	20.5
3	32.7	30.3	29.1	26.0	26.7	24.7	27.4
4	31.7	31.2	28.1	22.3	22.9	20.5	20.9
5	34.9	34.0	35.3	30.5	25.7	26.4	25.7
6	36.0	33.5	32.2	26.7	24.7	24.0	26.4
7	22.0	16.8	12.5	8.5	-	-	-
8	37.0	33.7	35.3	30.5	27.4	27.1	26.4
9	34.6	33.5	32.5	26.4	25.7	22.6	24.5
10	34.6	33.1	32.2	26.0	24.7	23.6	24.0
Grupo B							
11	32.2	29.6	28.3	27.1	27.4	27.9	27.2
12	28.3	25.8	29.8	27.4	27.4	28.8	28.1
13	27.4	25.9	26.7	24.3	25.7	24.0	23.6
14	25.6	22.4	19.9	18.5	22.3	23.6	22.3
15	35.5	33.1	29.8	33.2	32.5	31.9	33.9
16	34.1	32.7	28.8	27.4	29.1	26.7	27.7
17	33.9	34.0	34.3	27.7	27.7	29.1	28.4
18	32.7	31.7	27.7	24.7	26.4	28.1	19.9
19	34.9	29.3	28.4	30.1	27.7	29.5	30.5
20	37.9	31.2	29.1	30.1	28.1	29.8	30.5
Grupo C							
21	29.2	26.3	29.0	27.3	25.4	-	-
22	35.0	31.2	33.6	29.1	27.1	24.0	23.3
23	25.1	20.7	22.3	17.8	16.8	14.8	17.5
24	30.3	30.7	30.1	27.1	27.1	26.4	25.7
25	25.5	21.9	25.0	23.6	19.5	12.3	9.5
26	33.1	30.3	31.2	28.8	25.3	27.1	26.0
27	32.2	26.5	25.7	30.5	25.4	29.1	29.1
28	23.0	27.4	32.9	34.3	35.3	30.8	30.1
29	31.7	29.3	31.5	27.7	26.7	22.6	26.0
30	27.0	19.0	28.4	26.7	25.4	-	-
Grupo D							
31	31.3	31.4	31.4	28.4	25.5	25.4	25.8
32	33.3	33.4	33.4	30.4	30.5	27.4	27.8
33	21.1	25.1	23.6	19.2	18.1	15.4	15.4
34	34.9	33.0	35.3	29.5	31.2	28.8	28.4
35	33.1	30.3	30.1	26.0	24.3	22.6	19.9
36	35.4	36.5	34.9	34.3	34.3	30.1	30.5
37	28.8	30.3	30.1	27.7	28.8	29.5	31.2
38	36.8	35.5	33.6	35.6	35.3	29.1	29.5
39	32.1	33.5	32.2	29.1	31.5	28.4	28.8
40	36.3	35.4	39.7	33.9	32.5	27.7	30.8

APÊNDICE F – Concentração de proteínas totais séricas (g/dL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	6.5	7.1	6.2	6.8	-	-	-
2	7.0	7.0	6.4	7.0	5.3	5.8	5.9
3	7.7	8.2	7.4	8.1	7.6	6.1	7.1
4	7.5	8.3	7.7	7.7	6.4	7.1	7.7
5	7.6	7.9	7.3	6.5	4.3	6.0	6.7
6	8.1	7.9	6.7	7.0	6.7	6.2	6.2
7	8.0	7.3	6.8	5.7	-	-	-
8	7.5	8.0	7.7	7.4	5.6	6.5	6.7
9	7.1	5.9	6.6	5.5	5.5	5.8	5.6
10	7.0	7.7	6.8	7.2	7.6	6.1	6.2
Grupo B							
11	7.5	7.8	7.0	7.0	7.1	6.0	6.5
12	7.4	7.7	7.1	6.3	7.9	6.5	6.9
13	7.1	7.2	6.5	6.9	6.9	4.6	4.7
14	8.1	8.2	7.6	8.3	8.0	6.7	6.8
15	8.1	7.8	7.1	6.1	7.3	6.0	8.0
16	6.5	7.0	6.3	7.3	6.8	5.9	5.5
17	5.9	6.4	5.9	6.2	6.6	5.6	7.1
18	8.8	8.9	7.6	7.1	7.6	6.6	8.3
19	7.2	7.3	6.6	7.1	6.9	6.5	6.8
20	7.3	8.7	7.6	7.5	7.4	7.5	5.5
Grupo C							
21	7.0	7.5	7.6	7.5	6.8	-	-
22	6.6	7.2	6.6	7.6	6.0	4.5	5.4
23	6.9	8.2	8.2	7.8	4.3	6.1	7.2
24	9.0	8.5	8.6	7.2	6.0	7.2	7.2
25	6.5	6.7	6.0	7.6	6.3	4.1	5.0
26	6.3	6.4	6.0	6.9	6.2	5.8	6.2
27	7.2	7.2	7.2	7.5	8.0	7.4	5.4
28	8.1	8.6	7.7	7.2	6.8	6.3	7.3
29	7.7	7.5	7.2	7.4	7.4	6.0	7.2
30	6.0	6.3	6.8	7.3	6.0	-	-
Grupo D							
31	7.6	8.0	7.5	7.9	7.2	6.8	7.0
32	7.2	8.0	7.1	7.2	6.9	6.3	6.8
33	8.0	8.6	7.7	6.8	7.6	6.9	6.3
34	7.6	8.3	7.5	8.1	7.6	5.7	7.0
35	7.2	8.7	8.3	8.7	6.5	7.9	8.6
36	6.9	7.0	6.9	7.1	7.3	7.0	7.0
37	7.3	7.3	6.9	7.1	7.8	5.7	5.0
38	7.8	7.6	7.2	7.8	6.5	5.6	7.1
39	6.9	8.4	6.3	7.1	6.7	6.5	6.9
40	7.7	8.6	7.7	7.8	6.1	6.6	7.0

APÊNDICE G – Concentração de albumina sérica (g/dL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	3.5	3.5	3.4	3.2	-	-	-
2	3.3	3.2	3.3	2.9	2.5	2.5	2.2
3	3.4	3.3	3.6	3.4	3.3	2.8	3.1
4	3.4	3.0	2.8	2.7	2.5	2.4	2.6
5	3.6	3.6	4.1	3.8	2.2	3.3	3.2
6	3.6	3.5	3.7	3.9	3.4	3.1	2.8
7	3.5	3.3	3.3	3.1	-	-	-
8	3.5	3.3	3.6	3.6	2.4	3.0	2.8
9	3.4	3.0	3.5	3.3	3.0	2.4	2.4
10	3.4	3.2	3.5	3.5	3.3	2.9	3.0
Grupo B							
11	3.5	3.5	3.3	3.5	3.1	3.0	2.6
12	3.5	3.1	3.5	3.6	3.4	2.9	2.9
13	3.3	3.1	3.0	3.2	2.9	1.9	1.8
14	3.2	3.1	3.3	3.3	3.2	2.5	2.5
15	3.5	3.5	3.5	3.6	3.4	2.6	3.0
16	3.7	3.6	3.8	3.9	3.3	2.6	2.2
17	3.3	3.3	3.5	3.3	3.2	2.5	2.7
18	3.1	3.3	3.1	3.3	2.8	3.1	3.7
19	3.3	3.1	3.3	3.4	3.2	2.9	2.9
20	3.4	3.2	3.6	3.8	3.5	3.2	2.2
Grupo C							
21	3.0	3.2	3.5	3.4	3.0	-	-
22	3.5	3.3	3.9	3.6	3.1	2.2	2.5
23	2.6	2.9	3.0	2.9	2.5	2.1	2.3
24	3.3	3.1	3.3	2.7	2.2	2.5	2.9
25	3.2	2.7	3.3	3.1	2.9	1.7	2.0
26	3.2	3.2	3.5	3.2	2.7	2.3	2.9
27	2.7	2.7	2.8	3.5	3.2	3.0	2.5
28	3.7	4.0	4.2	4.0	3.5	3.0	3.0
29	3.1	3.4	3.3	3.3	2.8	2.6	3.0
30	2.2	2.5	3.3	3.2	2.8	-	-
Grupo D							
31	3.3	3.5	3.6	3.8	3.1	2.8	2.7
32	3.0	3.3	3.4	3.4	2.7	2.4	2.5
33	2.7	3.0	3.0	2.9	2.7	2.1	2.1
34	3.4	3.8	3.7	3.7	3.4	2.5	3.1
35	3.2	3.5	3.9	3.7	2.5	3.2	3.2
36	3.4	3.4	3.8	3.7	3.5	2.0	1.9
37	3.0	3.2	3.4	3.6	3.4	2.8	2.1
38	3.2	3.3	3.4	3.7	2.7	2.6	3.4
39	3.3	3.3	3.2	3.4	2.3	2.9	2.1
40	3.2	3.3	3.7	3.7	2.4	2.8	3.0

APÊNDICE H – Concentração de globulina sérica (g/dL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	3.0	3.6	2.8	3.6	-	-	-
2	3.7	3.8	3.1	4.1	2.8	3.3	3.7
3	4.3	4.9	3.8	4.7	4.3	3.3	4.0
4	4.1	5.3	4.9	5.0	3.9	4.7	5.1
5	4.0	4.3	3.2	2.7	2.1	2.7	3.5
6	4.5	4.4	3.0	3.1	3.3	3.1	3.4
7	4.5	4.0	3.5	2.6	-	-	-
8	4.0	4.7	4.1	3.8	3.2	3.5	3.9
9	3.7	2.9	3.1	2.2	2.5	3.4	3.2
10	3.6	4.5	3.3	3.7	4.3	3.2	3.2
Grupo B							
11	4.0	4.3	3.7	3.5	4.0	3.0	3.9
12	3.9	4.6	3.6	2.7	4.5	3.6	4.0
13	3.8	4.1	3.5	3.7	4.0	2.7	2.9
14	4.9	5.1	4.3	5.0	4.8	4.2	4.3
15	4.6	4.3	3.6	2.5	3.9	3.4	5.0
16	2.8	3.4	2.5	3.4	3.5	3.3	3.3
17	2.6	3.1	2.4	2.9	3.4	3.1	4.4
18	5.7	5.6	4.5	3.8	4.8	3.5	4.6
19	3.9	4.2	3.3	3.7	3.7	3.6	3.9
20	3.9	5.5	4.0	3.7	3.9	4.3	3.3
Grupo C							
21	4.0	4.3	4.1	4.1	3.8	-	-
22	3.1	3.9	2.7	4.0	2.9	2.3	2.9
23	4.3	5.3	5.2	4.9	1.8	4.0	4.9
24	5.7	5.4	5.3	4.5	3.8	4.7	4.3
25	3.3	4.0	2.7	4.5	3.4	2.4	3.0
26	3.1	3.2	2.5	3.7	3.5	3.5	3.3
27	4.5	4.5	4.4	4.0	4.8	4.4	2.9
28	4.4	4.6	3.5	3.2	3.3	3.3	4.3
29	4.6	4.1	3.9	4.1	4.6	3.4	4.2
30	3.8	3.8	3.5	4.1	3.2	-	-
Grupo D							
31	4.3	4.5	3.9	4.1	4.1	4.0	4.3
32	4.2	4.7	3.7	3.8	4.2	3.9	4.3
33	5.3	5.6	4.7	3.9	4.9	4.8	4.2
34	4.2	4.5	3.8	4.4	4.2	3.2	3.9
35	4.0	5.2	4.4	5.0	4.0	4.7	5.4
36	3.5	3.6	3.1	3.4	3.8	5.0	5.1
37	4.3	4.1	3.5	3.5	4.4	2.9	2.9
38	4.6	4.3	3.8	4.1	3.8	3.0	3.7
39	3.6	5.1	3.1	3.7	4.4	3.6	4.8
40	4.5	5.3	4.0	4.1	3.7	3.8	4.0

APÊNDICE I – Concentração de ferro sérico (µg/dL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Animais	Tempo de experimento						
	0	15	30	45	60	75	90
Grupo A							
1	124	112	99	54	-	-	-
2	120	179	124	61	84	118	68
3	152	143	168	162	124	111	99
4	76	110	118	103	105	84	72
5	177	193	193	184	126	139	133
6	112	117	151	130	56	80	88
7	108	22	24	21	-	-	-
8	125	119	153	164	151	96	95
9	92	61	86	164	101	139	106
10	141	120	164	153	110	106	118
Grupo B							
11	120	145	175	154	130	135	140
12	147	174	206	206	176	137	159
13	65	71	100	82	89	64	59
14	144	158	167	164	107	137	101
15	92	140	170	176	200	166	207
16	124	146	148	97	92	119	144
17	138	147	143	174	155	157	180
18	107	138	208	159	70	111	70
19	124	126	251	198	207	187	202
20	133	186	172	143	122	110	99
Grupo C							
21	120	115	199	201	177	-	-
22	94	116	167	153	118	83	62
23	60	86	104	64	67	64	39
24	122	95	125	135	116	113	80
25	70	47	45	110	125	73	51
26	143	135	173	241	209	175	164
27	122	114	240	158	132	116	62
28	245	178	206	231	160	118	154
29	124	175	201	195	167	124	125
30	61	73	118	121	97	-	-
Grupo D							
31	130	125	160	160	151	125	120
32	110	105	140	150	132	120	115
33	70	85	169	107	186	156	111
34	101	120	146	183	189	118	156
35	158	101	133	58	97	106	133
36	93	129	173	196	150	111	79
37	159	106	156	276	146	117	85
38	148	152	110	167	139	143	166
39	154	95	142	168	116	126	92
40	86	113	160	103	94	103	113