

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA CENA/USP

ALESSANDRO PELEGRINE MINHO

**Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos
gastrintestinais em ovinos**

Piracicaba

2006

ALESSANDRO PELEGRINE MINHO

**Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos
gastrintestinais em ovinos**

Tese apresentada à Comissão de Pós-graduação do
Centro de Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2006

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.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Minho, Alessandro Pelegrine

Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos
gastrointestinais em ovinos / Alessandro Pelegrine Minho; orientador
Adibe Luiz Abdalla. - - Piracicaba, 2006.

168 p. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências.
Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) –
Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Compostos fenólicos 2. Controle parasitário alternativo 3. Cordeiros
4. Helmintologia veterinária 5. Técnicas de diagnóstico animal I. Título

CDU 636.3:616.34-008.89

DEDICATÓRIA

À minha família:

Pais, irmãs, noiva e sobrinhos
que muito me apoiaram em todos os
momentos e que apesar da distância sempre
estiveram presentes no decorrer deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**, pela oportunidade de desenvolvimento dos estudos.

À **FAPESP** pelo financiamento deste trabalho e concessão da bolsa de estudo.

Ao **Dr. Adibe Luiz Abdalla**, pela amizade, orientação, confiança e incentivo na atividade científica.

À **Dr^a. Dorinha M.S.S. Vitty Kennedy**, pela orientação e incentivo, mas principalmente pela amizade fraterna.

À **Dr^a. Solange Maria Gennari**, pela paciência e perseverança ao transmitir sua sabedoria para a realização desse trabalho.

Ao **Dr. Ives Cláudio S. Bueno** pelo auxílio nas análises estatísticas e conhecimentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Frank Jackson** pelo apoio técnico e pessoal, fornecimento de materiais e por colocar seu laboratório à disposição para realização dos experimentos *in vitro*, assim como pelas correções e incentivos.

Ao **Dr. Alessandro F. T. Amarante**, pelas correções, esclarecimentos e confiança. Dedicando-nos além do saber sua amizade e confiança.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal LANA-CENA-USP: **Sr^a. Maria Regina S. R. Peçanha**, **Sr. Lécio Aparecido Castilho** e **Sr. Joaquim Everaldo M. dos Santos**, pelos esclarecimentos, paciência e amizade.

À secretária **Silvana Pouso Maziero** pela paciência e eficiência dispensadas sempre que requisitados.

Aos amigos da pós-graduação, **Patrícia B. de Godoy**, **Sérgio Lúcio S. Cabral Filho**, **Eduardo F. Nozella**, **Ana Paula Roque**, **Raquel S. Dias**, **Antônio S. Baptista**, **Alcester Mendes**, **Sarita Gobbo**, **Cibele Longo**, pela companhia, amizade e carinho.

Aos animais que doaram suas vidas no auxílio da ciência para melhoria da qualidade de vida animal e humana.

A todos que de alguma forma auxiliaram neste trabalho, minha enorme gratidão.

... "Não há nada como o sonho para criar o futuro. Utopia hoje, carne e osso amanhã".

Victor Hugo

Mas não apenas sonhe, trabalhe;

"Um grama de ação vale mais do que uma tonelada de teoria".

Friedrich Engels

Portanto, faça sua parte;

"Melhor é acender uma vela do que amaldiçoar a escuridão".

Provérbio chinês

Pois;

Quando você quer alguma coisa, todo o Universo conspira para que você realize o seu desejo...

RESUMO

MINHO, A. P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos.** 2006. 168 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

As helmintoses gastrintestinais estão entre as principais enfermidades na criação de ovinos, sendo importante causa de mortalidade e de redução na produtividade dos animais. O controle das infecções por nematódeos é baseado no uso de drogas anti-helmínticas, porém com a descrição emergente de parasitos resistentes, a eficácia deste tratamento tem diminuído. Portanto, métodos alternativos de controle são necessários para a diminuição ou, até mesmo, a substituição do uso de drogas para o controle das verminoses em pequenos ruminantes. O uso dos taninos condensados (TC) no controle das helmintoses gastrintestinais de ovinos em todo o mundo tem se mostrado promissor. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-helmíntico dos TC sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. Durante o período de testes foram realizados quatro ensaios experimentais: **ensaio A** - avaliação *in vitro* da ingestão por larvas de primeiro estágio (L1) de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Teladorsagia circumcincta*, para avaliar o efeito anti-helmíntico dos TC provenientes do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*); **ensaio B** – estudo sobre a infecção natural dos cordeiros a campo, animais infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis*, sendo os mesmos divididos em dois grupos (tratados com extrato de acácia e não tratados); **ensaios C e D** - realizados

com infecção experimental dos animais por nematódeos gastrintestinais (*H. contortus* e *T. colubriformis*, respectivamente). Nos dois últimos ensaios, os animais foram divididos em cinco grupos, sendo: GI (controle infectado com nematódeo); GII (recebeu sorgo taninífero); GIII (recebeu extrato de acácia uma vez ao dia); GIV (recebeu extrato de acácia duas vezes ao dia) e GV (controle não infectado). Os resultados dos ensaios A (ingestão larval) e B (infecção natural) foram promissores e demonstraram o efeito direto dos TC sobre os nematódeos parasitas de ovinos, com diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos. Observando-se os resultados do experimento com infecção experimental por *H. contortus* (ensaio C), não se detectou diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$), porém no experimento com infecção por *T. colubriformis* (ensaio D) foi evidenciada diferença ($P < 0,01$) nos valores de OPG entre os grupos tratados com sorgo (GI) e extrato de acácia por dois dias (GIV), quando comparados ao controle infectado (GI); sendo também evidenciada quando da comparação do número de fêmeas de helmintos do GI e GIV ($P < 0,01$). Redução na viabilidade dos ovos de helmintos (estágio de ovo até L1) e no número de larvas infectantes isoladas de coproculturas provenientes dos grupos tratados com TC foram evidentes nos ensaios C e D. Os resultados foram promissores demonstrando a ação direta dos TC sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos e principalmente sobre a produção de larvas infectantes; porém mais estudos são necessários para a indicação de um controle de parasitos gastrintestinais baseado no uso de fontes de TC.

Palavras-chave: Helminoses; Controle alternativo; Cordeiros; Taninos; *In vivo*; *In vitro*.

ABSTRACT

MINHO, A. P. **Anthelmintic effect of condensed tannins on gastrointestinal nematodes in sheep.** 2006. 168 f. Thesis (Doctoral) – Centre for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, 2006.

Gastrointestinal nematodes are a major cause of economic loss in farm animals. Gastrointestinal parasite control programs based on chemotherapy are failing because of increased anthelmintic resistance; thus, alternative controls strategies are necessary to reduce the use of anthelmintic drug in animal production have been studied. Condensed tannins (CT) have shown potential for alternative control of gastrointestinal nematodes in sheep. The main objective of the present study was to investigate the anthelmintic effect of condensed tannin on sheep gastrointestinal nematodes. During the experimental period four experiments were carried out: **Experiment A** - *in vitro* study of larval feed inhibition (first stage larvae-L1) of *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta*, to evaluate the anthelmintic effect of CT from acacia (*Acacia mearnsii*) condensed tannins extract (CTE); **Experiment B** – study of the potential uses of CTE to control gastrointestinal parasites in sheep naturally infected with *H. contortus* e *T. colubriformis*, with animals divided into two groups (drenched and undrenched with CTE); **Experiments C and D** – were carried out with sheep experimentally infected with gastrointestinal nematodes (*H. contortus* e *T. colubriformis*, respectively). In these experiments (C and D) the animals were divided into five groups GI (nematodes infect control);

GII (supplemented with tanniferous sorghum); GIII (drenched with CTE once); GIV (drenched with CTE for two days) and GV (non-infect control). The results of experiment A (larval feed inhibition) and B (natural nematode infection) were promissory and showed the direct effect of CT on sheep gastrointestinal nematodes with significant difference ($P < 0.05$) between groups. The results of *H. contortus* experimental infections (experiment C) did not provide significant difference between groups ($P > 0.05$), however the *T. colubriformis* experimental infection results (experiment D) showed significant difference ($P < 0.01$) on EPG values of sheep supplemented with sorghum (GI) and drenched with CTE for two days (GIV), when compared with infect control (GI); Significant reduction of female worm burden was demonstrated between GI and GIV ($P < 0.01$) on experiment D. Reduction on nematode egg viability (from eggs to L1) and infective larvae (L3) from coprocultures made with faeces from CT treated groups were observed in experiments C and D. The results evidenced the direct action of CT on sheep gastrointestinal nematodes and mainly on L3 production; however more studies are necessary to indicate a strategic alternative parasite control based in CT sources.

Key words: Helminthiasis; Alternative control; Lamb; Tannins; *In vivo*; *In vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 5.1-** Variação da contagem de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG) em ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico e grupo tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV). O símbolo (☛) indica os dias de tratamento 83
- Figura 5.2-** Carga parasitária identificada no abomaso e intestino delgado de ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico e grupo tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV)..... 84
- Figura 5.3-** Valores de volume globular e hemoglobina de ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, divididos em grupo controle (não recebeu anti-helmíntico) e tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV). O símbolo (☛) indica os dias de tratamento 86
- Figura 6.1-** Peso médio dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia 0..... 108
- Figura 6.2-** Peso médio ao abate dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e das respectivas carcaças quente (C. quente) e fria (C. fria). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3

de *H. contortus* e abatidos 36 dias após a infecção 109

Figura 6.3- Valores médios do volume globular de cada grupo (4 animais grupo⁻¹), durante o período experimental. Grupos: controle infectado (Controle), tratado com sorgo (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero 110

Figura 6.4- Valores médios de hemoglobina (g dl⁻¹) dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero..... 111

Figura 6.5- Número médio de OPG dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle); do grupo tratado com sorgo taninífero (Sorgo) do 28º ao 34º dia pós-infecção (DPI); do grupo tratado uma vez (1X) ou do tratado duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC), respectivamente, no 28º e no 28º e 29º DPI. Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero..... 112

Figura 7.1- Peso médio dos cordeiros, durante o período experimental, do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero e abatidos 36 dias após a infecção 137

- Figura 7.2-** Peso médio ao abate dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e das respectivas carcaças quente (C. quente) e fria (C. fria). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero e abatidos 36 dias após a infecção 138
- Figura 7.3-** Valores médios do volume globular de cada grupo (4 animais grupo⁻¹), durante o período experimental. Grupos: controle infectado (Controle), tratado com sorgo (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero 139
- Figura 7.4-** Valores médios de hemoglobina (g dL⁻¹) dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero 140
- Figura 7.5-** Número médio de OPG dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle); do grupo tratado com sorgo (Sorgo) do 28° ao 34° dia pós-infecção (DPI); do grupo tratado uma vez (1X) ou do tratado duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC), respectivamente, no 28° e no 28° e 29° DPI. Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero 141

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1-** Porcentagem de larvas de primeiro estágio de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus vitrinus* e *Teladorsagia circumcincta* que ingeriram as bactérias marcadas com isotiocianato de fluoresceína na presença de extrato de acácia (TAC) ou TAC + polietilenoglicol (PEG).....66
- Tabela 5.1-** Porcentagem de helmintos identificada em coproculturas durante o período experimental com ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais e mantidos a campo durante 60 dias, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico (piquetes 1 e 3) e tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV), (piquetes 2 e 4).....82
- Tabela 5.2-** Carga parasitária dos ovinos traçadores (n = 8) alocados em piquetes previamente utilizados por ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, durante 60 dias, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico (piquetes 1 e 2) e grupo tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV).....87
- Tabela 6.1-** Delineamento experimental do ensaio realizado com 20 ovinos da raça Santa Inês. Cordeiros divididos em cinco grupos de quatro animais: controle infectado (Controle infect), tratado com sorgo taninífero (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e grupo controle não infectado (Não infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* 101

Tabela 6.2- Carga parasitária de *Haemonchus contortus* identificada no abomaso dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero..... 113

Tabela 6.3- Número de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* por grama de fezes recuperadas de coproculturas realizadas com *pool* (25 g). Amostras dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus*..... 114

Tabela 6.4- Viabilidade (%) dos ovos de *Haemonchus contortus* recuperados de *pool* de fezes dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus*. Ovinos mantidos em gaiolas metabólicas (2 animais grupo⁻¹)..... 114

Tabela 6.5- Quantidade de dieta ingerida (concentrado e feno) e quantidade de fezes produzidas por cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de

H. contortus no dia zero. Ovinos mantidos em gaiolas metabólicas (2 animais grupo⁻¹), durante a última semana do experimento..... 115

Tabela 7.1- Delineamento experimental do ensaio realizado com 20 ovinos da raça Santa Inês. Cordeiros divididos em cinco grupos de quatro animais: controle infectado (Controle infect), tratado com sorgo taninífero (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* 131

Tabela 7.2- Carga parasitária média de *Trichostrongylus colubriformis* no intestino delgado dos cordeiros do grupo controle infectado, do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram sacrificados 36 dias após infecção artificial com 6000 L3 de *T. colubriformis*..... 142

Tabela 7.3- Número de larvas infectantes (L3) de *Trichostrongylus colubriformis* por grama de fezes recuperadas de coproculturas. Amostras dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* 143

Tabela 7.4- Viabilidade (%) dos ovos de *Trichostrongylus colubriformis* recuperados de *pool* de fezes dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes

(2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* 143

Tabela 7.5- Quantidade média diária de dieta ingerida (concentrado e feno) e quantidade de fezes produzidas, durante a última semana do experimento, por cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis*. Ovinos mantidos em gaiolas metabólicas (2 animais grupo⁻¹) 144

LISTA DE SIGLAS

AB	abomaso
DL	desenvolvimento larval
DL ₅₀	dose letal suficiente para matar metade da população
DO	desenvolvimento dos ovos de nematódeos
DPI	dias pós-infecção
EQ	extrato de quebracho
EP	erro padrão da média
ET	extrato de tanino
ETA	extrato de acácia
FITC	isotiocianato de fluoresceína
ID	intestino delgado
IIL	inibição da ingestão pelas L1
IML	inibição da migração larval
L1	larva de primeiro estágio
L3	larva de terceiro estágio (infectante)
LPG	larvas por grama de fezes

MS	matéria seca
MRD	multirresistência às drogas
NaCl	cloreto de sódio
NRC	National Research Council
OPG	ovos por grama de fezes
PB	proteína bruta
PEG	polietilenoglicol
P-gp	glicoproteína "P"
PV	peso vivo
SAS	Statistical Software
TAC	tanino altamente concentrado
TC	taninos condensados
USP	Universidade de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VG	volume globular

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
g	gramas
h	hora
mL	mililitro
μL	microlitro
kg	kilograma
EQ kg ⁻¹	extrato de quebracho por quilo
μg mL ⁻¹	micrograma por mililitro
mg mL ⁻¹	miligrama por mililitro
mg kg ⁻¹	miligrama por quilo
g kg ⁻¹	grama por quilo
g d ⁻¹	gramas por dia
g dL ⁻¹	grama por decilitro
%	porcentagem
dia ⁻¹	por dia
p.i.	pós-infecção

n	número
animal ⁻¹	por animal
pH	potencial hidrogênioônico
xg	gravidade
µm	micrômetro
L3 g ⁻¹	larvas infectantes por grama
tratamento ⁻¹	por tratamento
grupo ⁻¹	por grupo

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	35
2. REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1. <i>OBJETIVO GERAL</i>	48
2.1.1. Objetivos específicos	48
<i>REFERÊNCIAS</i>	49
3. PROJETOS-PILOTO REALIZADOS	55
<i>REFERENCIAS</i>	57
4. EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DE ACÁCIA (<i>Acacia mearnsii</i>) SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS PARASITOS DE OVINOS	59
<i>RESUMO</i>	59
<i>ABSTRACT</i>	61
4.1. <i>INTRODUÇÃO</i>	62

4.2. MATERIAL E MÉTODOS	63
4.2.1. Fonte de taninos condensados.....	63
4.2.2. Larvas de primeiro estágio.....	64
4.2.3. Inibição da ingestão de bactérias marcadas por larvas de primeiro estágio	64
4.2.4. Delineamento experimental.....	65
4.2.5. Análise estatística	65
4.3. RESULTADOS	65
4.4. DISCUSSÃO	67
4.5. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	69
5. USO DO EXTRATO DE ACÁCIA (<i>Acacia mearnsii</i>) NO CONTROLE DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS EM OVINOS.....	73
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	75
5.1. INTRODUÇÃO.....	77

<i>5.2. MATERIAL E MÉTODOS</i>	78
5.2.1. Delineamento experimental	78
5.2.2. Técnicas parasitológicas	79
5.2.3. Peso e parâmetros hematimétricos	80
5.2.4. Fonte de taninos condensados	80
5.2.5. Análise estatística	81
<i>5.3. RESULTADOS</i>	81
5.3.1. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)	81
5.3.2. Carga parasitária	82
5.3.3. Peso corporal, ganho de peso e parâmetros hematimétricos.....	84
5.3.4. Animais traçadores	85
<i>5.4. DISCUSSÃO</i>	87
<i>5.5. CONCLUSÕES</i>	91
<i>REFERÊNCIAS</i>	91

6. EFEITO DIRETO DOS TANINOS CONDENSADOS SOBRE	
Haemonchus contortus EM OVINOS EXPERIMENTALMENTE	
INFECTADOS	95
<i>RESUMO</i>	95
<i>ABSTRACT</i>	97
6.1. INTRODUÇÃO	99
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	100
6.2.1. Delineamento experimental	100
6.2.2. Fontes de taninos condensados	102
6.2.3. Animais	102
6.2.4. Larvas infectantes	103
6.2.5. Dieta experimental	103
6.2.6. Técnicas parasitológicas	104
6.2.7. Peso e parâmetros hematimétricos	106
6.2.8. Análise estatística	106
6.3. RESULTADOS	107
6.3.1. Peso vivo e peso de carcaça	107
6.3.2. Volume globular e hemoglobina	107

6.3.3. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)	109
6.3.4. Carga parasitária	110
6.3.5. Número de L3 e viabilidade dos ovos de helmintos	111
6.3.6. Consumo voluntário	112
6.4. <i>DISCUSSÃO</i>	115
6.5. <i>CONCLUSÕES</i>	120
<i>REFERÊNCIAS</i>	121

7. EFEITO DIRETO DOS TANINOS CONDENSADOS SOBRE	
Trichostrongylus colubriformis EM OVINOS	
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS	125
<i>RESUMO</i>	125
<i>ABSTRACT</i>	127
7.1. <i>INTRODUÇÃO</i>	129
7.2. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	130
7.2.1. Delineamento experimental	130
7.2.2. Fontes de taninos condensados	132
7.2.3. Animais	132

7.2.4. Larvas infectantes	132
7.2.5. Dieta experimental.....	133
7.2.6. Técnicas parasitológicas.....	133
7.2.7. Peso e parâmetros hematimétricos	135
7.2.8. Análise estatística	136
7.3. RESULTADOS	136
7.3.1. Peso vivo e peso de carcaça.....	136
7.3.2 Volume globular e hemoglobina	137
7.3.3. Contagem de ovos por grama de fezes	138
7.3.4. Carga parasitária.....	140
7.3.5. Número de L3 e viabilidade dos ovos de helmintos.....	141
7.3.6. Consumo voluntário	142
7.4. DISCUSSÃO	144
7.5. CONCLUSÕES.....	152
REFERÊNCIAS.....	153
8. CONCLUSÕES GERAIS	157

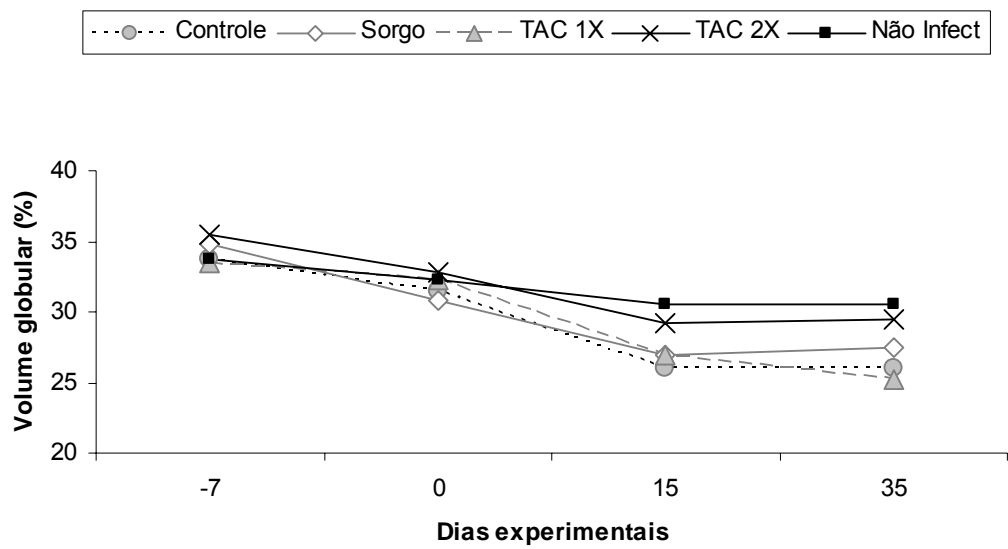
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 159

MINHO, A. P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos.** 2006. 168 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
42	07	fenótipo	genótipo
44	01	flora	microbiota
57	07	mg	g
81	12	Tabela 4.1	Tabela 5.1
84	05	dia 58	dia 60
107	09	P < 0,05	P > 0,05
107	13	P < 0,05	P > 0,05
107	17	P < 0,05	P > 0,05

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
110	05	GI 927; GII 637GIII 801; GIV 298	GI 1130; GII 877,5; GIII 1110; GIV835
110	06	GI 927; GII 637GIII 801; GIV 298	GI 437,5; GII 395; GIII 467,5; GIV 330
110		Substituir figura 6.3 por:	



136	21	P < 0,05	P > 0,05
137	03	P < 0,05	P > 0,05
141	09	Tabelas 6.3 e 6.4	Tabelas 7.3 e 7.4
151	08	rumem	rúmen

1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas por nematódeos gastrintestinais em ovinos geram um impacto econômico considerável para a agroindústria mundial, principalmente em países de clima tropical e subtropical como o Brasil, aumentando os custos de produção animal. Esse incremento nos gastos é proveniente das mortes de cordeiros, desempenho reprodutivo e ganho de peso inadequados; além dos gastos com anti-helmínticos para profilaxia ou tratamento dos animais com infecções sintomáticas.

O controle dessas parasitoses é baseado em tratamentos repetidos dos animais com drogas anti-helmínticas. Entretanto, a identificação cada vez mais freqüente de resistência a todos os grupos de medicamentos comercializados no mundo, tem reduzido consideravelmente a eficiência dos tratamentos contra as endoparasitoses em ovinos. Aliada a esse problema sério, a tendência de alguns produtores em utilizar sistemas de produção orgânicos, requer alternativas para redução ou, em alguns casos, a exclusão das drogas anti-helmínticas nos sistemas de produção animal.

Um dos métodos alternativos é a suplementação dos animais com fontes de taninos condensados (TC). Fontes de TC (forrageiras ou extratos de plantas), quando fornecidas a ruminantes, melhoram a absorção protéica desses animais. Atribui-se a maior absorção protéica: maior produção de lã, carne e leite, assim como melhora na taxa de ovulação das fêmeas.

Além dos efeitos nutricionais nos animais de produção, os TC possuem um considerável efeito anti-helmíntico. Portanto, podem ser utilizados em

controles parasitários ecologicamente sustentáveis. Essa ação sobre os nematódeos gastrintestinais fornece subsídios para estudos de exploração científico-comercial destes compostos químicos na criação de ovinos no Brasil e no mundo.

Este trabalho tem como intuito apresentar os resultados de pesquisas com o uso de fontes de taninos no controle de parasitoses em ovinos. O texto foi elaborado na forma de capítulos, procurando uma compilação dos resultados de quatro ensaios experimentais. O Capítulo 1 (**Introdução**). No Capítulo 2 (**Revisão de Literatura**) são apresentados resultados de diversos autores demonstrando o uso de TC no controle de nematódeos gastrintestinais em pequenos ruminantes, assim como os objetivos do presente trabalho. No Capítulo 3 (**Projetos-piloto Realizados**) alguns ensaios preliminares deste trabalho são apresentados por terem papel importante na escolha das fontes de TC e suas respectivas doses fornecidas aos animais. No Capítulo 4 (**Efeito in vitro do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*) sobre nematódeos gastrintestinais parasitos de ovinos**) são apresentados os resultados do ensaio A – o qual avaliou a ação *in vitro* da ingestão por larvas de primeiro estágio (L1) de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Teladorsagia circumcincta*, para avaliar o efeito anti-helmíntico dos TC provenientes do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*). No Capítulo 5 (**Uso do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*) no controle de parasitos gastrintestinais em ovinos**) apresentação dos resultados do ensaio B – estudo sobre a infecção natural dos cordeiros a campo, animais infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis*, sendo os mesmos divididos em dois grupos (tratados com extrato de acácia e não

tratados); No Capítulo 6 (**Efeito direto dos taninos condensados sobre *Haemonchus contortus* em ovinos experimentalmente infectados**) e no Capítulo 7 (**Efeito direto dos taninos condensados sobre *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos experimentalmente infectados**) são apresentados os resultados dos ensaios C e D - realizados com infecção experimental dos animais por nematódeos gastrintestinais (*H. contortus* e *T. colubriformis*, respectivamente). Nos dois últimos ensaios, os animais foram divididos em cinco grupos, sendo: GI (controle infectado com nematódeo); GII (recebeu sorgo taninífero); GIII (recebeu extrato de acácia uma vez ao dia); GIV (recebeu extrato de acácia duas vezes ao dia) e GV (controle não infectado). O Capítulo 8 (**Conclusões Gerais**) é uma síntese das conclusões obtidas nos ensaios A,B,C e D. Os resultados foram promissores, demonstrando a ação direta dos TC sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos e principalmente sobre a produção de larvas infectantes; porém mais estudos são necessários para a indicação de um controle de parasitos gastrintestinais baseado no uso de fontes de TC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, as helmintoses gastrintestinais ocupam lugar de destaque (MACRAE, 1993). A infecção por nematódeos gastrintestinais é uma das principais limitações ao desenvolvimento dos ovinos em sistema de produção baseados no pastoreio (URIARTE e VALDERRÁBANO, 1990). Os helmintos acarretam altas perdas econômicas, seja em criações extensivas (KOHLENER, 2001) ou intensivas como observado por Niezen et al. (1998) na Nova Zelândia, que consideram os parasitos gastrintestinais o maior impedimento ao aumento da taxa de crescimento animal.

Nematódeos gastrintestinais são os parasitos de maior importância na ovinocultura, dentre eles destacam-se: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides* spp., *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al., 1997a; AMARANTE et al. 2004). Estes parasitos são responsáveis por redução na produção de carne e leite em ruminantes, além de lã em ovinos, com aumento da mortalidade nos animais jovens (MOLENTO e PRICHARD, 1999).

O *Haemonchus contortus* é o parasito mais patogênico para pequenos ruminantes em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, inclusive no Brasil. O parasito adulto é hematófago, causando gastropatias e perdas protéicas, tendo seu efeito exacerbado pela anemia (STRAIN e STEAR, 2001). *T. colubriformis*, *C. curticei* e *Strongyloides* spp. são parasitas do intestino delgado, podendo causar enterite severa em infecções maciças (HOLMES, 1995).

Não se pode, contudo, relacionar parasitismo com doença, já que a maioria

dos animais de um rebanho mostra-se, geralmente, em boas condições de saúde. Isto se dá devido à capacidade imunológica do hospedeiro em limitar a população de parasitos gastrintestinais a níveis aceitáveis. Quando isto ocorre, pode-se afirmar que a relação parasito-hospedeiro se encontra em equilíbrio (AMARANTE, 2001).

A criação de ovinos inadequadamente manejados predispõe ao aparecimento das parasitoses clínicas ou diminuição no desempenho dos animais, como por exemplo: uso indevido das drogas anti-helmínticas e taxas de lotação elevadas. Outros fatores podem ser considerados, como clima, estado nutricional e idade dos animais afetados.

Animais de alta produtividade são importados e introduzidos na ovinocultura brasileira, sem, porém, serem consideradas suas características de adaptabilidade e resistência aos nematódeos.

De maneira geral, os cordeiros e fêmeas no péri-parto são mais susceptíveis às verminoses (AMARANTE et al., 1992). As ovelhas com crias são a principal fonte de contaminação ambiental no rebanho. Contagens elevadas de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG) são observadas em cordeiros, mesmo antes da desmama (ROCHA, 2003). O fenômeno do péri-parto é mais discreto nas raças ovinas descritas como resistentes às verminoses, quando comparadas às raças susceptíveis (ROCHA et al., 2004).

Gray et al. (1992) relatam que algumas raças de ovinos são consideradas resistentes a *H. contortus*, sugerindo que a resistência ou susceptibilidade do indivíduo ao parasitismo é geneticamente determinada. A resistência aos parasitos seria a capacidade do hospedeiro de suprimir o estabelecimento e/ou subsequente

desenvolvimento da infecção.

Outro termo amplamente utilizado é resiliência, que é a capacidade do animal infectado em manter níveis de produção relativamente normais (BISSET e MORRIS, 1996); também traduzida como tolerância dos animais à infecção parasitária. Termo este, que provavelmente, melhor traduza a capacidade dos animais deslanados criados no Brasil.

Praticamente a totalidade dos ovinos criados a campo hospeda uma ou mais espécies de nematódeos. O controle destes parasitos é baseado em tratamentos repetidos do animal com drogas anti-helmínticas (AMARANTE et al., 1997a; MUNN, 1997). Estas drogas são classificadas em anti-helmínticos de amplo espectro, divididos em três grandes grupos (benzimidazóis, imidazóis e lactonas macrocíclicas) e de pequeno espectro (salicilanilidas/fenóis substitutos e organofosforados).

Esses medicamentos reduzem de forma significativa o nível de infecção por helmintos gastrintestinais em cordeiros (KAWANO et al., 2000), porém o surgimento cada vez mais freqüente de cepas resistentes aos anti-helmínticos tem reduzido drasticamente a eficiência dessas drogas no controle de infecções por nematódeos (WALLER, 1997), tornando-as ineficazes frente às populações resistentes (AMARANTE, 2001). Em várias regiões tropicais e subtropicais, as drogas anti-helmínticas são intensivamente utilizadas, podendo desencadear o fenômeno de resistência múltipla (BUTTER et al., 2000).

A resistência aos anti-helmínticos caracteriza-se pelo declínio da eficiência de uma droga contra uma população de parasitos, anteriormente suscetível àquele tratamento (SANGSTER e GILL, 1999). A resistência contra todos os grupos de

drogas utilizadas é uma realidade mundial (MOLENTO e PRICHARD, 1999), sendo um importante problema, principalmente em ovinos e caprinos (GOPAL et al., 1999).

O fenômeno de multirresistência às drogas (MRD) anti-helmínticas está associado à expressão de glicoproteínas de membrana (P-gp), que reduzem a concentração intracelular das drogas antiparasitárias (MOLENTO e PRICHARD 2001), sendo que indivíduos que manifestam a MRD dentro de uma população podem transmitir seu fenótipo para as gerações futuras (MOLENTO e PRICHARD, 1999).

O aparecimento da resistência aos anti-helmínticos e a tendência dos últimos anos de mudança para sistemas orgânicos de produção requerem alternativas para redução ou até a exclusão das drogas anti-helmínticas no controle parasitário (ATHANASIADOU et al., 2000a).

O aumento da incidência de MRD em todo o mundo, associado a ecotoxicidade e resíduos na carne, provenientes do uso de drogas anti-helmínticas, enfatizam a necessidade de serem desenvolvidos programas integrados de controle parasitário, por meio de tratamentos estratégicos baseados na epidemiologia, eliminação de vermifugações desnecessárias, utilização de pastoreio alternado e higienização das pastagens (MOTA et al., 2003).

Em resposta aos problemas relacionados anteriormente, novas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de descobrir pontos vulneráveis na biologia ou ecologia desses parasitos (TYRREL et al., 2002). Alguns dos controles parasitários alternativos incluem o uso de vacinas contra nematódeos (MEEUSEN, 1996), controle biológico (LARSEN, 1999) e o uso de forragens taniníferas com

propriedades anti-helmínticas (BUTTER et al, 2000).

A suplementação dos ovinos com taninos condensados (TC), oriundos de plantas forrageiras ou dos extratos de quebracho e acácia, vêm sendo utilizados no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos, entre eles *T. colubriformis* (ATHANASIADOU et al., 2000a e 2000b) e *H. contortus* (NIEZEN et al., 2002a).

Forrageiras com alto teor de TC, quando fornecidas a ovinos e bovinos, melhoram a digestão protéica e absorção dos aminoácidos. Atribui-se a maior absorção protéica: maior produção de lã, carne e leite, assim como melhora na taxa de ovulação das fêmeas. O estado nutricional do indivíduo é considerado um importante fator de equilíbrio na relação parasito-hospedeiro, assim como na patogênese da infecção parasitária (VALDERRÁBANO et al., 2002).

Ovinos mantidos em boas condições nutricionais, especialmente os que recebem teores elevados de proteína na dieta, apresentam maior resistência contra as infecções por nematódeos gastrintestinais (BRICARELLO et al., 2003). Corroborando com estes dados, tem-se observado que animais com dietas suplementadas em proteína têm maior tolerância às infecções parasitárias (BUTTER et al., 2000; STRAIN e STEAR, 2001). Ovinos experimentalmente infectados com *T. colubriformis*, que receberam suplementação protéica diária, apresentaram redução significativa nas contagens de OPG, assim como maior ganho de peso, quando comparados a outros animais sem suplementação (VAN HOUTERT et al., 1995).

Os TC ligam-se às proteínas da dieta formando complexos (tanino-proteína), proporcionando que às proteínas de maior valor biológico não sejam degradadas e

utilizadas pela flora bacteriana ruminal, sendo estes complexos dissociados no intestino delgado, local de absorção dos aminoácidos.

Os taninos compreendem um grupo de compostos fenólicos encontrados principalmente em frutos verdes e plantas da família Leguminosae. Esses compostos fenólicos são classificados conforme sua estrutura molecular em taninos hidrolisáveis (TH) ou taninos condensados (TC), sendo os condensados também conhecidos como proantocianidinas. TC são os taninos mais comumente encontrados em plantas forrageiras, árvores e arbustos (BARRY e MCNABB, 1999). Estruturalmente, os TC são polímeros de unidades de flavonóides unidos por ligações carbono-carbono (HAGERMAN e BUTLER, 1981).

Segundo Athanasiadou et al. (2000a) existem duas hipóteses para explicar o efeito anti-helmíntico dos TC contra uma população de *T. colubriformis* em ovinos. A primeira é o efeito direto dos TC sobre larvas infectantes (L3) e parasitos adultos, com a diminuição da fecundidade das fêmeas. A segunda hipótese sugere o efeito indireto dos TC, melhorando a utilização protéica pelo hospedeiro e conseqüentemente uma melhor resposta imunológica deste aos parasitos.

Eliminação da carência protéica, ou seja, um aporte adequado de proteínas metabolizáveis na dieta animal, rapidamente melhora a expressão da imunidade contra nematódeos em ovelhas lactantes, diminuindo a excreção de ovos de helmintos nas fezes. Esses dados podem ser úteis para reduzir a contribuição das fêmeas parturientes na contaminação das pastagens, apenas com o aumento da absorção protéica (HOUDIJK et al., 2001).

Em ovinos, a dieta tem um significativo impacto sobre a eclosão dos ovos e

subseqüente desenvolvimento larval de *T. colubriformis* no laboratório e a campo. Niezen et al. (2002b) relataram uma consistente redução no desenvolvimento larval de *T. colubriformis* em ovinos ao utilizar a forrageira *Dorycnium rectum*, que possui alta concentração de TC, em comparação com outras forrageiras com menor ou nenhuma porcentagem de TC.

A diminuição do OPG em animais que receberam fontes de TC pode provir de duas origens: pela diminuição da carga parasitária, ou por redução da fecundidade das fêmeas de nematódeos. Paolini et al. (2003a; 2003b), trabalhando com caprinos, relataram diminuição da fecundidade das fêmeas de *H. contortus* e *T. colubriformis*, porém o efeito direto sobre o parasito depende do estágio de evolução em que este se encontra. Segundo os mesmos autores, o efeito do extrato de quebracho pode durar 18 dias, após sua administração.

Dieta baseada na forrageira sulla (*Hedysarum coronarium*), a qual contém alta concentração de TC, foi associada à redução no número de *T. colubriformis* no intestino de ovelhas (NIEZEN et al., 1995; 1998a; 2002a). Da mesma forma Athanasiadou et al. (2000b) relatam que cordeiros demonstraram uma redução na carga parasitária de *T. colubriformis* ao receberem uma solução de extrato de quebracho (fonte de TC).

Athanasiadou et al. (2001) analisaram o efeito dos TC sobre diferentes nematódeos gastrintestinais de ovinos, fornecendo a estes animais dietas com 4%, 8% e 16% de extrato de quebracho (EQ). Demonstrou-se que a contagem de OPG de *T. colubriformis* nos ovinos que receberam 16% de EQ foi menor que a das outras dietas ($P < 0,01$). Já os animais que ingeriram dieta com 8% de EQ apresentaram menor carga parasitária ($P < 0,05$). Concluiu-se que os TC,

provenientes do EQ, reduziram o nível de parasitismo intestinal, quando administrados aos ovinos por um período de três dias. Entretanto, cinco dos seis animais que receberam a dieta com 16% de EQ apresentaram anorexia ao 30º dia do experimento (3º dia de fornecimento do EQ).

No Brasil, o extrato de acácia (*Acacia mearnsii*) é utilizado, ao invés, do quebracho como fonte de TC, já que as árvores das quais é extraído o EQ estão em processo de extinção. Entre as espécies das quais se podem extrair o extrato de quebracho encontra-se a *Schinopsis brasiliensis*, a qual se encontra presente na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção¹. O EQ não acarretou efeitos tóxicos a ovinos, quando administrado intraruminalmente, nas doses de 0,5 g e 1,5 g de EQ kg⁻¹ PV, sendo potencialmente indicado para uso na suplementação animal (HERVÁS et al., 2003).

A maioria dos nematódeos de interesse econômico no Brasil e no mundo apresenta duas fases distintas no seu desenvolvimento: (1) uma fase de vida parasitária que ocorre no hospedeiro e que se inicia com a ingestão da larva infectante (L3) e se completa com o parasito adulto eliminando ovos nas fezes e (2) uma fase de vida que ocorre na pastagem e vai de ovo até larva infectante.

Como visto em vários trabalhos citados neste texto, os TC agem nas duas fases de desenvolvimento dos nematódeos: reduzindo a carga parasitária do animal, diminuindo a fecundidade das fêmeas e com isso a eliminação de ovos pelo

¹ Através da Portaria Nº. 37-N, de 3 de abril de 1.992, o IBAMA torna pública a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Encontrada no endereço eletrônico: <http://www2.ibama.gov.br/flora/extincao.htm> (acesso em 29/09/2005).

hospedeiro (fase 1); ou diminuindo a porcentagem de eclosão dos ovos e ainda podendo diminuir a viabilidade das L1 e com isso gerando um menor número de L3 (fase 2). Portanto, o uso dos TC é de grande valor no controle das parasitoses na ovinocultura, sendo importante ferramenta, já que age na epidemiologia das helmintoses em todas as suas fases.

O problema da multirresistência contra as drogas anti-helmínticas deve ser analisado por uma equipe multidisciplinar, com a participação de diversos cientistas, interpretando o problema sobre diferentes pontos de vista, já que o estudo do controle parasitário nos animais auxilia na prevenção de problemas similares no homem (SANGSTER, 1999). Ressalta-se também a atual tendência pela produção dos animais chamados “orgânicos”. Esses animais criados em “fazendas orgânicas”, não possuem resíduos de fármacos na carcaça, ou em qualquer outro subproduto destinado ao uso ou consumo humano, já que não utilizam nenhum tipo de droga na fase de produção.

O interesse no efeito direto dos TC sobre ruminantes traz grandes perspectivas para o controle de nematódeos e redução na ocorrência de cepas resistentes às drogas anti-helmínticas, assim como um grande avanço na cadeia de produção dos animais “orgânicos”. Portanto, o desenvolvimento de um produto não fármaco ou de origem natural, com característica anti-helmíntica e de fácil disponibilização aos ovinos teria um grande potencial comercial.

Além da indicação aos produtores orgânicos, o extrato de acácia, pode ainda, ser utilizado como controle alternativo juntamente ao controle parasitário tradicional, com a finalidade de diminuir e espaçar as administrações das drogas anti-helmínticas convencionais. O conhecimento da epidemiologia dos nematódeos é

primordial, já que os TC agem na descontaminação das pastagens, diminuindo a incidência de manifestações clínicas da doença, portanto atenuando, ou quase extinguindo os efeitos deletérios das helmintoses na produção de ovinos.

Os efeitos anti-helmínticos dos TC demonstrados nos animais de produção, principalmente em ovinos, sustentam o potencial uso das fontes de tanino altamente concentrado (TAC) nos controles parasitários ecologicamente sustentáveis. A ação direta do TAC sobre os nematódeos gastrintestinais fornece subsídios para estudos de exploração científico-comercial destes compostos químicos na criação de ovinos no Brasil e no mundo.

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos dos taninos condensados (TC) sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos.

2.1.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* dos TC provenientes do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*) sobre larvas de primeiro estágio de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Teladorsagia circumcincta*.
- Determinar o efeito anti-helmíntico dos TC provenientes do extrato de acácia sobre ovinos naturalmente infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis*.
- Determinar o efeito anti-helmíntico dos TC provenientes do extrato de acácia sobre ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus* e

T. colubriformis.

- Adequar a dose de TC proveniente do extrato de *Acacia mearnsii* fornecida aos animais e verificar seu efeito sobre o ganho de peso e trato digestório dos animais.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.A.G.; CARMELLO, M.J.; PADOVANI, C.R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.29, p.31-38, 1992.

AMARANTE, A.F.T.; BAGNOL JUNIOR, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.73, p.89-104, 1997a.

AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: Sociedade Brasileira de Zootecnia. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.461-473.

AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.120, p.91-106, 2004.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R.L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30, p.1025-1033, 2000a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R.L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, London, v.146, p.728-732, 2000b.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effect of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.99, p.205-219, 2001a.

BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. The implication of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.81, p.263-272, 1999.

BISSET S.A.; MORRIS, C.A. Feasibility and Implications of Breeding Sheep for Resilience to Nematode Challenge. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.9, n.8-9, p.869-877, 1996.

BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; HOUDIJK, J.G.M.; ROCHA, R.A.; CABRAL FILHO, S.L.; GENNARI, S.M. Influence of dietary supply on resistance to infection with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Inês lambs. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, York, 2003. **Proceedings...** York: BSAS, 2003. p.93.

BUTTER, N.L.; DAWSON, J.M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P.J. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.134, p.89-99, 2000.

GOPAL, R.M.; POMROY, W.E.; WEST, D.M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.781-786, 1999.

GRAY, G.D.; BARGER, I.A.; LE JAMBRE, L.F.; DOUCH, P.G.C. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pasture contaminated with parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.22, n.4, p.417-425, 1992.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.256, p. 4494-4497, 1981.

HERVÁS, G.; PÉREZ, V.; GIRÁLDEZ, F.J.; MANTECÓN A.R.; ALMAR, M.M.; FRUTOS, P. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.129, p. 44-54, 2003.

HOLMES, P.H. Pathogenesis of trichostrongylosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.18, p.89-101, 1995.

HOUDIJK, J.G.M.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Reducing the degree of protein scarcity rapidly increases immunity to nematodes in ewes. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.60, p.515-525, 2001

KAWANO, E.L.; YAMAMURA, M.H.; RIBEIRO, E.L.A. **Efeitos do tratamento com anti-helmínticos em cordeiros naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais sobre os parâmetros hematológicos, ganho de peso e qualidade de carcaça**. 2000. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - CCA, DMVP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

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

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.139-146, 1999.

MACRAE J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.52, p.121-130, 1993.

MEEUSEN, E.N.T. Rational Design of Nematode Vaccines; Natural Antigens. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.26, n.8/9,p.813-818, 1996.

MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.8, n.1, p.75-86, 1999.

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

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

MUNN, E.A. Rational Design of Nematode Vaccines: Hidden Antigens. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.23, n.4, p.359-366, 1997.

NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; WAGHORN, G.C.; CHARLESTON, W.A.G. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.125, p.281-289, 1995.

NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; WAGHORN, G.C.; CHARLESTON, W.A.G. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.80, p.15-27, 1998a.

NIEZEN, J.H.; CHARLESTON, W.A.G.; ROBERTSON, H.A.; SHELDON, D.; WAGHORN, G.C.; GREN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.105, p.229-245, 2002a.

NIEZEN, J.H.; WAGHORN, G.C.; GRAHAM, T.; CARTER, J.L.; LEATHWICK, D.M. The effect of diet fed to lamb on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.105, n.4, p.269-283, 2002b.

PAOLINI, V.; FRAYSSINES, A.; DE LA FARGE, S.; DORCHIES, P.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on established populations and in incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. **Veterinary Research**, Paris, v.34, p.331-339, 2003a.

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J.P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, PH.; HOSTE, Effects of condensed tannins on goats experimentally infect with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.113, p.253-261, 2003b.

ROCHA, R.A. **Resistência de ovinos Santa Inês e Ile de France às infecções por nematódeos gastrintestinais**. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.55, p.65-75, 2004.

SANGSTER, N.C.; GILL, J. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.15, n.4, p.141-146, 1999.

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

TYRREL, K.L.; DOBSON, R.J.; STEIN, P.A.; WALKDEN-BROWN, S.W. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.107, p.85-93, 2002.

URIARTE, J.; WALDERRÁBANO, J. Grazing management strategies for control of parasitics diseases in intensive sheep production systems. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.37, p.243-255, 1990.

WALLER, P.J. anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.72, p.391-405, 1997.

VALDERRÁBANO, J.; DELFA, R.; URIARTE, J. Effect of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.104, p.327-338, 2002.

VAN HOURTERT, M.F.J.; BARGER, I.A.; STEELB, J.W.; WINDONA, R.G.; EMERY, D.L. Effects of dietary protein intake on responses of young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.56, n.1-3, p.163-180, 1995.

3. PROJETOS-PILOTO REALIZADOS

Inicialmente, foram realizados três experimentos. Todos com a finalidade de determinar o efeito dos TC sobre o número de OPG de animais tratados e escolher as fontes de TC a serem utilizadas. Posteriormente, outro ensaio foi realizado com a finalidade de se estabelecer a dose mais adequada de extrato de acácia, também chamado de TAC, a ser fornecida aos ovinos.

No primeiro experimento 20 cordeiros da raça Santa Inês, mantidos a campo e suplementados com 300 g de milho, foram alocados em dois grupos (G1 tratados com TC e G2 não tratados). Os animais do G1 receberam, durante três dias na semana, 300 g de *Sorghum vulgare* (sorgo taninífero com 2% TC). Depois de cinco semanas quatro animais de cada grupo foram abatidos, sendo que os restantes foram abatidos no final de dez semanas, para determinação da carga parasitária. A fecundidade dos nematódeos foi determinada dividindo-se o OPG dos cordeiros no dia do abate pelo número de fêmeas de helmintos identificados.

Neste primeiro experimento Minho et al. (2003) não relataram diferença significativa entre os tratamentos, ao analisarem a fecundidade das fêmeas de nematódeos. A quantidade de TC presente no sorgo taninífero utilizado (2%), foi considerada insuficiente. Apesar da diferença entre os tratamentos não ser significativa; os resultados foram considerados promissores, apresentando valor de $P = 0,096$.

No segundo experimento Minho et al. (2004) trabalharam com 12

cordeiros mantidos a campo e suplementados com concentrado (19% PB). Os animais foram divididos em três grupos (GI: controle não tratado, GII: tratado com sorgo taninífero e GIII: tratado com extrato de acácia). Ao concentrado dos grupos tratados, foi adicionado sorgo taninífero (2% TC) ou extrato de acácia, também chamado de tanino altamente concentrado (TAC) com 15% de TC, três dias durante a semana. Os tratamentos eram equivalentes na quantidade de TC ($10 \text{ g TC animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Após 10 semanas de tratamento houve diminuição significativa no OPG dos grupos suplementados com TC ($P < 0,05$), em relação ao grupo controle.

No terceiro experimento preliminar, foram utilizados 25 cordeiros da raça Santa Inês, divididos em cinco grupos (GI: controle infectado, GII: recebeu sorgo taninífero, GIII: recebeu leucaena, GIV: recebeu TAC e GV: (controle não infectado). Vinte animais foram infectados com 5000 L3 de *H. contortus*. Os grupos iniciaram os tratamentos 30 dias pós-infecção (p.i.) recebendo: *Sorghum vulgare*, *Leucaena leucocephala* e TAC, com 3; 4 e 15% de TC, respectivamente. Todos os animais, com exceção dos grupos controle receberam doses equivalentes de TC, ou seja, aproximadamente $10 \text{ g de TC por animal dia}^{-1}$. O TAC foi administrado durante dois dias consecutivos por via oral (VO), já o sorgo taninífero e a leucaena foram oferecidos durante nove dias, suplementados no concentrado oferecido aos animais.

Neste terceiro experimento descrito acima, Minho et al. (2005) relataram diminuição no OPG do grupo tratado com TAC, em relação aos demais ($P < 0,05$). No último dia do experimento a média de OPG do grupo

controle infectado foi de 1540, sendo que a média no grupo tratado com TAC foi de apenas 60. No último dia experimental (40 dias pós-infecção) Deve-se ressaltar, entretanto, que alguns animais tratados com 50 g de TAC dia⁻¹ manifestaram reações indesejáveis, como diarreia e anorexia.

Para determinação da dose ideal de TAC um quarto ensaio foi realizado. Quatro ovinos foram alocados em baia coletiva, recebendo doses crescentes de TAC: 0,6; 1,0; 1,6 e 2,0 mg kg⁻¹ PV. Os animais receberam o TAC VO, diluído em água morna (aproximadamente 37 °C), durante dois dias consecutivos. Após receberem o tratamento, os mesmos foram observados durante sete dias. Sendo que, após o período de observação uma nova dose subsequente foi fornecida aos animais. Constatou-se que a dose de TAC (1,6 g kg⁻¹ PV) foi a maior dose fornecida, a qual não desencadeou efeitos colaterais aos animais. Já a dose superior (2,0 g kg⁻¹ PV) desencadeou anorexia e diarreia pastosa aos animais, durante dois dias.

Em experimentos iniciais, alguns animais manifestaram reações indesejáveis após o fornecimento do TAC. Entretanto, estas manifestações foram minimizadas e praticamente abolidas após a administração do produto por PV do animal.

REFERÊNCIAS

MINHO, A.P.; CABRAL FILHO, S.L.S.; BRICARELLO, P.A.; RODRIGUES, R.R.; BUENO, I.C.S.; GODOY, P.B.; NOZELLA, E.F.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep naturally infected. In: WORLD

CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.; REUNIÃO DA ASSOCIASSÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., Porto Alegre, 2003b. **Anais...** Porto Alegre: Associação Latino-americana de Produção animal, 2003.

MINHO A.P.; GODOY, P.B.; GENNARI, S.M.; CASTILHO, L.A.; ABDALLA, A.L. Taninos condensados no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO DE LATINO-AMERICANO DE RICKETTISIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004.

MINHO, A.P; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on *Haemonchus contortus* in sheep experimentally infected In: BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE ANNUAL MEETING, York, 2005. In vitro and analytical techniques; **proceedings...** York: University of York, 2005.

4. EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DE ACÁCIA (*Acacia mearnsii*) SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS PARASITOS DE OVINOS

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi determinar os potenciais efeitos inibitórios dos taninos condensados, provenientes do extrato de acácia na alimentação de larvas do primeiro estágio (L1) de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus vitrinus* e *Teladorsagia circumcincta*. Para isso foi utilizado o método *in vitro* de inibição da ingestão de bactérias por L1 dos respectivos nematódeos. Larvas isoladas de fezes de ovinos doadores com infecção parasitária monoespecífica foram incubadas em diluições seriadas do extrato de acácia ou TAC. Utilizando-se várias diluições de TAC, determinou-se a concentração mais próxima da DL₅₀ para cada espécie de parasito. Após essa determinação, as respectivas diluições foram incubadas na presença de polietilenoglicol (PEG), para inativação dos taninos condensados (TC). Com os TC inativados pelo PEG, o teste foi feito novamente com a finalidade de se avaliar o verdadeiro papel dos taninos sobre as L1. Os resultados foram promissores, revelando a ação do TAC sobre as L1 de todas as espécies de parasitos (*H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta*), com diferença estatisticamente significativa entre os valores do controle negativo (água destilada) e grupo tratado com TAC, ($P < 0,001$); e valores de DL₅₀ de 0,043; 0,038 e 0,050 (EP = 0,0024), para *H. contortus*, *T. vitrinus* e *T. circumcincta*, respectivamente. Também houve diferença entre os tratamentos com TAC e TAC + PEG ($P < 0,01$). Esses resultados corroboram com a hipótese da ação

direta dos TC, provenientes do TAC, sobre as larvas de primeiro estágio das espécies de nematódeos estudadas neste trabalho. Portanto, o potencial de utilização do TAC no controle alternativo das endoparasitoses em ovinos parece ser promissor.

Palavras-chave: Taninos condensados; Efeito anti-helmíntico; Nematódeos;

In vitro.

IN VITRO EFFECT OF ACACIA CONDENSED TANNIN EXTRACT (*Acacia mearnsii*) ON GASTROINTESTINAL NEMATODES OF OVINE

ABSTRACT

The main objective of this work was determine the inhibitory effects of acacia condensed tannin extract on first stage (L1) larval feeding of *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus vitrinus* and *Teladorsagia circumcincta*. The experiment was carried out to evaluate the larval feed inhibition of each species. The L1 recovery from faecal samples of donor with monoespecific infection were incubated in several dilutions of acacia extract (AE). The LD₅₀ was determined for the three species of nematodes. Polyethylene glycol (PEG) was added to all dilutions of AE to inactivate the condensed tannins (CT) from acacia and to confirm their effect on L1. The impact of CT on larval feed inhibition was detected on all species of nematodes (*H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta*). There was difference between water control and CT treated groups ($P < 0.01$). The LD₅₀ values were 0.043; 0.038 e 0.050 (SE = 0.0024), for *H. contortus*, *T. vitrinus* e *T. circumcincta*, respectively. Difference was detected between treatments AE and AE + PEG ($P < 0.01$). The analysis of these results suggests the direct effect of CT on L1 of the studied nematodes. Thus the potential utilization of AE on alternative nematode control in sheep would be possible.

Key words: Condensed tannins; Anthelmintic effect; Nematodes; *In vitro*.

4.1. INTRODUÇÃO

Alguns métodos *in vitro* são utilizados com a finalidade de avaliar a ação de compostos bioativos e sua possível eficácia anti-helmíntica contra endoparasitos de ruminantes. Os principais métodos *in vitro* desenvolvidos para se avaliar o efeito alguma substância sobre nematódeos de ruminantes são: teste de desenvolvimento larval (DL), inibição da migração larval (IML), avaliação do desenvolvimento dos ovos de nematódeos (DO) e inibição da ingestão pelas larvas de primeiro estágio (IIL) (AMARANTE et al., 1997b; COLES et al., 1988).

Segundo Athanasiadou et al. (2001a), os dois testes mais indicados para avaliar a possível ação anti-helmíntica proveniente dos extratos de plantas sobre os nematódeos gastrintestinais de ruminantes são os testes IML e IIL.

A ação dos taninos condensados provenientes de forrageiras ou extratos de plantas vem sendo intensamente estudada. A finalidade desses estudos é comprovar os efeitos diretos ou indiretos dos TC sobre os nematódeos gastrintestinais de ovinos (Athanasiadou et al., 2000; 2001a e 2001b).

Dois produtos ricos em TC e descritos como potencialmente anti-helmínticos são o extrato de quebracho (*Schinopsis brasiliensis*) e o extrato de acácia (*Acacia mearnsii*).

No Brasil, o extrato de acácia foi e continua sendo testado em experimentos com infecção natural ou experimental de ovinos por

Haemonchus contortus e *Trichostrongylus colubriformis* (MINHO et al., 2003 e 2004).

A utilização do PEG nas pesquisas envolvendo TC é de grande valor, já que este produto tem a capacidade de se ligar aos TC, formando complexos PEG-TC, inativando estes taninos (MAKKAR, 2003) e conseqüentemente neutralizando seu efeito sobre os parasitos. Para confirmar que o efeito do TAC sobre as larvas de primeiro estágio (L1) é proveniente dos TC, testes de IIL devem ser realizados com diluições pré-estabelecidas da solução de TAC, previamente incubadas na presença de uma solução de PEG.

Este ensaio teve como objetivo determinar os potenciais efeitos inibitórios dos TC, provenientes do TAC, sobre larvas L1 de *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus vitrinus*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Fonte de taninos condensados

A fonte de TC utilizada foi o extrato de acácia² (*Acacia mearnsii*, sinonímia *Acacia molissima*, acácia-negra ou black wattle), também denominado de TAC. Esse extrato possui 15% de TC (método HCl-Butanol; segundo PORTER et al., 1986).

² Tanino de acácia de uso universal, Seta Sun[®]. Seta S.A. – Extrativa Tanino de Acácia.

4.2.2. Larvas de primeiro estágio

As L1 foram recuperadas das fezes de ovinos doadores com infecção monoespecífica para cada espécie de nematódeo, ou seja, *H. contortus*, *T. circumcincta* e *T. vitrinus*. As cepas utilizadas foram isoladas diretamente dos doadores utilizados no Moredun Research Institute (Edinburgo-Escócia) para manutenção de linhagens de nematódeos gastrintestinais susceptíveis aos anti-helmínticos.

4.2.3. Inibição da ingestão de bactérias marcadas por larvas de primeiro estágio

As L1 das respectivas espécies foram incubadas por 2 h, a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C), em várias concentrações de TAC. Primeiramente foi produzida uma solução padrão de TAC 10 mg mL⁻¹ e, a partir desta, foram realizadas diluições seriadas de 1,25 mg mL⁻¹ até 0,02 mg mL⁻¹.

Depois da incubação inicial, foram adicionadas *Escherichia coli* liofilizadas marcadas com isotiocianato de fluoresceína³ (FITC). Na manhã seguinte (aproximadamente 18 h de incubação), o número de larvas que ingeriram ou não as bactérias marcadas foi determinado com o auxílio de um microscópio de epifluorescência invertido. As larvas viáveis foram identificadas pela presença do material fluorescente em seu trato digestório.

³ Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled *E. coli* 026:B6 LPS (FITC-LPS, SIGMA).

Para confirmar o efeito dos taninos sobre as L1, os testes foram repetidos na presença de PEG, com a finalidade de inativar os TC provenientes do TAC. Da solução inicial contendo 1 g de PEG em 25 mL de água destilada, foram retirados 10 µL para cada tubo, os quais continham as várias diluições de TAC utilizadas anteriormente.

4.2.4. Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento fatorial completo 3x8x2 (três espécies de nematódeos; oito diluições de TAC e dois tratamentos - com e sem PEG).

4.2.5. Análise estatística

Após a incubação final, a porcentagem de larvas que ingeriram as bactérias marcadas foi determinada para cada concentração de TAC. As respectivas doses letais para 50% da população (DL₅₀) de cada espécie de nematódeo foram calculadas após transformação logarítmica dos valores das diluições de TAC.

4.3. RESULTADOS

Demonstrou-se a ação do TAC sobre as L1 de todas as espécies de parasitos (*H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta*) (Tabela 4.1), com diferença estatisticamente significativa entre os valores do controle negativo (água destilada) e grupo tratado com TAC, ($P < 0,01$), com valores de DL₅₀ de (0,043; 0,038 e 0,050 mg mL⁻¹ (EP: 0.0024), para *H. contortus*, *T. vitrinus* e *T. circumcincta*, respectivamente. Também houve diferença entre os

tratamentos com TAC e TAC + PEG ($P < 0,01$), sendo que as DL_{50} para os mesmos parasitos foram alteradas para 0,096; 0,100 e 0,250 $mg\ mL^{-1}$, respectivamente.

Tabela 4.1- Porcentagem de larvas de primeiro estágio de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus vitrinus* e *Teladorsagia circumcincta* que ingeriram as bactérias marcadas com isotiocianato de fluoresceína na presença de extrato de acácia (TAC) ou TAC + polietilenoglicol (PEG)

Diluições $mg.mL^{-1}$	<i>H. contortus</i>		<i>T. vitrinus</i>		<i>T. circumcincta</i>	
	TAC	TAC + PEG	TAC	TAC + PEG	TAC	TAC + PEG
Controle*	73 (71; 75)	75 (71;79)	75 (75; 75)	75 (73; 77)	74 (73; 75)	0.75 (72; 78)
1.25	0	0	0	0	0	6
0.625	0	3	0	0	0	20
0.31	0	6	0	3	0	38
0.155	0	8	0	20	2	44
0.08	11	38	4	51	10	71
0.04	42	60	26	65	40	71
0.02	71	71	65	74	71	72

*: valores (mínimo; máximo).

Controle: Água destilada + bactéria marcada

Os ensaios de IIL forneceram resultados consistentes. Os tratamentos controles: água destilada e água mais PEG não afetaram a atividade larval, com resultados de 70% ou mais das larvas consideradas viáveis, ou seja, as L1 que ingeriram as bactérias marcadas. Os resultados possuem repetibilidade em todas as réplicas e assim sendo, considerados de confiança.

4.4. DISCUSSÃO

As L1 são muito susceptíveis aos valores de pH abaixo de seis e acima de oito. A solução padrão de TAC (40 mg mL⁻¹) possui valor de pH 5,5. Não houve necessidade de modificar-se o pH do TAC, até mesmo, por causa do perigo de potenciais interações entre os compostos bioativos e os sais contidos na solução tampão.

No presente trabalho, os resultados do efeito do TAC sobre as espécies de nematódeos analisadas (*H. contortus*, *T. vitrinus* e *T. circumcincta*) forneceram a evidência da atividade anti-helmíntica dos TC provenientes do TAC, contudo, não há dados sobre outros compostos bioativos contidos no TAC e que potencialmente poderiam ter efeito sobre as L1.

Entretanto, é extremamente provável que, senão a totalidade, grande parte dos efeitos bioativos provenientes do TAC foram originados pelos TC. Afirmação comprovada pelos resultados da IIL quando da utilização do PEG para inibição dos efeitos causados pelos TC.

Os resultados *in vitro* apresentados neste trabalho corroboram com pesquisas preliminares *in vivo*, que demonstram a ação dos TC sobre *H. contortus*, quando da utilização de sorgo taninífero e TAC no tratamento de ovinos experimentalmente infectados (MINHO et al., 2005).

Diante destes resultados, novos ensaios de IIL utilizando-se o líquido ruminal proveniente de animais tratados com TAC tornam-se necessários, para determinação da concentração intraruminal destes compostos. Com

base na concentração *in vivo* desses compostos, quando comparada a DL_{50} determinada neste trabalho, seria possível a determinação da dose mínima de TAC a ser fornecida aos ovinos.

A utilização do TAC em estudos *in vivo* e *in vitro* para controle das endoparasitoses elimina muito dos empecilhos ocorridos quando da utilização de plantas que possuem metabólitos secundários bioativos. Segundo Athanasiadou e Kyriazakis (2004), a concentração e estrutura destes metabólitos nas plantas podem variar entre regiões experimentais, época do ano e mesmo dentro de um mesmo período de pastejo.

O efeito anti-helmíntico do TAC, demonstrado neste trabalho pela ação direta sobre as L1 de nematódeos gastrintestinais de interesse econômico, comprova o potencial de utilização dos TC no controle alternativo das endoparasitoses na criação de ovinos. Entretanto, seu uso prático está ligado diretamente aos estudos *in vivo* dos efeitos deletérios em ovinos. Hervás et al. (2003), testando o efeito deletério do quebracho em ovinos, determinaram que doses de até $1,5 \text{ g de EQ kg}^{-1} \text{ PV}$ não originaram lesões macro ou microscópicas no intestino, fígado e rins dos animais experimentais.

Em ensaios *in vivo* com ovinos experimentalmente infectados e livres de infecção parasitária, o TAC administrado por via oral aos animais, durante dois dias, na dose de $1,6 \text{ g kg}^{-1} \text{ PV}$ não demonstrou efeitos deletérios sobre consumo e peso vivo dos animais. (MINHO et al., dados ainda não publicados).

A suplementação do TAC na dieta animal é indicada durante curtos períodos de tempo, porém se administrado em dias estratégicos, pode contribuir na descontaminação das pastagens por larvas infectantes de nematódeos. Isto se dá pela diminuição da sobrevivência das L1 (ainda não infectantes), impedindo, portanto que novos animais sejam infectados ou diminuindo a reinfecção do rebanho.

4.5. CONCLUSÃO

O TAC pode auxiliar no controle das infecções parasitárias agindo em dois pontos críticos: (i) evitando ou minimizando o estabelecimento de novas infecções parasitárias no animal (ação direta); (ii) agindo na descontaminação das pastagens, já que concentrações elevadas de TC nas fezes podem inibir a disseminação de larvas infectantes no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, A. F. T.; POMROY, W. E.; CHARLESTON, W. A. G.; LEATHWICK, D. M.; TORNERO, M. T. T. Evaluation of a Larval Development Assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 27, p. 305-311, 1997b.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Effect of short term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, London, v. 146, p. 728-732, 2000

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal species: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p. 205-219, 2001a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **British Journal of Nutrition**, London, v. 86, p. 697-706, 2001b.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production system. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 63, p. 631-639, 2004.

COLES, G. C.; TRITSCHLER, J. P.; GIORDANO, D. J.; SCHMIDT, A. L. Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 45, p. 50-53, 1988.

HERVÁS, G.; PÉREZ, V.; GIRÁLDEZ, F.J.; MANTECÓN A.R.; ALMAR, M.M.; FRUTOS, P. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.129, p. 44-54, 2003.

MINHO, A.P.; CABRAL FILHO, S.L.S.; BRICARELLO, P.A.; RODRIGUES, R.R.; BUENO, I.C.S.; GODOY, P.B.; NOZELLA, E.F.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep naturally infected. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.; REUNIÃO DA ASSOCIASSÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., Porto Alegre, 2003b. **Anais...** Porto Alegre: Associação Latino-americana de Produção animal, 2003.

MINHO A.P.; GODOY, P.B.; GENNARI, S.M.; CASTILHO, L.A.; ABDALLA, A.L. Taninos condensados no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO DE LATINO-AMERICANO DE RICKETTISIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004.

MINHO, A.P; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on *Haemonchus contortus* in sheep experimentally infected In: BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE ANNUAL MEETING, York, 2005. In vitro and analytical techniques; **proceedings...** York: University of York, 2005.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223-230, 1986.

5. USO DO EXTRATO DE ACÁCIA (*Acacia mearnsii*) NO CONTROLE DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS EM OVINOS

RESUMO

O desenvolvimento de populações de parasitos resistentes às drogas anti-helmínticas disponíveis no comércio mundial tornou-se um problema em diversos países. No final da década de 1970, quando da descrição do primeiro relato de resistência aos anti-helmínticos, o fenômeno não foi analisado com seriedade por veterinários e pela comunidade científica. Atualmente algumas alternativas são indicadas na tentativa de diminuição dos riscos de desenvolvimento de resistência às drogas em criações comerciais. Taninos condensados (TC) provenientes de forrageiras taniníferas ou de extratos de taninos (ET) produzidos a partir de cascas de árvores são adicionados ou suplementados na dieta de pequenos ruminantes com a finalidade de controlar os nematódeos gastrintestinais. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito direto dos ET provenientes do extrato de *Acacia mearnsii* (ETA) fornecidos por via oral a cordeiros naturalmente infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis*. Foram utilizados 20 cordeiros da raça Santa Inês, divididos em quatro grupos de cinco animais, alocados em quatro piquetes durante 60 dias, recebendo concentrado uma vez ao dia. Dois grupos receberam tanino altamente concentrado (TAC) na forma de extrato de *Acacia mearnsii* (1,6 g kg⁻¹ PV) por dois dias consecutivos no início do experimento (dias 1 e 2) e após trinta dias (dias 31 e 32), sendo dois grupos mantidos como controle não tratado. As contagens de OPG foram

realizadas duas vezes por semana e coproculturas, em datas estratégicas. Vinte e oito dias após a última administração do TAC todos os cordeiros foram abatidos. Um mês após o término do período experimental dois animais traçadores, livres de infecção parasitária, foram alocados em cada piquete, durante três semanas. Foi determinada a carga parasitária de todos os animais. O fornecimento do TAC foi associado à redução na contagem de OPG ($P < 0,01$) e carga parasitária no abomaso ($P < 0,01$). Não foi detectada diferença significativa na contagem de nematódeos do intestino delgado ($P > 0,05$) e na carga parasitária dos traçadores ($P > 0,05$). Os valores médios de OPG dos grupos tratados foram inferiores aos dos grupos controle, durante todo o período experimental. O efeito anti-helmíntico dos TC sobre nematódeos gastrintestinais foi evidenciado, ressaltando-se o potencial uso do TAC no controle alternativo das endoparasitoses em ovinos.

Palavras-chave: Nematódeos; Infecção natural; Anti-helmíntico; Taninos condensados.

POTENTIAL USES OF ACACIA TANNIN EXTRACT TO CONTROL GASTROINTESTINAL PARASITES IN SHEEP

ABSTRACT

The development of the anthelmintic resistant worm population has become a major practical problem in many countries. Since the end of the 1970's, when the first reports of anthelmintic resistance appeared, alternatives to reduce the risks of appearance the drug resistance have been studied. Condensed tannins (CT) have shown potential for alternative control of gastrointestinal nematodes in sheep. The objective of the present study was to investigate the direct effect of condensed tannin extracts (CTE) from *Acacia mearnsii* drenched to lambs naturally infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. Twenty Santa Inês lambs were divided into four groups and allocated to four paddocks with five animals each in a 60 days trial receiving concentrate once a day. Two groups were drenched with CTE of *Acacia mearnsii* (1.6 g kg⁻¹ BW) for two consecutive days at the beginning of the trial (days 1 e 2) and 30 days later (days 31 e 32) and the other two groups were maintained undrenched (control) throughout the trial. Faecal egg counts (FEC) were measured twice a week; coprocultures were made in strategic days. Twenty eight days after the cessation of tannin administration, all lambs were slaughtered to determine the worm burden. After one month of the end of the experimental period, two worm free tracers were allocated in each paddock for three weeks. Worm counts and female fecundity were determined for all animals. The CTE drenching was associated

with a significant reduction for FEC ($P < 0.01$); and worm burden in abomasum ($P < 0.01$), but not in small intestine ($P > 0.05$). The worm burden from tracers did not have significant difference ($P < 0.05$). The FEC values of treated groups were lower than controls values during the whole experiment. The results confirm the anthelmintic effects of CTE on gastrointestinal nematodes in lambs and demonstrate the potential use of acacia extract as alternative parasite control.

Key words: Nematodes; Natural infection; Anthelmintic; Condensed tannins.

5.1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas por parasitos gastrointestinais em ruminantes acarretam prejuízos de milhões de dólares ao mercado agropecuário mundial, a cada ano. Este impacto econômico deriva, não somente, das mortes e desempenhos inadequados originados por infecção parasitária, mas também dos gastos com profilaxia e tratamento. A rápida propagação dos relatos de cepas de nematódeos resistentes a todas as classes de anti-helmínticos em uso no controle parasitário de pequenos ruminantes, deve ser considerada como um aviso ao uso indiscriminado de drogas anti-helmínticas nos programas de controle parasitário (GEERTS e GRYSSELS, 2001).

Waller et al. (1996) e Van Wyk et al. (1999) demonstraram a prevalência de nematódeos resistentes aos anti-helmínticos em ovinos. Esses mesmos autores mencionam que países como África do Sul, Brasil, Paraguai e Uruguai terão futuramente, em suas criações de ovinos, relatos de resistência contra benzimidazóis, ivermectinas e levamisóis. Esta resistência é definida como perda de sensibilidade de uma população de parasitos anteriormente sensíveis à droga utilizada, transmitida geneticamente aos seus descendentes (KÖHLER, 2001).

O desenvolvimento de cepas de nematódeos resistentes aos anti-helmínticos (JACKSON, 1993) e a tendência dos últimos anos de mudança para sistemas de produção orgânica, aumentaram a demanda por sistemas alternativos de controle parasitário, os quais devem reduzir ou excluir o uso das drogas anti-helmínticas (ATHANASIADOU et al., 2000a).

A utilização de plantas forrageiras ou de extratos vegetais com alta concentração de TC são métodos alternativos para o controle das verminoses gastrintestinais, podendo diminuir o número ou a fecundidade das fêmeas, ou ainda a viabilidade dos ovos de nematódeos (NIEZEN et al., 1998b; HOSKIN et al., 2000; ATHANASIADOU et al., 2001a; MARLEY et al., 2003; NGUYEN et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do extrato de *Acacia mearnsii* sobre os parâmetros parasitológicos de ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Delineamento experimental

No dia anterior ao início do período experimental, vinte cordeiros da raça Santa Inês, naturalmente infectados, com quatro meses de idade e pesando 15 ± 3.6 kg foram divididos em quatro grupos de cinco animais, de acordo com PV e contagem de OPG. Os grupos foram aleatoriamente alocados em quatro diferentes piquetes, com área aproximada de 800 m² cada, homogeneamente divididos em pasto de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*. Dois grupos receberam extrato de acacia ($1,6 \text{ g kg}^{-1}$ PV) por dois dias consecutivos no início do experimento (dias 1 e 2) e após 30 dias (dias 31 e 32) e os outros dois grupos foram mantidos como controle não tratado com anti-helmíntico.

Os piquetes experimentais nunca haviam sido utilizados para alojar nenhum tipo de animal e foram experimentalmente contaminados com fezes de ovinos com infecção experimental monoespecífica por *H. contortus* ou *T. colubriformis*. Para a infecção dos doadores por *H. contortus* e *T. colubriformis*, foram utilizadas cepas isoladas no Departamento de Parasitologia - IB - UNESP, Botucatu-SP. A cepa de *H. contortus* apresentava multirresistência às drogas oxfendazol, levamisol, ivermectina e moxidectina (AMARANTE et al., 2004).

O período experimental foi de 60 dias. Durante a semana os animais permaneciam nos piquetes durante oito horas e durante a noite eram estabulados para fornecimento de concentrado (milho + farelo de soja), calculado semanalmente, com base no PV médio dos animais (2 % PV). Aos finais de semana, os cordeiros permaneciam estabulados, recebendo feno de Tifton-85 (*Cynodon* sp) *ad libitum* e concentrado. A dieta total fornecida aos animais apresentava aproximadamente 13 % de proteína bruta (PB).

Trinta dias após o término do período experimental descrito acima, dois ovinos, livres de infecção parasitária por nematódeos, foram alocados em cada piquete (2 cordeiros por piquete), durante três semanas. Estes animais foram utilizados como traçadores para investigar a contaminação das pastagens.

5.2.2. Técnicas parasitológicas

Amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto dos animais duas vezes por semana e processadas imediatamente para mensurar a

eliminação de ovos de nematódeos nas fezes. A contagem de OPG foi realizada segundo a técnica de Gordon e Whitlock modificada (UENO e GONÇALVES, 1994). Três coproculturas foram realizadas durante o período experimental (a cada 20 dias), sendo que as fezes foram incubadas durante 10 dias a 27 °C em câmara germinativa (UENO e GONÇALVES, 1994).

Para determinação da carga parasitária, foi realizada necropsia parasitológica. Foram isolados o abomaso e intestino delgado de todos os animais, sendo os nematódeos recuperados da digesta ou por lavagem e raspagem das respectivas mucosas. A estimativa da carga parasitária foi realizada utilizando-se alíquotas (em duplicata) de 10 % da digesta de todos os animais.

5.2.3. Peso e parâmetros hematimétricos

Os cordeiros foram pesados a cada duas semanas, durante a manhã, antes da alimentação. Semanalmente, foram colhidas amostras de sangue de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se frascos do tipo vacutainer com anticoagulante (heparina). Do sangue total, foram obtidos os valores de volume globular (VG) e hemoglobina.

5.2.4. Fonte de taninos condensados

Como fonte de TC foi utilizado o extrato solúvel de *Acacia mearnsii*, contendo 150 g de TC kg⁻¹ MS - (método HCl-Butanol, segundo PORTER et al., 1986). O TAC apresenta-se na forma de um pó fino, solúvel em água; o qual, no presente trabalho, foi fornecido aos animais na dose de 1,6 g kg⁻¹ PV (VO), após prévia diluição em água morna. Os animais receberam

aproximadamente 4,5 g TC dia⁻¹. Algumas moléculas de TC são sensíveis à oxidação a temperaturas de aproximadamente 100 °C (LARRAURI et al., 1997), por isso, as diluições foram realizadas em temperaturas de aproximadamente 37 °C, na qual o efeito anti-helmíntico dos TC foi mantido.

5.2.5. Análise estatística

Os dados referentes à contagem de OPG e carga parasitária foram analisados sob transformação logarítmica [$\log(x + 10)$] e posteriormente submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, USA).

5.3. RESULTADOS

Apenas larvas de *H. contortus* e *T. colubriformis* foram identificadas nas coproculturas realizadas com *pool* de fezes de todos os grupos, durante todo o período experimental (Tabela 4.1). Não foi observado efeito de piquete experimental sobre os parâmetros observados neste trabalho, também não foi observada interação significativa entre piquete vs tratamento ($P > 0.05$).

5.3.1. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Foi evidenciado efeito anti-helmíntico do TAC sobre a contagem de OPG dos ovinos que receberam tratamento por dois dias consecutivos com intervalo de 30 dias. Após uma semana do início do ensaio (dia 6), houve diferença significativa entre os valores de OPG dos animais dos grupos controle e tratado com TAC (respectivamente 992 e 76; EP = 8,3; $P < 0,05$),

sendo que esta diferença foi mantida durante todo o experimento (Figura 5.1). O valor médio de OPG do grupo tratado manteve-se abaixo de 1000 durante todo o período experimental.

Tabela 5.1- Porcentagem de helmintos identificada em coproculturas durante o período experimental com ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais e mantidos a campo durante 60 dias, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico (piquetes 1 e 3) e tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV), (piquetes 2 e 4)

Dia experimental	Grupos	<i>Haemonchus contortus</i> %	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> %
10	Controle	93	7
		70	30
	Tratado	63	37
		51	49
48	Controle	78	22
		71	29
	Tratado	68	32
		32	68
58	Controle	80	20
		72	28
	Tratado	69	31
		44	56

5.3.2. Carga parasitária

A carga parasitária recuperada do abomaso dos animais do grupo controle (não tratado) foi significativamente diferente ($P < 0,01$) da encontrada nos animais tratados com TAC, sendo que o número de nematódeos (*H. contortus*) identificados para cada grupo foi respectivamente de 367 e 132 (EP = 47,0). O número de *T. colubriformis* identificados no intestino delgado não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controle e tratado (respectivamente 3188 e 2400; EP = 429,0).

A quantidade média de *H. contortus* identificados segundo o sexo foi de 146 e 50 (EP = 18,1) machos e de 221 e 82 (EP = 31,9) fêmeas, respectivamente para animais dos grupos controle e tratado com TAC ($P < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os grupos, quando analisados os valores de machos e fêmeas de *T. colubriformis* ($P > 0,05$), sendo encontrados 1749 e 1311 (EP = 240,8) machos e 1439 e 1089 (EP = 194,6) fêmeas nos intestinos dos animais dos grupos controle e tratado, respectivamente (Figura 5.2).

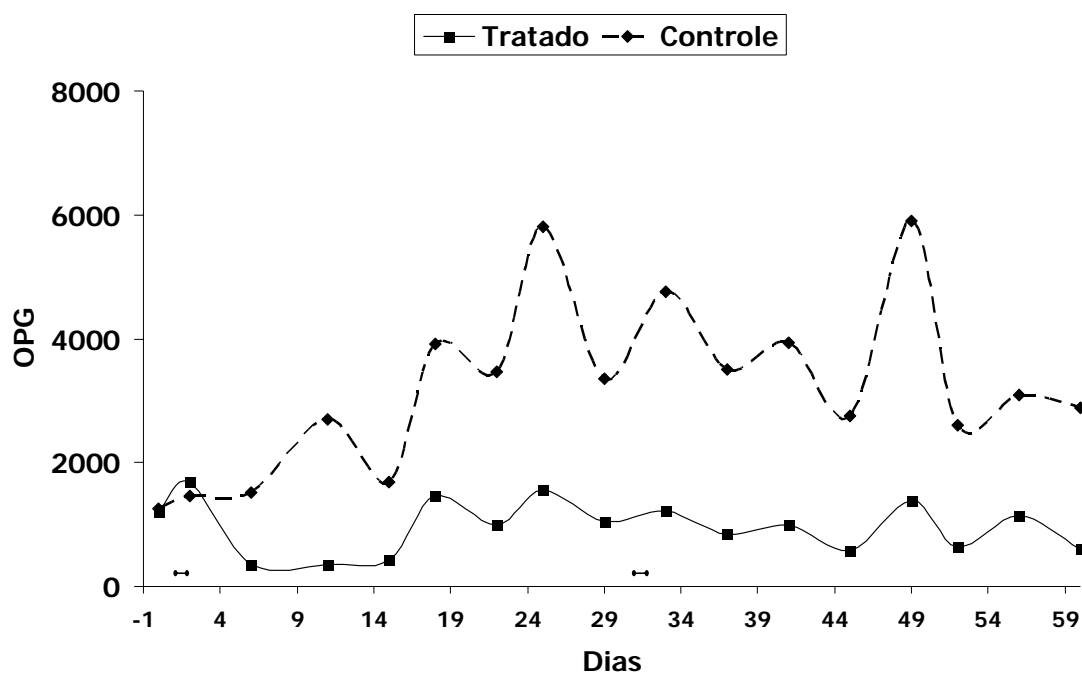


Figura 5.1- Variação da contagem de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG) em ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico e grupo tratado com extrato de acácia ($1,6 \text{ g kg}^{-1} \text{ PV}$). O símbolo (◐◑) indica os dias de tratamento

5.3.3. Peso corporal, ganho de peso e parâmetros hematimétricos

Não houve diferença significativa entre os valores de peso corporal e ganho de peso ($P > 0.05$) dos animais experimentais, sendo os valores de PV, ao dia zero de, 15,6 kg e 15,3 kg (EP = 1,25), respectivamente para os grupos controle e tratado. Ao final do período experimental (dia 58), o peso médio atingido foi de 22,5 kg para os animais do grupo controle e 23,2 kg para os do grupo tratado (EP = 0,86). A média do ganho de peso diário dos animais, durante os 60 dias experimentais, foi de 122 g d⁻¹ (EP = 42,8). O grupo controle apresentou ganho de 117 g d⁻¹, enquanto o ganho do grupo tratado foi de 130 g d⁻¹ (EP = 14, 3; $P > 0.05$).

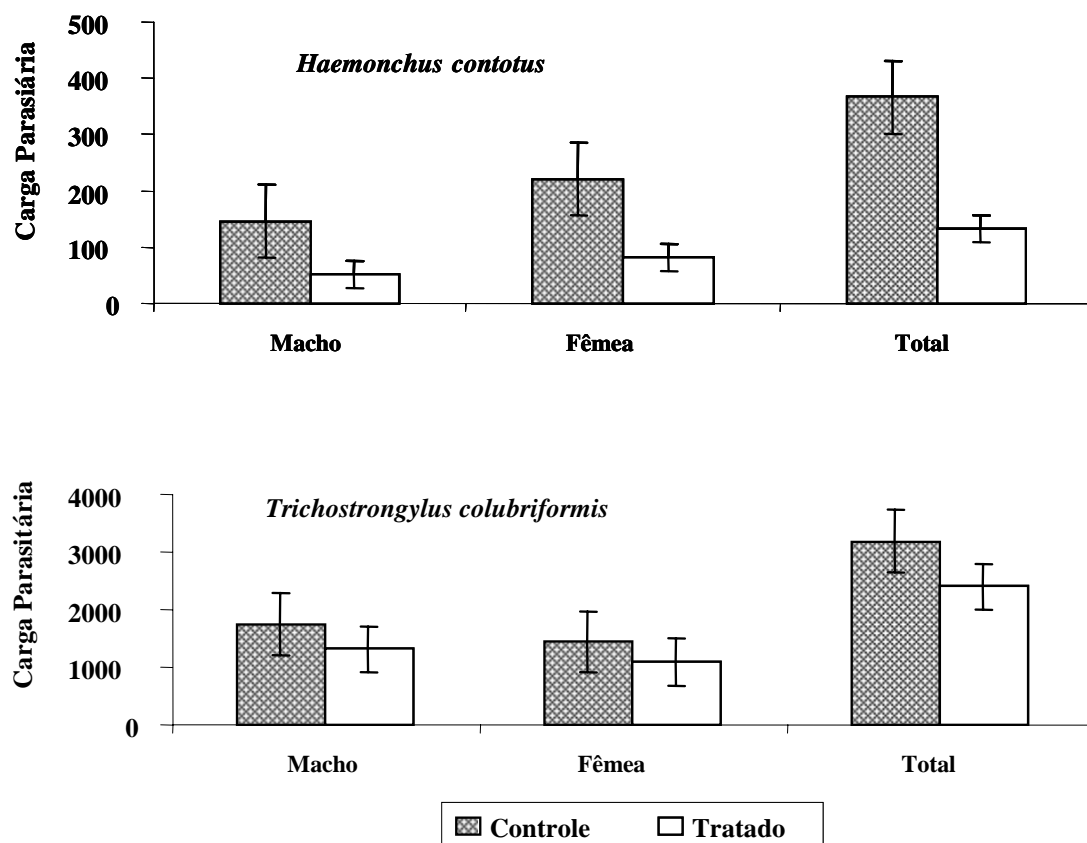


Figura 5.2- Carga parasitária identificada no abomaso e intestino delgado de ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico e grupo tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV)

Quanto aos parâmetros hematimétricos, o VG dos animais estudados foi afetado pelo tratamento ($P < 0,05$) nos dias experimentais 14, 21, 28 e 42; sendo os valores dos grupos tratado e controle, respectivamente para cada data e grupo, de 30 e 34 (EP = 1,3), 32 e 35 (EP = 1,2), 29 e 32 (EP = 0,8) e 28 e 32 (EP = 0,8).

Nos dias experimentais 7, 35, 49 e 56, no entanto, não foi evidenciada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as médias de VG, sendo identificados os valores de 30 e 33 (EP = 1,1), 28 e 30 (EP = 0,9), 29 e 31 (EP = 0,9) e 31 e 31 (EP = 0,8), respectivamente para cada data e para os grupos controle e tratado. A concentração de hemoglobina (g L^{-1}) não foi afetada ($P > 0,05$) pelo tratamento com TAC, durante o período experimental (Figura 5.3).

5.3.4. Animais traçadores

A carga parasitária identificada na digesta dos ovinos traçadores é apresentada na Tabela 5.2. O número médio da carga parasitária total de *H. contortus* identificada nos animais mantidos em piquetes, anteriormente utilizados pelos animais do grupo controle (não tratado), foi 28,3 nematódeos e dos animais alocados em piquetes anteriormente utilizados por animais do grupo tratado com TAC foi 16,3 nematódeos (EP = 8,71).

Os valores médios de carga parasitária intestinal (*T. colubriformis*) dos animais foram de 138,0 e 74,8 nematódeos (EP = 8,18), respectivamente para animais alocados em piquetes previamente utilizados por ovinos dos grupos controle (não tratado) e tratado com extrato de acácia.

Apesar dos animais traçadores alocados nos piquetes anteriormente

utilizados pelos animais tratados com TAC apresentarem um valor médio de carga parasitária de abomaso 42% menor e de carga parasitária intestinal 45% menor que o do grupo tratado, não foi evidenciada diferença estatística nestes parâmetros ($P > 0.05$).

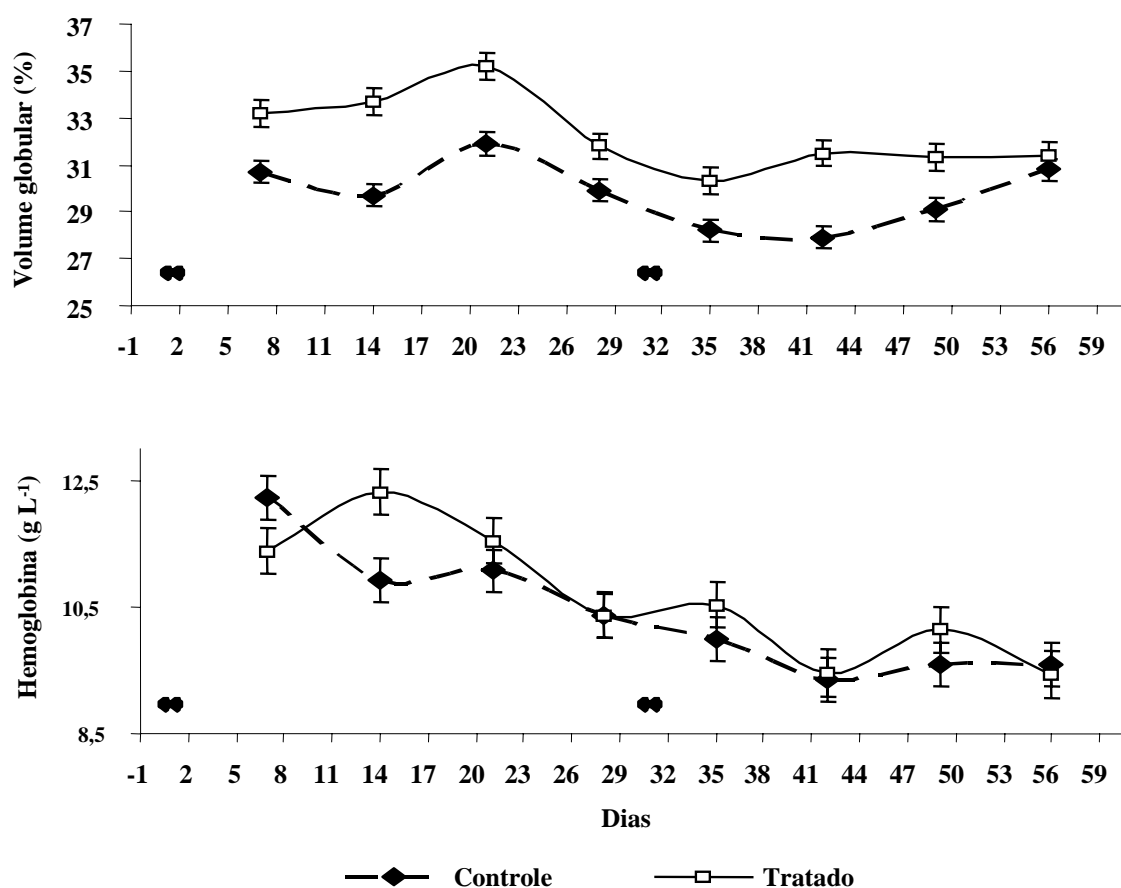


Figura 5.3- Valores de volume globular e hemoglobina de ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, divididos em grupo controle (não recebeu anti-helmíntico) e tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV). O símbolo (●) indica os dias de tratamento

Tabela 5.2- Carga parasitária dos ovinos traçadores (n = 8) alocados em piquetes previamente utilizados por ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, durante 60 dias, divididos em grupo controle não tratado com anti-helmíntico (piquetes 1 e 2) e grupo tratado com extrato de acácia (1,6 g kg⁻¹ PV)

Nematódeos		Piquetes previamente utilizados		EP ¹
		Controle	Tratado	
<i>Haemonchus contortus</i>	Macho	14,5	4,1	8,65
	Fêmea	13,8	10,0	8,74
	Total	28,3	16,3	8,71
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Macho	55,9	49,2	8,28
	Fêmea	82,4	32,1	8,43
	Total	138,0	74,8	8,18

¹ EP = erro padrão da média

5.4. DISCUSSÃO

No presente estudo, evidenciou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre valores de OPG dos animais dos grupos controle e tratado com TAC, durante a fase de estabelecimento da infecção parasitária (primeiro mês), assim como, após o estabelecimento da infecção parasitária (segundo mês), como visto na Figura 5.1.

Os resultados citados acima são confirmados por Athanasiadou et al. (2000a), quando estudando o fornecimento de fontes de TC, durante 10 semanas, a ovinos infectados por *T. colubriformis*. Estes autores demonstraram redução nos valores de OPG durante as duas fases da

infecção parasitária, ou seja, antes e depois da expressão de resposta imunológica do hospedeiro contra os parasitos.

Em muitos experimentos, o efeito anti-helmíntico dos TC é avaliado comparando-se plantas forrageiras com e sem a presença de taninos. Alguns destes comprovam a ação dos TC sobre nematódeos gastrointestinais (HOSKIN et al., 2000; MARLEY et al., 2003; NGUYEN et al., 2005). Entretanto, a concentração de TC determinada nestes experimentos pode sofrer variações no decorrer do mesmo ano, segundo a estação climática, região geográfica ou estágio fisiológico da planta.

Conseqüentemente, as variações na concentração de TC contribuem para que alguns estudos não comprovem a ação anti-helmíntica de algumas plantas taníferas (NIEZEN et al., 1998a e 1998b), embora, segundo os relatos de Butter et al. (2000) o efeito dos taninos sobre os parasitos apenas seria evidenciado quando as fontes de TC fossem suplementadas às dietas com baixa concentração protéica.

Estudos desenvolvidos com uso dos extratos de quebracho ou acácia (ATHANASIADOU et al., 2001a; MINHO et al., 2005) indicam que se pode minimizar o problema da variação da concentração de TC nas dietas fornecidas aos animais, já que a concentração nestas fontes comerciais é constante durante todo o ano.

A concentração de TC ideal em leguminosas forrageiras, geralmente varia entre 20 g e 40 g kg⁻¹ MS, a qual permite aos taninos ligarem-se às proteínas dietéticas durante a mastigação protegendo-as do ataque

bacteriano no rúmen (NGUYEN et al., 2005). A dose ideal do extrato de quebracho para utilização em dietas, a fim de se evitarem efeitos indesejáveis aos ovinos é de aproximadamente 1,5 g quebracho. kg⁻¹ PV (HERVÁS et al., 2003).

O ganho de peso médio dos ovinos durante este estudo (122 g d⁻¹) está dentro do esperado para animais mantidos em sistema de produção semi-intensivo (SELAIVE-VILLARROEL e SOUZA JÚNIOR, 2005).

No presente estudo, a média de peso vivo do grupo tratado com TAC deveria ser superior a do grupo controle, já que animais parasitados apresentariam menor ganho de peso (ATHANASIADOU et al., 2000a; BUTTER et al., 2000). Entretanto, o curto período experimental, a baixa contaminação das pastagens e a quantidade de proteína suplementada aos animais (manutenção) interferiram nos resultados de ganho de peso. Por outro lado, a similaridade nos valores de ganho de peso dos grupos não evidencia interferência no desempenho dos animais tratados, assim como não demonstram efeitos nutricionais deletérios causados pelo fornecimento do TAC.

O efeito anti-helmíntico do TAC sobre *H. contortus* foi evidenciado e confirmado pelos resultados de carga parasitária no abomaso, diminuindo assim a contaminação das pastagens (e conseqüentemente a reinfecção dos cordeiros), evidenciada pelos baixos valores de OPG nos animais tratados, durante todo o período experimental. Os valores de carga parasitária dos ovinos traçadores, que permaneceram em pastagens anteriormente ocupadas por animais dos grupos controle ou tratado, não apresentaram diferença

significativa ($P > 0,05$). Porém, alguns fatores podem ter contribuído para este acontecimento, como as condições climáticas, com chuvas torrenciais durante a fase experimental, e a inclinação das pastagens, fatos estes que podem ter colaborado para a descontaminação das pastagens e que podem explicar os valores de carga parasitária identificados em ambos os grupos.

Os valores da carga parasitária de *H. contortus* identificados na digesta dos animais traçadores foram pequenos, quando comparados aos de *T. colubriformis*, apesar do número de ovos produzidos pelas fêmeas de *Haemonchus* spp. ser aproximadamente 50 a 100 vezes maior que o produzido pelas fêmeas de *Trichostrongylus* spp. (UENO E GONÇALVES, 1994), evidenciando o efeito dos TC sobre a carga parasitária dos nematódeos parasitos do abomaso.

Outra explicação seria que ovinos da raça Santa Inês são considerados resistentes a infecções por *H. contortus* (BRICARELLO et al., 2004), sendo esta outra explicação para os resultados obtidos neste trabalho. Em estudos com ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, o valor médio de OPG proveniente de *H. contortus* encontrado por Amarante et al. (2004) foi significativamente menor em ovinos da raça Santa Inês quando comparado aos valores das raças Suffolk e Ile de France, porém não foi evidenciada diferença entre as raças quanto à susceptibilidade a *T. colubriformis*.

A raça Santa Inês criada no Brasil possivelmente descenda de ovinos submetidos a longos períodos de um processo natural de seleção de animais resistentes ao *H. contortus* (AMARANTE et al., 1997a). Os valores de carga

parasitária de *H. contortus* identificados neste trabalho corroboram com os relatos de resistência ou tolerância da raça Santa Inês a esta espécie de nematódeo. No presente trabalho, os resultados de VG e concentração de hemoglobina dos animais do grupo controle (não tratados), mantidos a pasto por 60 dias, evidenciam a tolerância desta raça às infecções por nematódeos gastrintestinais, corroborando com os trabalhos anteriormente citados.

5.5. CONCLUSÕES

A ação anti-helmíntica do extrato de acácia foi evidenciada, indicando que o uso dos TC nos controles alternativos da haemoncose ovina deve ser estudado e testado em regiões com problemas de resistência às drogas anti-helmínticas ou em fazendas que incorporaram o sistema de produção orgânica. Entretanto, mais estudos tornam-se necessários para o desenvolvimento de um produto comercial baseado no extrato de acácia, o qual poderia ser utilizado em grande escala na cadeia de produção de ovinos.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A.F.T.; BAGNOL JUNIOR, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.73, p.89-104, 1997a.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally

acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, p. 91-106, 2004.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30, p.1025-1033, 2000a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effect of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.99, p.205-219, 2001a.

BRICARELLO, P.A.; GENNARI, S.M.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; VAL, C.M.S.L.; GONÇALVEZ DE GONÇALVEZ, I; ECHEVERRIA, F.A.M. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.51, p.75-83, 2004.

BUTTER, N.L.; DAWSON, J.M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P.J. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.134, p.89-99, 2000.

GEERTS S. AND GRYSSELS B. Anthelmintic resistance in human helminths: a review. **Tropical Medicine and International Health**, London, v.6, n.11, p. 915-921, 2001.

HERVÁS, G.; PÉREZ, V.; GIRÁLDEZ, F.J.; MANTECÓN A.R.; ALMAR, M.M.; FRUTOS, P. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.129, p. 44-54, 2003.

HOSKIN, S. O., WILSON, P. R., BARRY, T. N., CHARLESTON, W. A. G. & WAGHORN, G. C. Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). **Research in Veterinary Science**, London, v. 68, p. 223-

230, 2000.

JACKSON F. Anthelmintic resistance - the state of play. [The British Veterinary Journal](#), London, v.149, p.123-38,1993.

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

LARRAURI JA, RUPEREZ P & SAURA CALIXTO F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.45, p. 1390–1393, 1997.

MARLEY CL, COOK R, KEATINGE R, BARRETT J & LAMPKIN NH. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.112, p.147–155, 2003.

MINHO, A.P; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on *Haemonchus contortus* in sheep experimentally infected In: BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE ANNUAL MEETING, York, 2005. In vitro and analytical techniques; **proceedings...** York: University of York, 2005.

NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; WAGHORN, G.C.; CHARLESTON, W.A.G. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.80, p.15-27, 1998a.

NIEZEN JH, WAGHORN GC & CHARLESTON WAG. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.78, p.13–21, 1998b.

NGUYEN T.M.; BINH D.V.; ORSKOV E.R. Effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. **Animal Feed Science and Technology**, Washington, v.121, p.77-87, 2005.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223-230, 1986.

SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; SOUZA JÚNIOR, F. A. de. Crescimento e características de carcaça de cordeiros mestiços Santa Inês e Somalis x SRD em regime semi-intensivo de criação. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, n. 5, p.948-952, set./out., 2005

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166p.

WALLER PJ, ECHEVARRIA F, EDDI C, MACIEL S, NARI A & HANSEN JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: general overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 181-187, 1996.

VAN WYK JA, STENSON MO, VAN DER MERWE JS, VORSTER RJ; VILJOEN G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 66, p. 273-284, 1999.

6. EFEITO DIRETO DOS TANINOS CONDENSADOS SOBRE *Haemonchus contortus* EM OVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO

O parasitismo gastrintestinal em ovinos reduz a eficiência de produção, originando efeitos indesejáveis no bem estar animal. Programas de controle de parasitos gastrintestinais baseados somente no uso de drogas anti-helmínticas estão falhando, devido ao aparecimento do fenômeno de multirresistência às drogas, portanto estratégias de controle alternativo são necessárias. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial efeito anti-helmíntico dos taninos condensados sobre *Haemonchus contortus* em ovinos experimentalmente infectados e as conseqüências nutricionais sobre os animais. Vinte ovinos livres de infecção parasitária foram divididos em cinco grupos de quatro animais. Os grupos GI a GIV foram experimentalmente infectados com 5000 larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus*. O GI foi mantido como controle infectado e o GV como controle não infectado. Vinte e oito dias pós-infecção (p.i.) os animais foram tratados com fontes de TC: o GII suplementado com 350 g de sorgo taninífero, durante sete dias; os grupos GIII e GIV receberam extrato de *Acacia mearnsii* (1,6 g de extrato. kg⁻¹ de peso vivo), durante um ou dois dias, respectivamente. No 36º dia p.i. os animais dos grupos I a IV foram abatidos. Não foi detectada diferença significativa no número de ovos por grama de fezes e carga parasitária entre os grupos tratados ($P > 0,05$). Porém a viabilidade dos ovos de helmintos do GIV foi 35% da determinada no

GI. O número L3 recuperado das coproculturas do GII e GIV foi 50% menor que o do GI. O uso de TC na dieta animal não afetou o peso corporal e os parâmetros hematimétricos dos animais ($P > 0,05$). O uso dos TC pode ser promissor na descontaminação das pastagens, porém mais estudos são necessários para sua indicação no controle da haemoncose ovina.

Palavras-chave: Extrato de acácia, anti-helmíntico, haemoncose, experimento *in vivo*.

DIRECT ANTHELMINTIC EFFECTS OF CONDENSED TANNINS ON *Haemonchus contortus* IN SHEEP EXPERIMENTALLY INFECTED

ABSTRACT

Sheep gastrointestinal parasitism reduces the efficiency of production and has adverse effects on their welfare. Gastrointestinal parasite control programs based on chemotherapy are failing because of increased anthelmintic resistance; thus, alternative controls strategies are necessary. The aims of the present study were to investigate the potential anthelmintic effects of condensed tannins on experimentally infected sheep and the nutritional consequences on animals. Twenty helminth-free lambs were divided into five groups of four animals. Groups I to IV were infected artificially with 5000 third stage larvae of *Haemonchus contortus*. Group I was the infected control and the group V was the uninfected control. Twenty-eight days post-infection lambs from GII were supplemented with tanniferous sorghum (350 g day⁻¹ animal⁻¹, during seven days); GIII were drenched with *Acacia mearnsii* extract (rich in condensed tannins) for one day and GIV during two days (1,6 g extract kg⁻¹ body-weight). At 36^o day post-infection animals from GI to GIV were slaughtered. The treatments did not cause significant reduction of the faecal egg counts and worm burden ($P > 0.05$). But the egg viability from GIV was 35% of the viability from GI and the number of infective larvae recuperated from GII and GIV were 50% less than the GI number at the last day of treatment. The use of condensed tannins on diet did not cause significant difference on body-weight and blood parameters

($P > 0.05$). The use of condensed tannins (CT) could be a promising alternative source to reduction the pasture contamination but more studies are necessary to indicate the CTs to alternative control of *H. contortus* infection.

Key words: Acacia extract, anthelmintic, haemoncosis, *in vivo* experiment.

6.1. INTRODUÇÃO

Ovinos mantidos a campo invariavelmente são infectados por parasitos gastrintestinais. Apesar destas infecções por nematódeos desencadearem uma reação imunogênica nos ovinos, esta resposta é influenciada por vários fatores, como a idade, raça e sexo do hospedeiro e ainda pela espécie, número de parasitos e primo-infecção (KNOX, DENG e NOLAN, 2003). De maneira geral, os cordeiros e fêmeas no perí-parto são mais susceptíveis às verminoses (AMARANTE et al., 1992).

Estas infecções parasitárias são freqüentemente correlacionadas a significativa diminuição da produtividade, sendo os helmintos gastrintestinais a principal causa de prejuízo econômico nas criações animais (YU et al., 2000). Dentre essas perdas estão às diminuições em: ganho de peso, produção de leite, desempenho reprodutivo, quantidade e qualidade da lã, além de alteração na composição corporal do animal (SYKES, 1994).

O controle das doenças parasitárias é baseado principalmente em tratamentos repetidos dos rebanhos com drogas anti-helmínticas. Porém, a utilização freqüente dos anti-helmínticos provocou o fenômeno da multirresistência às drogas. Este fato aliado à tendência de mudança para sistemas de produção orgânicos requer alternativas para redução ou, até mesmo, a substituição das drogas anti-helmínticas no controle parasitário (ATHANASIADOU et al., 2000a).

Plantas com propriedades anti-helmínticas são conhecidas e utilizadas em todo o mundo há muitos anos, porém poucas pesquisas foram realizadas

para validar seu uso, principalmente em medicina veterinária (MAX et al., 2005). A suplementação dos ovinos com taninos condensados (TC), oriundos de plantas forrageiras ou dos extratos de quebracho e acácia, vêm sendo utilizados no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos, entre eles *Trichostrongylus colubriformis* (ATHANASIADOU et al., 2000a e 2000b) e *Haemonchus contortus* (NIEZEN et al., 2002a).

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a ação direta dos TC provenientes do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*) e do sorgo taninífero (*Sorghum bicolor*) sobre *H. contortus* em ovinos experimentalmente infectados. Para isso foram avaliados: (1) os valores de OPG; (2) a carga parasitária; (3) o número de L3 recuperadas de coproculturas; (4) a viabilidade dos ovos de helmintos, ou seja, desenvolvimento até L1. Assim como seu efeito sobre os parâmetros de produção animal: PV, peso de carcaça e consumo voluntário.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Delineamento experimental

Inicialmente foram mantidos animais doadores com infecção parasitária monoespecífica para obtenção das L3. Esses animais foram mantidos até que o número de L3 necessários para infecção dos animais experimentais fosse atingido.

Os vinte cordeiros utilizados no período experimental foram mantidos

estabulados, recebendo feno e concentrado. Dezesesseis animais foram infectados com 5000 L3 de *H. contortus*, e quatro animais foram mantidos como controles livres de infecção, os animais foram mantidos em unidades experimentais com quatro animais em cada baia, porém sem grupo definido.

Um dia antes do início dos tratamentos, os animais foram divididos, segundo número de OPG e peso corporal. Delineamento dos grupos (Tabela 6.1): GI controle infectado; GII suplementado com sorgo, GIII recebeu extrato de acácia (TAC), por um dia; GIV recebeu TAC, durante dois dias e GV controle não infectado.

Tabela 6.1- Delineamento experimental do ensaio realizado com 20 ovinos da raça Santa Inês. Cordeiros divididos em cinco grupos de quatro animais: controle infectado (Controle infect), tratado com sorgo taninífero (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e grupo controle não infectado (Não infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus*

Grupos	Infecção (DPI = 0)	Fontes de TC (DPI=28 a 34)	DPI = 36
GI - Controle infect	<i>H.contortus</i>	-	Abate
GII - Sorgo	<i>H.contortus</i>	Sorgo	Abate
GIII - TAC 1X	<i>H.contortus</i>	TAC 1X [#]	Abate
GIV - TAC 2X	<i>H.contortus</i>	TAC 2X ^{##}	Abate
GV - Não infect	Não Infectado	-	Abate

DPI = Dias pós-infecção

TC = fonte de tanino condensado

[#]TAC foi fornecido no 28º ou ^{##} no 28º e 29º DPI.

Os tratamentos tiveram início 28 dias pós-infecção (p.i.), sendo o sorgo suplementado durante sete dias e o TAC administrado por um ou dois dias VO. Foi realizado o acompanhamento do número OPG de todos os grupos

experimentais. Durante a semana de tratamento com TC foram realizadas quatro culturas de fezes e testes de viabilidade de eclosão dos ovos de helmintos, para cada grupo experimental, em dias estratégicos (0, 2, 5 e 7 dias pós-tratamento).

Nos últimos cinco dias de tratamento metade dos animais ($n = 2$ tratamento⁻¹) foi alocada em gaiolas metabólicas para avaliação do consumo voluntário dos animais. Foram aferidos os pesos das sobras de concentrado e feno nas baias e gaiolas, assim como o total de fezes produzidos pelos animais e recuperados nas gaiolas. O abate dos animais ocorreu nove dias após o início dos tratamentos com TC para realização de necropsia parasitológica.

6.2.2. Fontes de taninos condensados

Com base em análises prévias para determinação das concentrações de TC (método HCl-Butanol;segundo PORTER et al., 1986) dos insumos e posteriores testes de toxicidade *in vivo* feitos nos animais, foram selecionados o sorgo taninífero (*Sorghum bicolor*), com 2% de TC e o extrato de *Acacia mearnsii* (TAC), com 15% de TC.

6.2.3. Animais

Foram utilizados 20 cordeiros da raça Santa Inês, com idade entre dois e três meses, mantidos estabulados até o desmame e livres de infecção parasitária até o início dos trabalhos.

6.2.4. Larvas infectantes

Foram utilizadas larvas de *H. contortus* obtidas de dois cordeiros doadores com infecção monoespecífica. As fezes obtidas desses doadores foram cultivadas para obtenção das L3 (técnica de Roberts e O'Sullivan modificada, segundo UENO e GONÇALVES, 1994). As larvas obtidas das culturas foram mantidas em temperatura ambiente e utilizadas antes de completarem 21 dias de estocagem.

Para infecção dos ovinos doadores foram utilizadas L3 de *H. contortus* isoladas no Departamento de Parasitologia - IB - UNESP, Botucatu, no ano de 2001, de ovinos provenientes do município de Pratânia-SP. Nessa propriedade, *H. contortus* apresenta resistência múltipla a vermífugos de amplo-espectro - oxfendazol, levamisol, ivermectina e moxidectina (AMARANTE et al., 1992; AMARANTE et al., 2004).

6.2.5. Dieta experimental

Os animais receberam feno de gramínea (*Cynodum* sp.) e concentrado (milho + farelo de soja) na proporção 50%-50%, dieta total com 13% de PB. As quantidades foram fornecidas segundo o NRC 1985, para a faixa etária e ganho de peso diário de aproximadamente 150 g por animal. O concentrado oferecido aos animais foi dividido e fornecido duas vezes ao dia. Foram feitos ajustes semanais de cálculo da dieta após a pesagem dos animais.

Os cordeiros do grupo tratado com sorgo receberam um total de 350 g de sorgo taninífero dia⁻¹, o qual foi adicionado ao concentrado (dieta basal) fornecido aos animais, durante sete dias, o total de TC na dieta foi de

aproximadamente 7 g de TC animal⁻¹ dia⁻¹. O TAC foi fornecido via oral individualmente aos animais, sendo previamente pesado e diluído em aproximadamente 50 mL de água morna (37 °C). Após diluição, o TAC foi administrado aos animais, por via oral, com auxílio de seringa, na dose de 1,6 g kg⁻¹ PV, durante um ou dois dias, isso corresponde a aproximadamente 7,2 g de TC (dose para animal de aproximadamente 30 kg).

6.2.6. Técnicas parasitológicas

As amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto de todos os animais. Os valores de OPG foram determinados segundo a técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada, segundo Ueno e Gonçalves (1994) e realizada semanalmente até o 21º dia p.i., duas vezes por semana do 21º ao 28º dia p.i. e diariamente durante o fornecimento dos TC.

Foram realizadas coproculturas para cada grupo experimental, utilizando-se um *pool* de fezes de todos os animais do grupo, utilizando-se a mesma quantidade de fezes por *pool*, padronizada em 25 g. As fezes foram cultivadas para obtenção e contagem das L3, para isto, foi utilizado a técnica de Roberts e O'Sullivan modificado, segundo Ueno e Gonçalves (1994). As L3 foram recuperadas em volumes idênticos (100mL) e separadas por grupo; para determinação do número de L3 g⁻¹ de fezes em cada tratamento (LPG). O teste de viabilidade dos ovos de nematódeos recuperados nas fezes foi realizado logo após o exame de contagem de OPG. As fezes dos animais de cada grupo, já diluídas em solução hipersaturada de NaCl (30%) foram reunidas em um único *pool*. A solução foi passada e lavada em duas peneiras de 196 e 38 µm respectivamente. O resíduo com os ovos retidos na peneira

de 38 μm foi transferido para um tubo de ensaio.

O resíduo de cada grupo foi dividido em vários frascos devidamente identificados, contendo 1/5 de resíduo de fezes peneiradas e 3/5 de solução hipersaturada de NaCl. Os tubos foram centrifugados à 2000 xg, durante três minutos. O 1/5 do tubo correspondente ao sobrenadante foi transferido para outro tubo e diluído em água para retirar o sal residual. Essa operação de lavagem foi repetida três vezes, sendo que em cada uma o precipitado (1/5 do volume inferior do tubo) foi isolado, cada lavagem foi realizada com auxílio de centrifugação à 2000 xg, durante três minutos. As lavagens são necessárias para retirada do excesso de NaCl, o qual pode interferir no desenvolvimento dos ovos⁴.

Após a última lavagem os ovos de helmintos recuperados e diluídos na solução aquosa foram transferidos para uma placa de Petri e incubados em estufa à 25 °C por 24 h. Após este período, com auxílio de um microscópio óptico (aumento 10x), foram contadas 100 estruturas e identificadas em ovos ou L1. O número de L1 identificados em relação as 100 estruturas contadas foi determinado como o resultado de viabilidade dos ovos de nematódeos.

As análises de contagem de L3 recuperadas por grupo experimental, assim como o teste de viabilidade dos ovos de helmintos foram feitas em dias estratégicos a partir do início dos tratamentos com TC (dias: 0, 2, 5 e 7).

⁴ JACKSON, F. Protocolo do laboratório de parasitologia do Moredun Research Institute. Comunicação pessoal. (setembro, 2004).

Dois dias após o término do fornecimento dos TC, todos os grupos, com exceção do controle não infectado, foram abatidos. Após o abate foi removido o abomaso de todos os animais (com as extremidades dos órgãos devidamente amarradas). O conteúdo foi removido e duas alíquotas (10% do volume total) foram obtidas. Foi determinada a carga parasitária de cada animal e feita a classificação dos helmintos adultos por sexo.

6.2.7. Peso e parâmetros hematimétricos

Os ovinos foram pesados uma vez por semana. A cada 15 dias foram colhidas amostras de sangue de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se frascos do tipo vacutainer com anticoagulante (heparina). Do sangue total foram obtidos os valores de volume globular (VG) e hemoglobina.

6.2.8. Análise estatística

Os dados referentes à contagem de OPG foram analisados sob transformação logarítmica [$\log(x + 10)$]. Os efeitos do TAC sobre os parâmetros de contagem de OPG, L3 recuperadas, viabilidade dos ovos e carga parasitária foram analisados pelo modelo linear geral (GLM) utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, USA). Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

O modelo estatístico utilizado para análise de variância foi $Y_i = \mu + T_i + e_i$, onde Y_i corresponde à variável dependente; μ , à média geral; T_i , ao efeito dos tratamentos ($i = 1$ a 5) e e_i , ao resíduo.

6.3. RESULTADOS

Para facilitar a compreensão utilizaremos as siglas: GI (controle infectado); GII (recebeu sorgo taninífero); GIII (recebeu TAC, uma vez); GIV (recebeu TAC, duas vezes) e GV (controle não infectado).

6.3.1. Peso vivo e peso de carcaça

No 21º dia experimental, quando da divisão dos grupos para início dos tratamentos, os pesos (PV) médios dos cordeiros, em quilos, para os respectivos grupos eram: GI 14,94; GII 15,60; GIII 15,80; GIV 15,27 e GV 15,45; EP: 0,737 ($P < 0,05$).

Não foi detectada diferença significativa entre os grupos durante todo o período experimental, sendo as médias dos valores de peso (kg), quando da última pesagem, antes do abate de: GI 19,37; GII 20,25; GIII 17,75; GIV 18,38 e GV 20,0; EP: 1,454 ($P < 0,05$). A Figura 6.1 ilustra a distribuição dos pesos durante o período experimental.

No dia do abate, após jejum de sólidos (aproximadamente 22 h) os valores de peso (kg) obtidos foram: GI 18,68; GII 19,67; GIII 17,57 e GIV 17,68; EP: 1,604 ($P < 0,05$), o controle não infectado não foi abatido. A Figura 6.2 ilustra as médias dos valores de pesos dos animais ao abate e das suas respectivas carcaças.

6.3.2. Volume globular e hemoglobina

Os valores de VG e hemoglobina não apresentaram diferença significativa durante todo o período experimental. Os valores médios de VG (%) dos animais, segundo os grupos experimentais, detectados na última semana do ensaio foram: GI

26,0; GII 27,0; GIII 27,0; GIV 29,25 e GV 30, 5; EP: 1,31 ($P > 0,05$).

Para hemoglobina (g dL^{-1}) os valores detectados na última semana foram: GI 9,54; GII 10,53; GIII 8,97; GIV 9,93 e GV 10,14; EP: 0,45 ($P > 0,05$). Nas Figuras 6.3 e 6.4 estão demonstrados os valores de VG e hemoglobina, respectivamente, durante todo o período experimental.

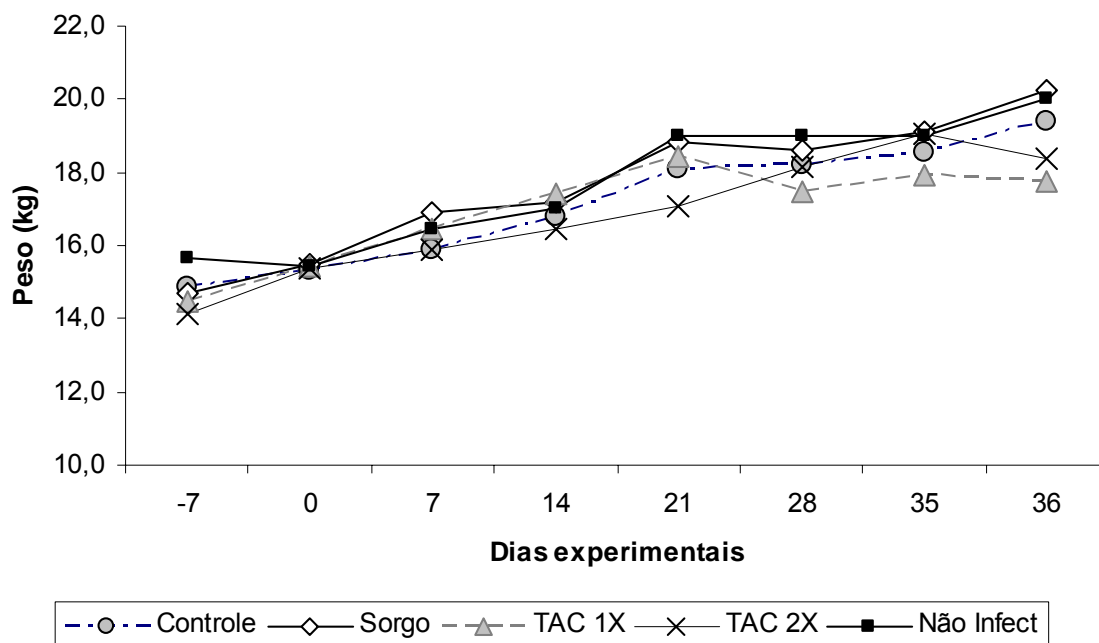


Figura 6.1- Peso médio dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia 0

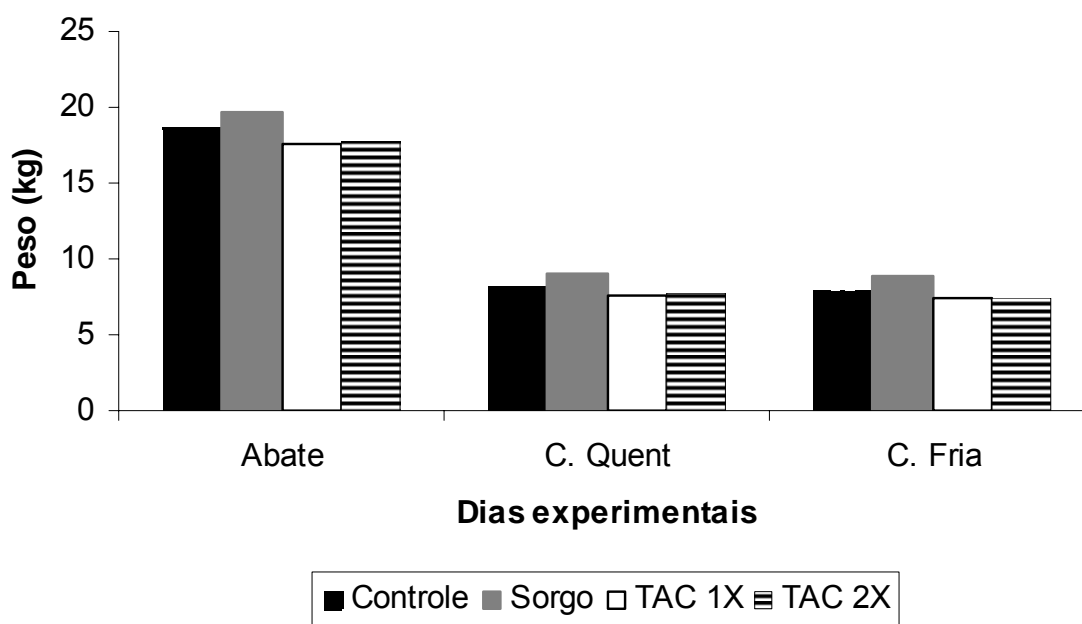


Figura 6.2- Peso médio ao abate dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e das respectivas carcaças quente (C. quente) e fria (C. fria). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* e abatidos 36 dias após a infecção

6.3.3. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Não houve diferença significativa entre os grupos infectados com *H. contortus* e tratados com diferentes fontes de TC ($P > 0,05$). Os valores médios de OPG, por grupo infectado, no último dia experimental (nove dias após início do fornecimento de TC) foram: GI 4922; GII 1360; GIII 4615 e GIV 1164 (EP: 7,65). Na Figura 6.5 estão demonstrados os valores de OPG durante todo o período experimental. A porcentagem de redução no número de OPG do GIV em relação ao GI, no 36º dia p.i., atingiu 35%.

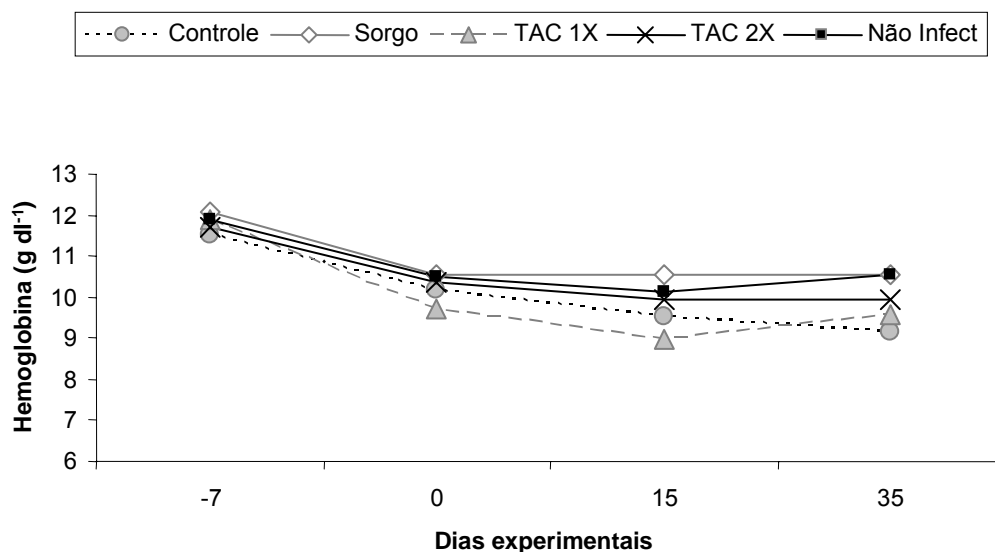


Figura 6.3- Valores médios do volume globular de cada grupo (4 animais grupo⁻¹), durante o período experimental. Grupos: controle infectado (Controle), tratado com sorgo (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero

6.3.4. Carga parasitária

As médias foram separadas em: carga parasitária total; total de fêmeas e total de machos. Nenhuma das médias analisadas apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), sendo as médias das cargas parasitárias totais: GI 1130; GII 877,5; GIII 1110; GIV 835 (EP: 8,15). A média de machos por grupo foi: GI 437,5; GII 395; GIII 467,5; GIV 330 (EP: 8,11). Na Tabela 6.2 estão ilustrados os números de carga parasitária de todos os animais experimentais.

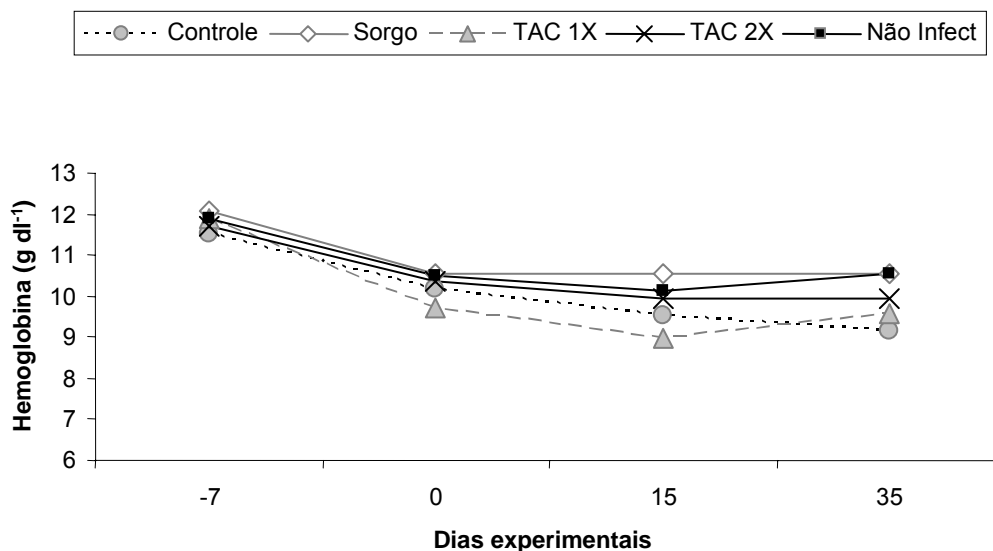
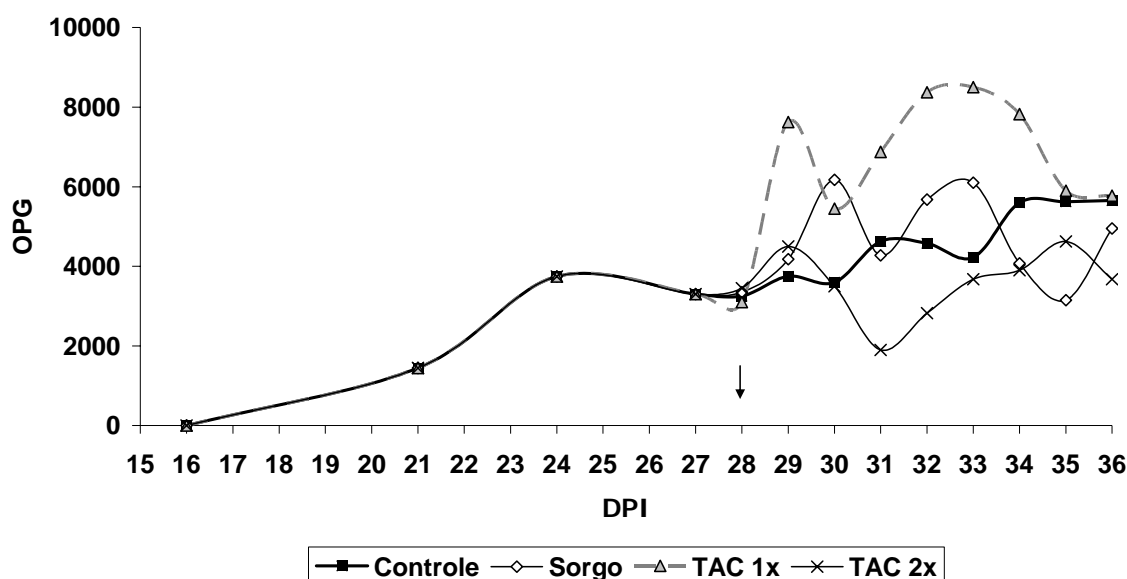


Figura 6.4- Valores médios de hemoglobina (g dL^{-1}) dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero

6.3.5. Número de L3 e viabilidade dos ovos de helmintos

Como apenas um *pool* de cada tratamento foi analisado em cada dia estratégico durante o fornecimento dos taninos condensados (dias: 0; 2; 5 e 7), os resultados não sofreram análise estatística. Entretanto pode-se verificar uma queda considerável nos valores de L3 recuperadas e de L1 identificadas em todos os grupos que receberam fontes de TC, principalmente nos GII e GIV.

Os valores dos números de L3 recuperadas nas coproculturas e a porcentagem de viabilidade dos ovos de helmintos podem ser visualizados nas Tabelas 6.3 e 6.4.



↓ : Início do fornecimento das fontes de TC
 DPI: Dias pós-infecção

Figura 6.5- Número médio de OPG dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle); do grupo tratado com sorgo taninífero (Sorgo) do 28º ao 34º dia pós-infecção (DPI); do grupo tratado uma vez (1X) ou do tratado duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC), respectivamente, no 28º e no 28º e 29º DPI. Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero

6.3.6. Consumo voluntário

Pode-se visualizar na Tabela 6.5 que o fornecimento de taninos condensados, tanto na forma de sorgo taninífero (suplementado na dieta basal), quanto na forma de extrato de acácia (fornecido VO) não afetaram o consumo voluntário dos animais. Fato comprovado pela análise das quantidades de concentrado e feno ingeridos pelos animais dos diferentes

tratamentos. Deve-se ressaltar que ao volume de concentrado consumido pelo grupo GII, acrescentam-se 350 g, correspondendo ao sorgo taninífero adicionado à dieta animal.

Como observado na Tabela 6.5 o grupo não infectado por nematódeos gastrintestinais apresentou o maior consumo voluntário e produção de fezes. Estimou-se a equivalência no consumo voluntário dos animais controle (não tratados) e tratados com TAC pela análise estatística dos valores médios do peso corporal dos ovinos durante todo o período experimental, peso ao abate e peso das carcaças fria e quente, a qual não demonstrou diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 6.2- Carga parasitária de *Haemonchus contortus* identificada no abomaso dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero

Número de <i>Haemonchus contortus</i>			
Grupos	Macho	Fêmea	Total
Controle infectado	437,5 (140; 1130)	692,5 (390; 1370)	1130 (530; 2500)
Sorgo	395 (100; 1000)	482,5 (150; 1030)	877,5 (250; 2030)
TAC 1X	467,5 (80; 1180)	642,5 (160; 1400)	1110 (240; 2580)
TAC 2X	330 (0; 950)	505 (0; 1070)	835 (0; 2020)
Controle não infectado	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)

Valores mínimos e máximos entre parênteses

Tabela 6.3- Número de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* por grama de fezes recuperadas de coproculturas realizadas com

pool (25 g). Amostras dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus*

Grupos	Dias Pós-Tratamento			
	0	2	5	7
Controle infectado	980	856	1776	1944
sorgo	764	804	820	800
TAC 1X	920	936	1760	1400
TAC 2X	960	440	840	680
Controle não infectado	0	0	0	0

Tabela 6.4- Viabilidade (%) dos ovos de *Haemonchus contortus* recuperados de *pool* de fezes dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus*. Ovinos mantidos em gaiolas metabólicas (2 animais grupo⁻¹)

Grupos	Dias Pós-Tratamento			
	0	2	5	7
Controle infectado	60	61	62	80
sorgo	60	62	70	91
TAC 1X	62	50	55	82
TAC 2X	70	22	43	70
Controle não infectado	0	0	0	0

Tabela 6.5- Quantidade de dieta ingerida (concentrado e feno) e quantidade

de fezes produzidas por cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 5000 L3 de *H. contortus* no dia zero. Ovinos mantidos em gaiolas metabólicas (2 animais grupo⁻¹), durante a última semana do experimento

6.4. DISCUSSÃO

Como esperado o peso dos animais não infectados e do grupo suplementado com sorgo foram superiores, porém devido ao curto período experimental não foi detectada diferença significativa. Animais com infecção parasitária apresentam o consumo voluntário reduzido em pelo menos 10 a 30% (COOP e SYKES, 2002). Neste mesmo período, detectou-se que a ação do TAC não influenciou o peso final dos animais, mesmo acarretando diarreia pastosa em três dos oito animais tratados. Os animais eliminaram fezes pastosas por dois dias após o primeiro dia de fornecimento do TAC.

Athanasiadou et al. (2001a), ao avaliar ovinos infectados com *T. colubriformis* que receberam EQ, como fonte de TC na dieta, na dose de 60 g kg⁻¹ MS, durante um período de 67 dias, observaram que o EQ não

promoveu incremento no peso dos animais em comparação com o grupo controle. Porém, quando os animais receberam dietas com alto valor protéico aumentaram a ingestão de alimento sem que tivesse ocorrido prejuízo a digestibilidade (ATHANASIADOU et al., 2001a).

Como observado neste trabalho, o fornecimento de TC suplementado na dieta, na forma de sorgo (*ad libitum*), não acarreta nenhum distúrbio gastrointestinal aos ovinos ou diminuição no consumo voluntário, quando fornecidos em doses adequadas. A suplementação de TC na dieta pode ser potencialmente utilizada em controles parasitários profiláticos ou de longa duração. Da mesma forma, outros pesquisadores relataram a suplementação de pequenos ruminantes com fontes de TC sem prejuízo ao desempenho animal (ATHANASIADOU et al., 2000a; ATHANASIADOU et al., 2001a; NIEZEN et al., 2002a; PAOLINI et al., 2003a).

O fornecimento de TC por via oral com uso de seringa apresentou resultados mais rápidos sobre a diminuição da viabilidade dos ovos de helmintos e recuperação de L3 das fezes, porém foi testado apenas em curtos períodos de fornecimento, sendo indicados somente nestes casos. O uso prolongado de TC não é indicado, pois implica na manipulação diária dos animais, sendo ainda causadores em potencial de quadros de diarreia pastosa. Os TC provenientes do EQ foram testados com sucesso em tratamentos de curta duração, sendo eficazes na redução do OPG em ovinos (ATHANASIADOU et al., 2000b).

Os valores de VG do grupo controle não infectado e do TAC 2X foram semelhantes (respectivamente, GV: 30,5% e GIV: 29,25%) e superiores aos

tratamentos TAC 1X e sorgo (27,0%) e obviamente ao controle infectado (GI: 26%). Entretanto não houve diferença estatística entre as médias de VG. Os valores de hemoglobina também não diferiram estatisticamente e podem ter sofrido influência da suplementação do sorgo na dieta, já que o grupo (GII) suplementado com este ingrediente apresentou valores de hemoglobina maiores (10,53 g dL⁻¹) que os do grupo não infectado (10,14 g dL⁻¹).

Analisando-se a média dos grupos com relação ao número de OPG não se pôde evidenciar diferença significativa entre as mesmas. Porém deve-se levar em consideração que os helmintos não se distribuem de forma homogênea no rebanho, os parasitos apresentam distribuição binomial negativa, ou seja, poucos animais albergam a maioria dos nematódeos gastrintestinais (AMARANTE et al., 1998), portanto, ocorrendo o mesmo com os valores de OPG.

Essa afirmativa pode explicar porque três animais do GIV apresentaram redução no valor de OPG, sendo que um apresentou OPG 2100 ao início do tratamento e valor zero do 5º ao 9º dia pós-tratamento. Por outro lado um animal não teve seu valor de OPG reduzido, apresentando 10000 OPG no último dia experimental, o que afetou significativamente a média de OPG do GIV.

Como evidenciado em apenas alguns animais deste ensaio, a redução no número de OPG em animais tratados com fontes de TC pode ser significativa, principalmente quando são utilizados extratos de quebracho (ATHANASIADOU et al., 2000a e 2000b; PAOLINI et al., 2003a) ou algumas forrageiras como *Lotus corniculatus*, *Cichorium intybus* (MARLEY et al., 2003)

e *Hedysarum coronarium* (NIEZEN et al., 2002a). Max et al. (2005) utilizando EQ no controle de helmintos gastrintestinais em ovinos, na dose de 2,4 g EQ kg⁻¹ PV, durante três dias, relataram redução de até 91% na contagem de OPG em animais infectados com *H. contortus*.

Porém, mesmo que a eliminação de ovos de nematódeos não seja diminuída, podemos estimar que a contaminação das pastagens o fosse. Este fato baseia-se na diminuição da viabilidade dos ovos de helmintos observada principalmente no grupo GIV (TAC 2X), o qual atingiu valores inferiores a 35% dos apresentados pelo grupo GI (controle infectado). Apenas 22% dos ovos eliminados pelos animais do GIV no 2º dia de tratamento atingiram estágio de L1, contra 61% do GI.

Da mesma forma os TC influenciaram negativamente a produção de L3 nas fezes dos animais tratados. Neste caso, além do grupo GIV, também o GII apresentou resultados promissores. Após o início dos tratamentos o número de LPG de fezes recuperadas do GIV foi sempre 50% inferior ao número de larvas recuperadas nas fezes do GI. A ação dos TC no GII foi mais lenta, porém eficiente, pois no último dia de tratamento foram recuperadas das coproculturas do GII (800 LPG) e do GI (1944 LPG).

A metodologia utilizada na avaliação da viabilidade dos ovos de *H. contortus* remove todos os resíduos de TC em consecutivas lavagens. Por isso, sugere-se que a retirada dos TC provenientes do sorgo nesta fase inviabilizaram a ação dos mesmos neste teste. Ao contrário, para realização das coproculturas os TC provenientes do sorgo permanecem nas fezes em contato com os ovos e larvas dos nematódeos, proporcionando um efeito

direto sobre as larvas. Nesta linha de raciocínio, pode-se sugerir que o efeito do TAC na viabilidade dos ovos seria sobre as fêmeas do parasito, ou então, agiriam rapidamente sobre os ovos durante o trânsito no trato digestório.

Outros autores relatam a ação dos TC sobre a viabilidade dos avos ou larvas de helmintos gastrintestinais (ATHANASIADOU et al., 2001b; NIEZEN et al., 2002b). Entretanto, aplicar os resultados de testes *in vitro* para os animais ainda é um desafio, pois as doses de TC devem ser adaptadas à espécie ovina sem causar danos à ingestão ou digestibilidade da dieta. Maiores estudos sobre a ação direta dos TC sobre *H. contortus* são necessários para que se avalie a sua utilização em tratamentos antiparasitários e seu efeito sobre a fase de vida livre dos helmintos gastrintestinais.

A contagem de helmintos adultos foi considerada baixa em todos os animais, principalmente considerando-se que a carga parasitária total do GI: 1130 helmintos, quando o esperado em outras raças ovinas seria de 2000 a 4000, ou seja, de 40% a 80% de estabelecimento do número de L3 administradas aos animais. Entretanto este fato era esperado, já que a raça Santa Inês é caracterizada como relativamente resistente às infecções parasitárias por *H. contortus* (AMARANTE et al., 2004).

Alguns trabalhos com ovinos relatam diminuição na carga parasitária de *H. contortus* após utilização dos TC em níveis adequados à alimentação animal (HÖRDEGEN et al., 2003; MIN e HART, 2003). Outros relatam efeito dos TC na carga parasitária de helmintos parasitas do intestino e não nos de abomaso (ATHANASIADOU et al., 2001b). Por outro lado, Max et al. (2005)

relataram ação dos TC apenas contra *H. contortus*, não apresentando efeito contra *T. colubriformis*.

Em contrapartida, muitos trabalhos correlacionam o uso de TC com diminuição na fecundidade das fêmeas de helmintos (ATHANASIADOU et al 2000a, 2001a; MIN e HART, 2003; PAOLINI et al., 2003a e 2003b), porém Athanasiadou et al. (2000b) relataram que não se pode afirmar que a diminuição na fecundidade das fêmeas seja atribuída aos TC.

Neste trabalho não foi detectada diferença significativa na carga parasitária dos animais entre os diferentes tratamentos, porém a diferença entre o controle infectado (GI: 1130) e TAC 2X (GIV: 835) foi de 27% e entre GI e sorgo (GII: 877,5) de 23%.

6.5. CONCLUSÕES

Como observado em vários trabalhos, apesar de promissor, o uso dos TC no controle das endoparasitoses em ovinos ainda é controverso, dependendo da fonte de TC, espécie e habitat do helminto. Além destes fatores deve-se levar em consideração, principalmente, a dose de TC ($\text{g dia}^{-1} \text{ animal}^{-1}$) e a duração do tratamento. Porém, não se pode descartar o potencial de ação destes compostos e sua utilização no controle dos nematódeos gastrintestinais, principalmente aonde não se pode fazer uso de drogas anti-helmínticas, seja em produções orgânicas ou em propriedades com relato de resistência anti-helmíntica múltipla.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G.; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 29, p. 31-38, 1992.

AMARANTE, A. F. T.; GODOY, W. A. C.; BARBOSA, M. A. Nematode egg counts, packed cell volume and body weight as parameters to identify sheep resistant and susceptible to infections by gastrointestinal nematodes. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 14, p. 331-339, 1998.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, p. 91-106, 2004.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1025-1033, 2000a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, London, v. 146, p. 728-732, 2000b.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **British Journal of Nutrition**, London, v. 86, p. 697-706, 2001a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. Direct anthelmintic of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p. 205-219, 2001b.

COOP, R. L.; SYKES, A. R. Interactions between gastrointestinal parasites and nutrients. In: FREER, M.; DOVE, H. (Ed.). **Sheep Nutrition**. Wallingford: CABI, 2002. p.313-331.

HÖRDEGEN, P.; HERTZBERG, H.; HEIMANN, J.; LANGHANS W.; MAURER, V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 51-60, 2003.

KNOX, M. R.; DENG, K.; NOLAN, J. V. Nutritional programming of young sheep to improve later-life production and resistance to nematode parasites: a brief review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 43, p. 1431-1435, 2003.

MARLEY, C. L.; COOK, R.; KEATINGE, R.; BARRETT, J.; LAMPKIN, N. H. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminths parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 112, p. 147–155, 2003.

MAX, R. A.; DAWSON, J. M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P. J.; KIMAMBO, A. E.; KASSUKU, A. A.; MTENGA, L. A. Effect of condensed tannins extracts on gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Goat keepers cluster reports:** project R7424. Disponível em: [http://uploads.vli.co.uk/lpp/disseminations/R7424/R7424%20\(02\)%20\(9543\)%20Effect%20of%20condensed%20tannin%20extracts.pdf](http://uploads.vli.co.uk/lpp/disseminations/R7424/R7424%20(02)%20(9543)%20Effect%20of%20condensed%20tannin%20extracts.pdf). Acesso em: 20.12.2005.

MIN, B. R.; HART, S. P. Tannins for suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 81, n. 2, p. 102-109, 2003.

NIEZEN, J. H.; CHARLESTON, W. A. G.; ROBERTSON, H. A.; SHELDON, D.; WAGHORN, G. C.; GREN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, p. 229-245, 2002a.

NIEZEN, J. H.; WAGHORN, G. C.; GRAHAM, T.; CARTER, J. L.; LEATHWICK, D. M. The effect of diet fed to lamb on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, n. 4, p. 269-283, 2002b.

PAOLINI, V.; FRAYSSINES, A.; DE LA FARGE, S.; DORCHIES, P.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on established populations and in incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. **Veterinary Research**, Paris, v. 34, p. 331-339, 2003a.

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J. P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, P. H.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infect with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, p. 253-261, 2003b.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223-230, 1986.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166 p.

SYKES, A. R. Parasitism and production in farm animals. **Animal Production**, v 59, p. 155-172, 1994.

YU, F.; BRUCE, L. A.; CALDER, A. G.; MILNE, E.; COOP, R. L.; JACKSON, F.; HORGAN, G. W.; MACRAE, J. C. Subclinical infection with the nematode *Trichostrongylus colubriformis* increases gastrointestinal tract leucine metabolism and reduces availability of leucine for other tissues. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 78, p. 380-390, 2000.

7. EFEITO DIRETO DOS TANINOS CONDENSADOS SOBRE *Trichostrongylus colubriformis* EM OVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO

Nematódeos gastrintestinais são a maior causa de perdas econômicas em criações animais. O controle das helmintoses é baseado no uso de drogas anti-helmínticas. O objetivo principal deste trabalho foi de avaliar o potencial efeito anti-helmíntico dos taninos condensados sobre *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos experimentalmente infectados e as conseqüências nutricionais sobre os animais. Vinte ovinos livres de infecção parasitária foram divididos em cinco grupos de quatro animais. Os grupos GI a GIV foram experimentalmente infectados com 6000 L3 de *T. colubriformis*. O GI foi mantido como controle infectado e o GV como controle não infectado. Vinte e oito dias pós-infecção (p.i.) os animais foram tratados com fontes de taninos condensados (TC): o GII suplementado com 350 g de sorgo taninífero, durante sete dias; os grupos GIII e GIV receberam extrato de *Acacia mearnsii* (1,6 g de extrato. kg⁻¹ PV), durante um ou dois dias, respectivamente. No 36º dia p.i. os animais dos grupos I a IV foram abatidos. No dia 29 p.i. (2º dia de tratamento) foi detectada diferença significativa no número de ovos por grama de fezes ($P < 0,01$) entre o GII e GI; já no 35º e 36º dias p.i. houve diferença ($P < 0,01$) entre os grupos GIII e GI. A carga parasitária total dos grupos foi semelhante, porém houve diferença significativa no número de fêmeas do GIV em relação ao GI ($P < 0,01$).

A viabilidade dos ovos de helmintos do GIV foi 24% da determinada no GI no último dia de tratamento, sendo de 55,6% e 51,7% no 2º e 5º dias de tratamento, respectivamente. O número de L3 recuperadas das coproculturas do GIV, quando comparado ao valor do GI (100%) foi de 13,7%; 45,9% e 52,5% nos dias 2, 5 e 7 pós-tratamento. O uso de TC na dieta animal não afetou o peso corporal e os parâmetros hematimétricos dos animais ($P > 0,05$). O uso dos TC pode ser promissor na descontaminação das pastagens e no controle de *T. colubriformis*; porém mais estudos são necessários para sua indicação como anti-helmíntico no tratamento das parasitoses causadas por *T. colubriformis* em ovinos.

Palavras-chave: Extrato de acácia, anti-helmíntico, nematódeos intestinais, experimento *in vivo*.

DIRECT ANTHELMINTIC EFFECTS OF CONDENSED TANNINS ON *Trichostrongylus colubriformis* IN SHEEP EXPERIMENTALLY INFECTED

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes are a major cause of economic loss in farm animals. The control of helminth infections in both ruminant and non-ruminant farm animals has traditionally been anthelmintic drug-dependent. The aims of the present study were to investigate the potential anthelmintic effects of condensed tannins on *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected sheep and the nutritional consequences on animals. Twenty helminth-free lambs were divided into five groups of four animals. Groups I to IV were infected artificially with 6000 third stage larvae of *T. colubriformis*. Group I was the infected control and the group V was the uninfected control. Twenty-eight days post-infection lambs from GII were supplemented with tanniferous sorghum (350 g day⁻¹ animal⁻¹, during seven days); GIII were drenched with *Acacia mearnsii* extract (rich in condensed tannins) for one day and GIV during two days (1,6 g extract kg⁻¹ BW). At 36^o day post-infection animals from GI to GIV were slaughtered. The values reduction of the faecal egg counts was significant between GII and GI ($P < 0.01$) on 29 day p.i.; the same was detected between GIII and GI on 35^o e 36^o day p.i. ($P < 0.01$). The egg viability from GIV was 24%; 55.6% and 51.7% of the viability from GI on 2^o; 5^o and 7^o days of treatment with CT sources. The number of infective larvae recovered from GIV compared of GI (100%) was 13.7%; 45.9% and 52.5% on 2^o, 5^o e 7^o days of CT treatment. The use of condensed tannins on

diet did not cause significant difference on body-weight and blood parameters ($P > 0.05$). The use of CT could be a promising alternative source to reduction the pasture contamination and in the control of *T. colubriformis* infections but more studies are necessary to indicate the CT use as anthelmintic in parasitic diseases caused by *T. colubriformis* in sheep.

Key words: Acacia extract, anthelmintic, intestinal nematodes, *in vivo* experiment.

7.1. INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias causadas por *Trichostrongylus colubriformis* estão entre as de grande importância na criação de ovinos, logo após a haemoncose, em ordem de importância, nos países tropicais. Mesmo infecções parasitárias consideradas por alguns autores como subclínicas diminuem o ganho de peso, consumo voluntário, produção de leite e lã dos ovinos, podendo ainda, prejudicar a deposição de tecidos moles e crescimento esquelético (BUTTER et al., 2000).

As drogas anti-helmínticas reduzem de forma significativa o nível de infecção por helmintos gastrintestinais em cordeiros (KAWANO et al., 2000). Entretanto, o desenvolvimento de cepas de parasitos resistentes a estas drogas (JACKSON e COOP, 2000), principalmente em pequenos ruminantes; os resíduos de fármaco nas carcaças e o crescimento do número de propriedades utilizando o sistema de produção orgânico ressaltam o interesse em sistemas de controle parasitário alternativo (ATHANASIADOU et al., 2001a).

Plantas com propriedades anti-helmínticas são conhecidas e utilizadas em todo o mundo há muitos anos, porém poucas pesquisas foram realizadas para validar seu uso, principalmente em medicina veterinária (MAX et al., 2005). A suplementação dos ovinos com taninos condensados (TC), oriundos de plantas forrageiras ou dos extratos de quebracho e acácia, vêm sendo utilizados no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos, entre eles *T. colubriformis* (ATHANASIADOU et al., 2000a e 2000b).

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a ação direta dos TC provenientes do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*) e do sorgo taninífero (*Sorghum bicolor*) sobre *T. colubriformis* em ovinos experimentalmente infectados. Para isso foram avaliados: (1) os valores de OPG; (2) a carga parasitária; (3) o número de larvas infectantes de terceiro estágio (L3) recuperadas de coproculturas; (4) a viabilidade dos ovos de helmintos, ou seja, o desenvolvimento até larva de primeiro estágio (L1). Assim como seu efeito sobre os parâmetros de produção animal: PV, peso de carcaça e consumo voluntário.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. Delineamento experimental

Inicialmente foram mantidos animais doadores com infecção parasitária monoespecífica para obtenção das L3. Esses animais foram mantidos até que o número de L3 necessário para infecção dos animais experimentais fosse atingido.

Os vinte cordeiros utilizados no período experimental foram mantidos estabulados, recebendo feno e concentrado. Dezesesseis animais foram infectados com 6000 L3 de *T. colubriformis*, e quatro animais foram mantidos como controles livres de infecção, os animais foram mantidos em unidades experimentais com quatro animais por baia, porém sem grupo definido. Um dia antes do início dos tratamentos, os animais foram divididos, segundo número de OPG e peso corporal. Os grupos de animais foram os seguintes

(Tabela 7.1): GI controle infectado; GII suplementado com sorgo, GIII recebeu TAC, por um dia; GIV recebeu TAC, durante dois dias e GV controle não infectado.

Tabela 7.1- Delineamento experimental do ensaio realizado com 20 ovinos da raça Santa Inês. Cordeiros divididos em cinco grupos de quatro animais: controle infectado (Controle infect), tratado com sorgo taninífero (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis*

Grupos	Infecção (DPI=0)	Fontes de TC (DPI=28 a 34)	DPI=36
GI - Controle infect	<i>T. colubriformis</i>	-	Abate
II - Sorgo	<i>T. colubriformis</i>	Sorgo	Abate
GIII - TAC 1X	<i>T. colubriformis</i>	TAC 1X [#]	Abate
GIV - TAC 2X	<i>T. colubriformis</i>	TAC 2X ^{##}	Abate
GV - Não infect	Não Infectado	-	Abate

DPI = Dias pós-infecção

TC = fonte de tanino condensado

[#]TAC foi fornecido no 28º ou ^{##} no 28º e 29º DPI.

Os tratamentos tiveram início 28 dias pós-infecção (p.i.), sendo o sorgo suplementado durante sete dias e o TAC administrado (VO), por um ou dois dias. Foi feito o acompanhamento do número OPG de todos os grupos experimentais. Durante a semana de tratamento com TC foram realizadas quatro culturas de fezes e testes de viabilidade de eclosão dos ovos de helmintos, para cada grupo experimental, em dias estratégicos (0, 2, 5 e 7 dias pós-tratamento) .

Nos últimos cinco dias de tratamento metade dos animais (n = 2 tratamento⁻¹) foi alocada em gaiolas metabólicas para avaliação do

consumo voluntário dos animais. Foram aferidos os pesos das sobras de concentrado e feno nas baias e gaiolas, assim como o total de fezes produzidos pelos animais e recuperados nas gaiolas. O abate dos animais ocorreu nove dias após o início dos tratamentos com TC para realização de necropsia parasitológica.

7.2.2. Fontes de taninos condensados

Com base em análises prévias para determinação das concentrações de TC (método HCl-Butanol; segundo PORTER et al., 1986) dos insumos foram selecionados o sorgo taninífero (*Sorghum bicolor*), com 2% de TC e o TAC, com 15% de TC.

7.2.3. Animais

Foram utilizados 20 cordeiros da raça Santa Inês, com idade entre dois e três meses, mantidos estabulados até o desmame e livres de infecção parasitária até o início dos trabalhos.

7.2.4. Larvas infectantes

Foram utilizadas larvas de *T. colubriformis* obtidas de três cordeiros doadores com infecção monoespecífica. As fezes obtidas desses doadores foram cultivadas para obtenção da forma infectante (L3-terceiro estágio) segundo Roberts e O'Sullivan (1950) modificado segundo Ueno e Gonçalves (1994). As larvas obtidas das culturas foram mantidas em temperatura ambiente e utilizadas antes de completarem 21 dias de estocagem.

Para infecção dos ovinos doadores foram utilizadas L3 de *T.*

colubriformis isoladas em 2003, no Departamento de Parasitologia - IB - UNESP, Botucatu, de ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais oriundos de Pratânea - SP.

7.2.5. Dieta experimental

Os animais receberam feno de gramínea (*Cynodum* sp.) e concentrado (milho + farelo de soja) na proporção 50%-50%, dieta total com 13% de proteína bruta (PB). As quantidades foram fornecidas segundo o NRC 1985, para a faixa etária e ganho de peso diário de aproximadamente 200 g por animal. O concentrado oferecido aos animais foi dividido e fornecido duas vezes ao dia. Foram feitos ajustes semanais de cálculo da dieta após a pesagem dos animais.

Os cordeiros do grupo tratado com sorgo receberam um total de 350 g de sorgo taninífero dia^{-1} , o qual foi adicionado ao concentrado (dieta basal) fornecido aos animais, durante sete dias, o total de TC na dieta foi de aproximadamente 7 g de TC $\text{animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. O TAC foi fornecido VO individualmente aos animais, sendo previamente pesado e diluído em aproximadamente 50 mL de água morna (37° Celsius). Após diluição, o TAC foi administrado aos animais, por via oral, com auxílio de seringa, na dose de 1,6 g kg^{-1} PV, durante um ou dois dias, isso corresponde a aproximadamente 7,2 g de TC (dose diária para animal de 30 kg).

7.2.6. Técnicas parasitológicas

As amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto de todos os animais. A determinação dos valores de OPG foi realizada segundo a técnica

de Gordon e Whitlock (1939) modificada, segundo Ueno e Gonçalves (1994) e realizada semanalmente até o 21º dia p.i., duas vezes por semana do 21º ao 28º dia p.i. e diariamente durante o fornecimento dos TC.

Foram realizadas coproculturas para cada grupo experimental, utilizando-se um *pool* de fezes de todos os animais do grupo, utilizando-se a mesma quantidade de fezes por *pool*, padronizada em 25 g. As fezes foram cultivadas para obtenção e contagem das L3, para isto, foi utilizado o método de Roberts e O'Sullivan modificado, segundo Ueno e Gonçalves (1994). As L3 foram recuperadas em volumes idênticos (100 mL) e separadas por grupo; para determinação do número de LPG de fezes por tratamento.

O teste de viabilidade dos ovos de nematódeos recuperados nas fezes foi realizado logo após o exame de contagem de OPG. As fezes dos animais de cada grupo, já diluídas em solução hipersaturada de NaCl (30%) foram reunidas em um único *pool*. A solução foi filtrada em duas peneiras de 196 e 38 µm respectivamente. O resíduo, com os ovos retidos na peneira de 38 µm, foi transferido para um tubo de ensaio.

O resíduo de cada grupo foi dividido em vários frascos devidamente identificados, contendo 1/5 de resíduo de fezes peneiradas e 3/5 de solução hipersaturada de NaCl. Os tubos foram centrifugados à 2000 xg, durante três minutos. O 1/5 do tubo correspondente ao sobrenadante foi transferido para outro tubo e diluído em água para retirar o sal residual. Essa operação de lavagem foi repetida três vezes, sendo que em cada uma o precipitado (1/5 do volume inferior do tubo) foi isolado, cada lavagem foi realizada com auxílio de centrifugação à 2000 xg, durante três minutos. As lavagens são

necessárias para retirada do excesso de NaCl, o qual pode interferir no desenvolvimento dos ovos⁵.

Após a última lavagem os ovos de helmintos recuperados e diluídos em solução aquosa foram transferidos para uma placa de Petri e incubados em estufa à 25°C por 24 h. Após este período, com auxílio de um microscópio óptico (aumento 10x), foram contadas 100 estruturas e identificadas em ovos ou L1. O número de L1 identificados em relação as 100 estruturas contadas foi determinado como o resultado de viabilidade dos ovos de nematódeos.

As análises de contagem de L3 recuperadas por grupo experimental, assim como os testes de viabilidade dos ovos de helmintos, foram feitas em dias estratégicos a partir do início dos tratamentos com TC (dias: 0, 2, 5 e 7).

Dois dias após o término do fornecimento dos TC, todos os grupos, com exceção do controle não infectado, foram abatidos. Após o abate foi removido o abomaso de todos os animais (com as extremidades dos órgãos devidamente amarradas). O conteúdo foi removido e duas alíquotas (10% do volume total) foram obtidas. Foi determinada a carga parasitária de cada animal e feita a classificação dos helmintos adultos por sexo.

7.2.7. Peso e parâmetros hematimétricos

Os ovinos foram pesados uma vez por semana. A cada 15 dias foram

⁵ JACKSON, F. Protocolo de laboratório Moredun Research Institute. Comunicação pessoal. (setembro, 2004).

colhidas amostras de sangue de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se frascos do tipo vacutainer com anticoagulante. Do sangue total foram obtidos os valores VG e hemoglobina.

7.2.8. Análise estatística

Os dados referentes à contagem de OPG foram analisados sob transformação logarítmica [$\log(x + 10)$]. Os dados referentes à contagem de OPG, recuperação de L3, viabilidade dos ovos e carga parasitária foram analisados pelo modelo linear geral (GLM) utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, USA). Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O modelo estatístico utilizado para análise de variância foi $Y_i = \mu + T_i + e_i$, onde Y_i corresponde à variável dependente; μ , à média geral; T_i , ao efeito dos tratamentos ($i = 1$ a 5) e e_i , ao resíduo.

7.3. RESULTADOS

Para facilitar a compreensão utilizaremos as seguintes siglas para os diferentes grupos (tratamentos): GI (controle infectado); GII (recebeu sorgo taninífero); GIII (recebeu TAC, uma vez); GIV (recebeu TAC, duas vezes) e GV (controle não infectado).

7.3.1. Peso vivo e peso de carcaça

No 21º dia experimental, quando da divisão dos grupos para início dos tratamentos, o peso vivo médio (kg) dos cordeiros, nos respectivos grupos era: GI 15,65; GII 15,45; GIII 15,48; GIV 15,45 e GV 15,25; EP: 0,581 ($P < 0,05$). Não

houve diferença significativa entre os grupos durante todo o experimento, sendo o peso médio ao abate: GI 19,60; GII 19,30; GIII 19,95; GIV 20,05 e GV 21.15; EP: 1,401 ($P < 0,05$). Na Figura 7.1 esta apresentada a distribuição dos pesos durante o período experimental. Na Figura 7.2 estão ilustradas as médias dos pesos dos animais ao abate e os valores de suas respectivas carcaças (pesos quente e frio).

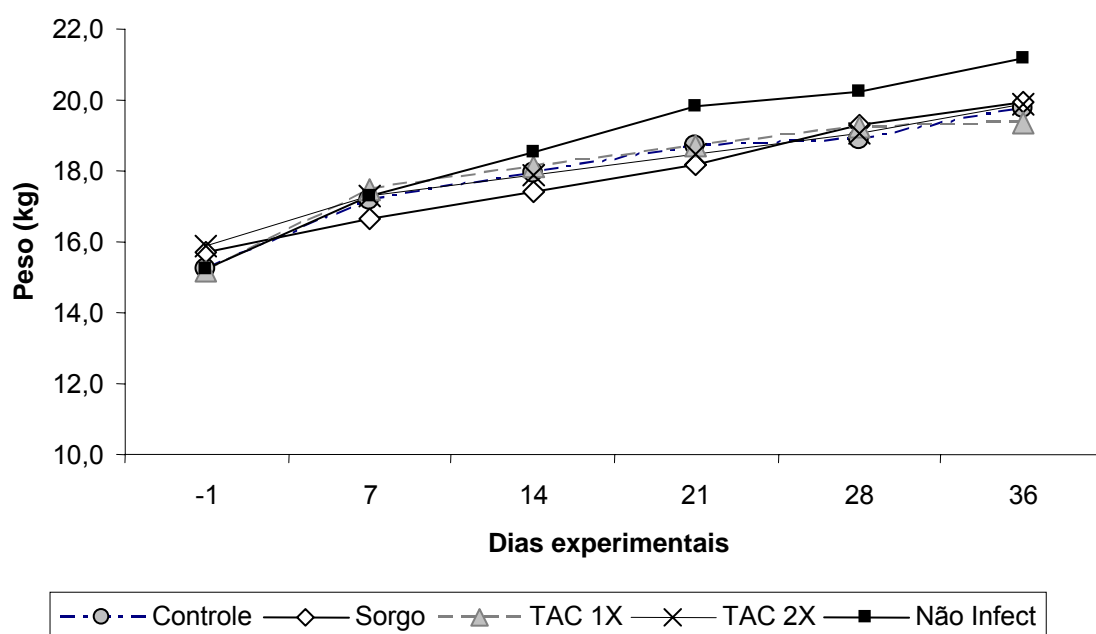


Figura 7.1- Peso médio dos cordeiros, durante o período experimental, do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero e abatidos 36 dias após a infecção

7.3.2 Volume globular e hemoglobina

Os valores de VG e hemoglobina não apresentaram diferença significativa durante todo o período experimental. Os valores médios de VG (%) dos animais, segundo os grupos experimentais, detectados na última semana do ensaio foram:

GI 34,5; GII 37,5; GIII 35,5; GIV 36,0 e GV 36,25; EP: 1,59 ($P > 0,05$). Nas Figuras 7.3 e 7.4 estão demonstrados os valores de VG e hemoglobina, respectivamente, durante todo o período experimental.

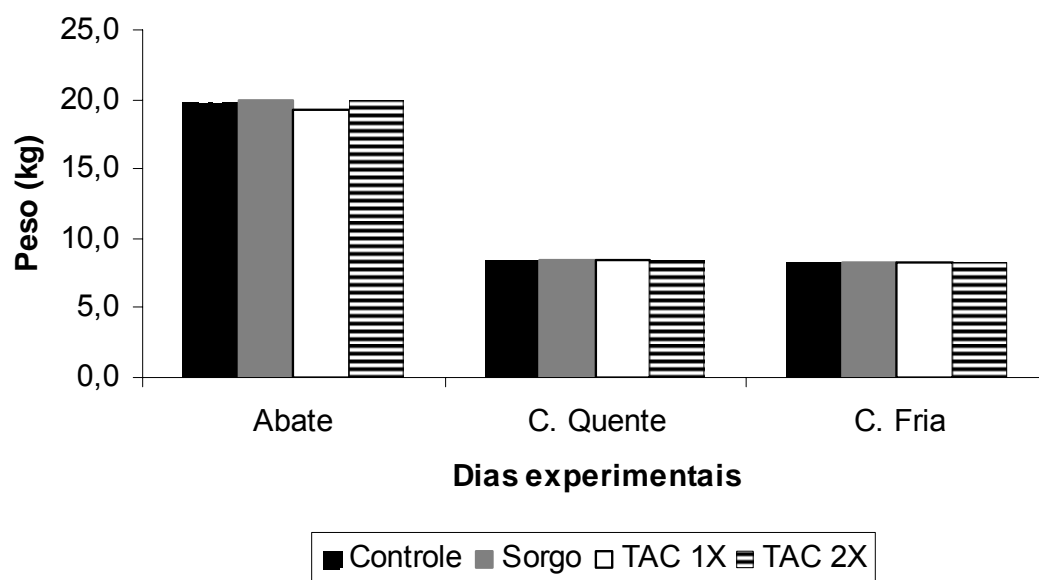


Figura 7.2- Peso médio ao abate dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e das respectivas carcaças quente (C. quente) e fria (C. fria). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero e abatidos 36 dias após a infecção

7.3.3. Contagem de ovos por grama de fezes

No dia 29 p.i. (2º dia de tratamento) foi detectada diferença significativa no número de ovos por grama de fezes ($P < 0,01$) apenas entre o GII (sorgo) e GI (controle infectado), já no 35º e 36º dias p.i. houve diferença ($P < 0,01$) entre os grupos GIII (TAC 1X) e GI (controle infectado). Os valores médios de OPG, por grupo infectado, no último dia experimental (nove dias após início

do fornecimento de TC) foram: GI 928; GII 516; GIII 348 e GIV 604 (EP: 8,72). Os animais do GV (controle não infectado) não eliminaram ovos de nematódeos nas fezes.

Na Figura 7.5 estão demonstrados os valores de OPG durante todo o período experimental. No 36º dia p.i. a porcentagem de redução do número de OPG dos grupos GIII (TAC 1X) e GIV (TAC 2X), quando comparados ao GI (controle infectado), atingiram 37,8% e 62,2%, respectivamente.

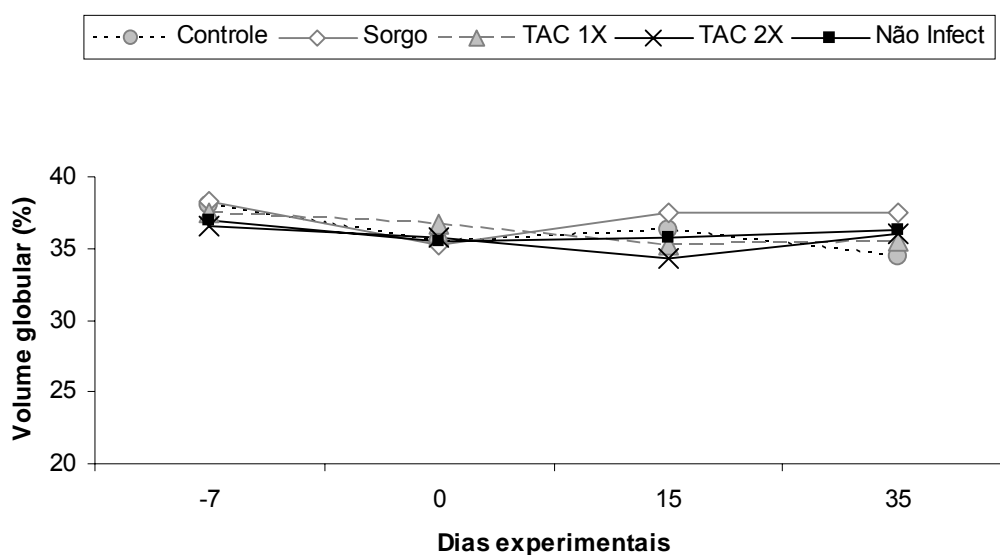


Figura 7.3- Valores médios do volume globular de cada grupo (4 animais grupo⁻¹), durante o período experimental. Grupos: controle infectado (Controle), tratado com sorgo (Sorgo), tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero

7.3.4. Carga parasitária

A carga parasitária total dos grupos foi semelhante, sendo que as médias das cargas parasitárias totais dos ovinos, divididos por grupos foram: GI 1956; GII 1825; GIII 1519 e GIV 1309 nematódeos (EP: 8,85).

Entretanto, houve diferença no número de fêmeas do GIV em relação ao GI ($P < 0,01$). As médias do número de fêmeas por grupo foram: GI 1306; GII 1089; GIII 998; GIV 810 (EP: 8,86). Na Tabela 7.2 estão apresentadas às médias dos valores de carga parasitária dos ovinos de todos os grupos experimentais, assim como seus valores máximos e mínimos.

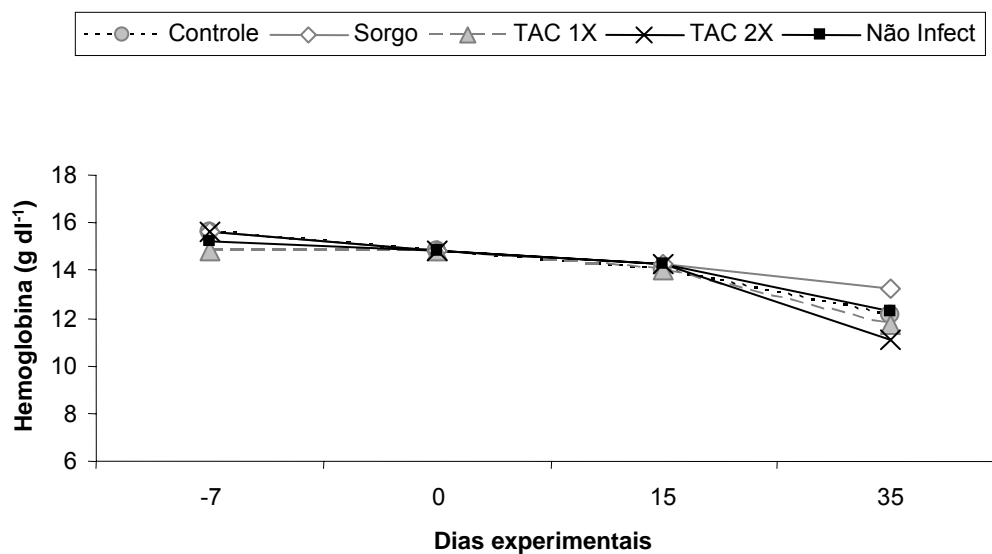
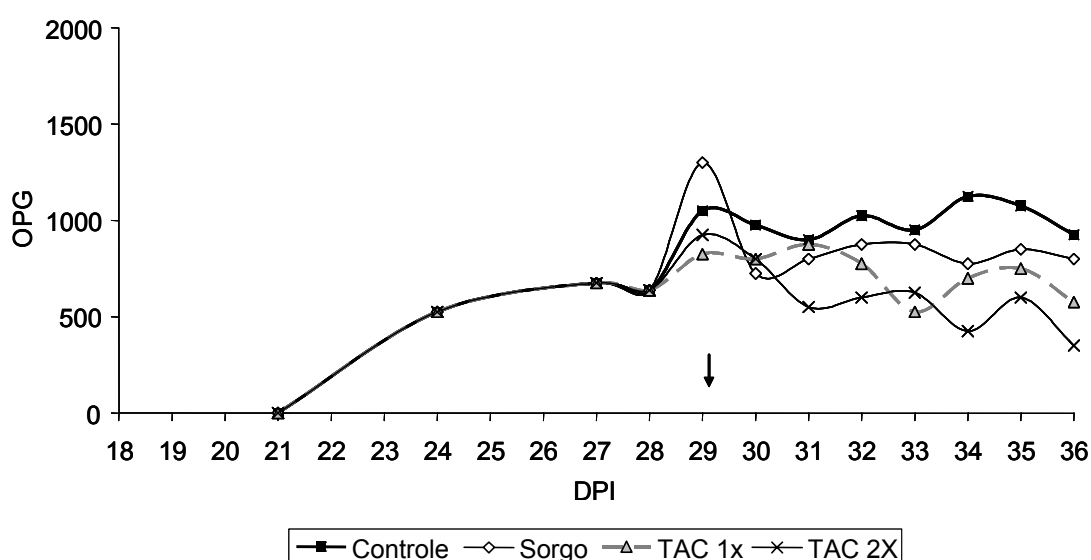


Figura 7.4- Valores médios de hemoglobina (g dL^{-1}) dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo taninífero (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero

7.3.5. Número de L3 e viabilidade dos ovos de helmintos

Como apenas um *pool* de cada tratamento foi analisado em cada dia estratégico durante o fornecimento dos taninos condensados (dias: 0; 2; 5 e 7), os resultados não sofreram análise estatística. Entretanto, verificou-se uma queda considerável nos valores de L3 recuperadas e de L1 identificadas em todos os grupos que receberam fontes de TC, principalmente nos GIII (TAC 1x) e GIV (TAC 2x). Os valores dos números de L3 recuperadas das coproculturas e porcentagem de viabilidade dos ovos de helmintos podem ser visualizados nas Tabelas 6.3 e 6.4.



↓: Início do fornecimento das fontes de TC
DPI: Dias pós-infecção

Figura 7.5- Número médio de OPG dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle); do grupo tratado com sorgo (Sorgo) do 28º ao 34º dia pós-infecção (DPI); do grupo tratado uma vez (1X) ou do tratado duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC), respectivamente, no 28º e no 28º e 29º DPI. Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis* no dia zero

7.3.6. Consumo voluntário

Pode-se visualizar na Tabela 7.5 que o fornecimento de TC, tanto na forma de sorgo taninífero (suplementado na dieta), quanto na forma de TAC (VO) não afetaram o consumo voluntário dos animais, já que as sobras de concentrado e feno dos tratamentos foram semelhantes. Deve-se ressaltar que ao volume de concentrado consumido pelo grupo GII, acrescentam-se 350 g, correspondentes ao sorgo taninífero adicionado à dieta animal.

Estimou-se a equivalência no consumo voluntário dos animais dos grupos controle (não tratados) e tratado com TAC pela análise estatística dos valores médios dos pesos: corporal (durante o período experimental), ao abate e das carcaças fria e quente, a qual não demonstrou diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 7.2- Carga parasitária média de *Trichostrongylus colubriformis* no intestino delgado dos cordeiros do grupo controle infectado, do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram sacrificados 36 dias após infecção artificial com 6000 L3 de *T. colubriformis*

Número de <i>Trichostrongylus colubriformis</i>			
Grupos	Macho	Fêmea	Total
Controle infectado	667,5 (510; 930)	1335 (110; 1710)	2002,5 (1540; 2640)
Sorgo	825 (400; 1600)	1132,5 (860; 1700)	1957,5 (1260; 3300)
TAC 1X	522,5 (460; 650)	1002,5 (910; 1060)	1525 (1380; 1710)
TAC 2X	490 (460; 530)	850 (610; 1320)	1340 (1070; 1830)
Controle não infectado	0	0	0

Valores mínimos e máximos entre parênteses.

Tabela 7.3- Número de larvas infectantes (L3) de *Trichostrongylus colubriformis* por grama de fezes recuperadas de coproculturas. Amostras dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis*

Grupos	Dias Pós-Tratamento			
	0	2	5	7
controle infectado	404	426	388	400
sorgo	387	286	330	256
TAC 1X	412	258	344	310
TAC 2X	384	58	178	210
controle não infectado	0	0	0	0

Tabela 7.4- Viabilidade (%) dos ovos de *Trichostrongylus colubriformis* recuperados de *pool* de fezes dos cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis*

Grupos	Dias Pós-Tratamento			
	0	2	5	7
Controle infectado	82	90	89	83
Sorgo	78	77	92	84
TAC 1X	79	33	54	76
TAC 2X	80	50	46	20
Controle não infectado	0	0	0	0

Tabela 7.5- Quantidade média diária de dieta ingerida (concentrado e feno) e quantidade de fezes produzidas, durante a última semana do experimento, por cordeiros do grupo controle infectado (Controle), do tratado com sorgo (Sorgo), do tratado uma vez (1X) ou duas vezes (2X) com tanino altamente concentrado (TAC) e do grupo controle não infectado (Não Infect). Os animais foram infectados artificialmente com 6000 L3 de *T. colubriformis*. Ovinos mantidos em gaiolas metabólicas (2 animais grupo⁻¹)

Grupos	Concentrado (kg)	Feno (kg)	Fezes (kg)
Controle Infectado	0,48	0,30	0,43
Sorgo	0,27*	0,24	0,36
TAC 1X	0,28	0,11	0,16
TAC 2X	0,44	0,15	0,48
Controle não infectado	0,49	0,29	0,67

7.4. DISCUSSÃO

Como esperado o peso dos animais não infectados foi superior, seguido pelo grupo tratado com TAC por dois dias (TAC 2X), porém devido ao curto período experimental não foi detectada diferença significativa. Animais com infecção parasitária apresentam o consumo voluntário reduzido em pelo menos 10% a 30% (COOP e SYKES, 2002), mesmo em infecções consideradas subclínicas. No caso de infecções por *T. colubriformis* deve-se ainda considerar a perda de proteínas pelo endotélio intestinal. Yu et al (2000) relatam uma perda de 4 g a 5 g nitrogênio dia⁻¹ em animais infectados por *T. colubriformis*, essas perdas são referentes ao aumento na produção de muco e perdas endógenas através das células endoteliais.

Durante o período experimental, detectou-se que a ação do TAC não

influenciou o peso final dos animais, apesar de desencadear diarreia pastosa em três animais, dois do grupo GIII e um do GIV. Os animais eliminaram fezes pastosas por dois dias após o primeiro dia de fornecimento do TAC.

Athanasiadou et al. (2001a), ao avaliar ovinos infectados com *T. colubriformis* que receberam EQ, como fonte de TC na dieta, na dose de 60 g. kg⁻¹ MS durante um período de 67 dias, observaram que o EQ não promoveu incremento no peso dos animais em comparação com o grupo controle. Porém, quando os animais receberam dietas com alto valor protéico aumentaram a ingestão de alimento sem que tivesse ocorrido prejuízo a digestibilidade.

Quando fornecidos em doses adequadas os TC suplementados na dieta, na forma de sorgo (*ad libitum*), ou administrado na forma de TAC, não acarretaram distúrbio gastrintestinal grave aos ovinos ou diminuição no consumo voluntário. A suplementação de TC na dieta pode ser potencialmente utilizada em controles parasitários profiláticos ou de longa duração. A suplementação de pequenos ruminantes com TC oriundos de várias fontes não causou prejuízo na aceitabilidade ou no desempenho animal (Athanasiadou et al., 2000a; Athanasiadou et al., 2001a; Niezen et al., 2002a; Paolini et al., 2003a).

O fornecimento de TC por via oral com uso de seringa apresentou resultados mais rápidos sobre a diminuição da viabilidade dos ovos de helmintos e recuperação de L3 das fezes, porém foi testado apenas em curtos períodos de fornecimento, sendo indicados somente nestes casos, apesar da ação do TC aplicado por dois dias consecutivos perdurar até o

sétimo dia após o tratamento. O uso prolongado de TC via oral, não é indicado, pois implica na manipulação diária dos animais, sendo ainda causador em potencial de quadros de diarreia pastosa, sem considerar-se, ainda, o risco eminente de morte do animal por aspiração, quando aplicado em grandes rebanhos. Os TC provenientes do EQ foram testados com sucesso em tratamentos de curta duração, sendo eficazes na redução do OPG em ovinos (Athanasiadou et al., 2000b).

O VG não foi reduzido a níveis preocupantes, já que os *T. colubriformis* não possuem hábitos hematófagos. Não houve diferença estatística entre as médias de VG. Os valores de hemoglobina também não diferiram estatisticamente, porém podem ter sofrido influência da suplementação do sorgo na dieta, já que o grupo (GII) suplementado com este ingrediente apresentou valores de hemoglobina maiores ($13,26 \text{ g dL}^{-1}$) que os do grupo não infectado ($12,28 \text{ g dL}^{-1}$).

A média dos grupos com relação ao número de OPG apresentou diferença significativa em alguns dias específicos: 29º; 35º e 36º dias pós-infecção, evidenciando o efeito anti-helmíntico dos TC sobre o número de ovos de nematódeos eliminados nas fezes dos ovinos. Apesar do GIV (TAC 2X) apresentar menor número de fêmeas ($P < 0,01$), quando comparado ao controle (GI), seu efeito não ficou estatisticamente comprovado na diminuição do OPG. Contudo o mesmo não ocorreu com o GIII (TAC 1X), no qual se observou OPG inferior ($P < 0,01$). Os parasitos apresentam distribuição binomial negativa, ou seja, poucos animais albergam a maioria dos nematódeos gastrintestinais (AMARANTE et al., 1998), portanto, ocorre o

mesmo com o número de OPG. Devido a este fato, algumas diminuições no número de OPG não são significativas estatisticamente devido ao número reduzido de animais por grupo, que se deve à dificuldade e aos altos custos para a realização de experimentos com número elevado de animais por tratamento.

Os extratos de TC, provenientes de cascas de árvores, são mais facilmente utilizados, pois possuem concentração constante de taninos totais e condensados, durante todo o ano, o mesmo não ocorrendo com plantas forrageiras e sementes de leguminosas. Vitti et al. (2005) relataram a incidência de variações sazonais nas concentrações de nutrientes e principalmente no teor de taninos em plantas forrageiras. Neste trabalho o extrato de acácia foi utilizado por facilidades de aquisição e, também, pelo fato da árvore da qual é extraído o extrato de quebracho (*Schinopsis brasilienses*) estar em processo de extinção no Brasil⁶.

Diferentes fontes de TC foram testadas em todo o mundo, com a finalidade de avaliar-se seu potencial efeito sobre os nematódeos de pequenos ruminantes, entre eles o extrato de quebracho (ATHANASIADOU et al., 2000a e 2000b; PAOLINI et al., 2003a) ou algumas forrageiras como *Lotus corniculatus*, *Cichorium intybus* (MARLEY et al., 2003) e *Hedysarum coronarium* (NIEZEN et al., 2002a). Max et al. (2005) utilizando EQ no controle de helmintos gastrintestinais em ovinos, na dose de

⁶ Através da Portaria Nº. 37-N, de 3 de abril de 1.992, o IBAMA torna pública a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Encontrada no endereço eletrônico: <http://www2.ibama.gov.br/flora/extincao.htm> (acesso em 29/09/2005).

2,4 g EQ kg⁻¹ PV, durante três dias, relataram redução de até 91% na contagem de OPG em animais infectados com *H. contortus*.

Pelo menos, 50% dos ovos eliminados na primeira semana após o tratamento não atingiram o estágio de L3. Fato este, baseado na diminuição da viabilidade dos ovos de helmintos observada principalmente no grupo GIV (TAC 2X), o qual atingiu valores inferiores a 25% dos apresentados pelo grupo GI (controle infectado). Apenas 20% dos ovos eliminados pelos animais do GIV atingiram o estágio de L1 no 7º dia de tratamento, contra 83% do GI. A este indício alia-se a diminuição das L3 recuperadas das fezes dos animais tratados com TC (210 LPG no GIV, contra 400 LPG no GI). Como consequência da diminuição do número de ovos de nematódeos nas fezes dos animais tratados, os TC promovem redução na contaminação das pastagens com larvas infectantes.

Os resultados indicaram que os TC influenciaram negativamente a produção de L3 nas fezes dos animais tratados. Pois, além do grupo GIV, também o GII e GIII apresentaram resultados promissores. No 2º dia pós-tratamento o número de LPG recuperadas do GIV foi visivelmente inferior ao número de larvas recuperadas nas fezes do GI (respectivamente, 58 LPG e 426 LPG). A ação dos TC no GIII foi menos intensa, porém eficiente, pois no último dia de tratamento foram recuperadas das coproculturas do GIII e do GI, respectivamente, 310 LPG e 400 LPG.

A metodologia utilizada na avaliação da viabilidade dos ovos de *T. colubriformis* remove todos os resíduos de TC em consecutivas lavagens. Por isso, sugere-se que a retirada dos TC provenientes do sorgo nesta fase

inviabilizaram a ação dos mesmos, neste teste, fato comprovado pelos altos índices de viabilidade do GII, até mesmo, superando os do GI.

Ao contrário, para realização das coproculturas os TC provenientes do sorgo permanecem nas fezes em contato com os ovos e larvas dos nematódeos, proporcionando um efeito direto sobre as larvas, comprovado pelo número de L3 recuperadas: 256 no GII e 400 no GI. Nesta linha de raciocínio, pode-se sugerir que o efeito do TAC na viabilidade dos ovos seria sobre as fêmeas do parasito, ou então, agiriam rapidamente sobre os ovos durante o trânsito no trato digestório.

Em análises *in vitro*, alguns autores relatam a ação dos TC sobre a viabilidade dos ovos ou larvas de helmintos gastrintestinais (ATHANASIADOU et al., 2001b; NIEZEN et al., 2002b). Entretanto, aplicar os resultados de testes *in vitro* em animais ainda é um desafio, pois as doses de TC devem ser adaptadas à espécie ovina sem causar danos à ingestão ou digestibilidade da dieta.

Existe ainda a dificuldade em predizer qual a concentração (mg mL^{-1}) dos TC no conteúdo do abomaso, intestino delgado ou intestino grosso, onde vivem as diferentes espécies de helmintos. Somente assim, poder-se-ia realmente comparar os resultados *in vitro* com os *in vivo* em relação à dosagem utilizada em mg mL^{-1} .

Maior número de estudos sobre a ação direta dos TC sobre *T. colubriformis* é necessário para que se avalie a utilização exclusiva desses compostos em tratamentos antiparasitários e seu efeito sobre a fase de vida

livre dos helmintos gastrintestinais. Porém a utilização dos TC com a finalidade de se espaçar ou diminuir o número de aplicações de drogas anti-helmínticas durante o ano, seria potencialmente viável.

A contagem de helmintos adultos foi baixa, devido ao pequeno número de L3 infectantes administradas aos animais, avaliando-se assim o efeito dos TC em infecções parasitárias subclínicas. Provavelmente seu efeito anti-helmíntico teria sido mais facilmente detectado em infecções maciças, ou seja, com inoculações experimentais seriadas (semanal de 3000 L3) ou com infecção única de 10 a 30 mil L3 de *T. colubriformis*.

A raça Santa Inês caracteriza-se como relativamente resistente às infecções parasitárias por *H. contortus*, mas não contra *T. colubriformis* (AMARANTE et al., 2004). Portanto, transtornos clínicos indesejáveis poderiam ter ocorrido caso os animais tivessem sido infectados com grande número de larvas.

Alguns autores relatam efeito dos TC sobre a carga parasitária de helmintos parasitas do intestino e não nos de abomaso (ATHANASIADOU et al., 2001b). Outros relatam diminuição na carga parasitária de *H. contortus* após utilização dos TC em níveis adequados à alimentação animal (HÖRDEGEN et al., 2003; MIN e HART, 2003). Por outro lado, Max et al. (2005) relataram ação dos TC apenas contra *H. contortus*, não apresentando efeito contra *T. colubriformis*.

Em contrapartida, muitos trabalhos correlacionam o uso de TC com diminuição na fecundidade das fêmeas de helmintos (ATHANASIADOU

et al 2000a, 2001a; MIN e HART, 2003; PAOLINI et al., 2003a e 2003b), ressaltando sua importância na epidemiologia das helmintoses. Entretanto, Athanasiadou et al. (2000b) relataram que não se pode afirmar que a diminuição na fecundidade das fêmeas seja atribuída aos TC. Butter et al. (2000) obtiveram redução no número de OPG de animais tratados com TC, porém os valores foram semelhantes aos do grupo que recebeu apenas dieta com alta concentração protéica.

Os TC podem formar complexos proteína-tanino no rumem, seqüestrando proteínas de alto valor biológico, evitando sua degradação pelas bactérias da flora ruminal (MAIE et al., 2003). Estes complexos são novamente separados no início do intestino delgado, disponibilizando ao animal maior aporte protéico, na forma de aminoácidos que são absorvidos pelas células do endotélio. Além de proteínas, os taninos podem formar complexos com vários tipos de moléculas, como polissacarídeos, ácidos nucléicos e minerais (MIN e HART, 2003), sendo que estas reações são sempre dependentes de pH ideal (aproximadamente pH 7,0).

Neste trabalho foi detectada diferença significativa no número de fêmeas de helmintos parasitando o ID dos animais do GIII (TAC 2X), quando comparado ao GI (controle infectado), entretanto não houve diferença significativa entre os tratamentos com fontes de TC (sorgo; e TAC 1X), indicando que não houve diferença entre os tratamentos. A melhor eficácia do tratamento TAC 2X evidencia-se, também, pelos melhores efeitos sobre a diminuição de viabilidade e número de L3, além de apresentar menor número de carga parasitária total (GIV: 1309).

7.5. CONCLUSÕES

O uso dos TC para controlar as parasitoses intestinais é promissor, principalmente os provenientes dos extratos de plantas. Porém alguns testes ainda são necessários para validação de doses e duração de tratamentos. Não se pode descartar o potencial de ação destes compostos, ou tão pouco, sua utilização, pelo menos, como coadjuvante em tratamentos profiláticos, os quais utilizam drogas anti-helmínticas convencionais. A principal contribuição dos TC seria a diminuição no número de aplicações, aumentando o intervalo entre as mesmas, diminuindo o risco de desenvolvimento de cepas resistentes às drogas utilizadas.

Rebanhos ovinos criados em regime de produção orgânica ou propriedades com relato de resistência anti-helmíntica múltipla são usuários em potencial de tratamentos alternativos para o controle das helmintoses gastrintestinais, entre eles o uso de fontes de TC.

AGRADECIMENTOS

A doutoranda Raquel Abdallah da Rocha do Departamento de Parasitologia - IB - UNESP, Botucatu, Brasil pelo fornecimento das larvas infectantes de *T. colubriformis*.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T.; GODOY, W. A. C.; BARBOSA, M. A. Nematode egg counts, packed cell volume and body weight as parameters to identify sheep resistant and susceptible to infections by gastrointestinal nematodes. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 14, p. 331-339, 1998.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, p. 91-106, 2004.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1025-1033, 2000a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, London, v. 146, p. 728-732, 2000b.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **British Journal of Nutrition**, London, v. 86, p. 697-706, 2001a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. Direct anthelmintic of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p. 205-219, 2001b.

BUTTER, N. L.; DAWSON, J. M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P. J. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**. Cambridge, v. 134, p. 89-99, 2000.

COOP, R. L.; SYKES, A. R. Interactions between gastrointestinal parasites

and nutrients. In: FREER, M.; DOVE, H. (Ed.). **Sheep Nutrition**. Wallingford: CABI, 2002. p. 313-331.

HÖRDEGEN, P.; HERTZBERG, H.; HEIMANN, J.; LANGHANS, W.; MAURER, V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 51-60, 2003.

JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**, London, v. 120, p. 95-107, 2000.

KAWANO, E. L.; YAMAMURA, M. H.; RIBEIRO, E. L. A. **Efeitos do tratamento com anti-helmínticos em cordeiros naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais sobre os parâmetros hematológicos, ganho de peso e qualidade de carcaça**. 2000. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - CCA, DMVP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

MAIE, N.; BEHRENS, A.; KNICKER, H.; KÖGEL-KNABNER, I. Changes in the structure and protein binding ability of condensed tannins during decomposition of fresh needles and leaves. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 577-589, 2003.

MARLEY C.L.; COOK R., KEATINGE R.; BARRETT J.; LAMPKIN NH. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.112, p.147–155, 2003.

MAX, R. A.; DAWSON J. M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P. J.; KIMAMBO, A. E.; KASSUKU, A. A.; MTENGA, L. A. Effect of condensed tannins extracts on gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Goat keepers cluster reports:** project R7424. Disponível em: [http://uploads.vli.co.uk/lpp/disseminations/R7424/R7424%20\(02\)%20\(9543\)%20Effect%20of%20condensed%20tannin%20extracts.pdf](http://uploads.vli.co.uk/lpp/disseminations/R7424/R7424%20(02)%20(9543)%20Effect%20of%20condensed%20tannin%20extracts.pdf). Acesso em: 20.12.2005.

MIN, B. R.; HART, S. P. Tannins for suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 81, n. 2, p. 102-109, 2003.

NIEZEN, J. H.; CHARLESTON, W. A. G.; ROBERTSON, H. A.; SHELDON, D.; WAGHORN, G. C.; GREN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, p. 229-245, 2002a.

NIEZEN, J. H.; WAGHORN, G. C.; GRAHAM, T.; CARTER, J. L.; LEATHWICK, D. M. The effect of diet fed to lamb on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, n. 4, p. 269-283, 2002b.

PAOLINI, V.; FRAYSSINES, A.; DE LA FARGE, S.; DORCHIES, P.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on established populations and in incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. **Veterinary Research**, Paris, v. 34, p. 331-339, 2003a.

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J. P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, P. H.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infect with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, p. 253-261, 2003b.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223-230, 1986.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166 p.

VITTI, D. M. S. S.; NOZELLA, E. F.; ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C. S.; SILVA FILHO, J. C.; COSTA, C.; BUENO, M. S.; LONGO, C.; VIEIRA, M. E. Q.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GODOY, P. B.; MUELLER-HARVEY, I. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. **Animal Feed Science and**

Technology, Amsterdam, v. 122, p. 123-133, 2005.

YU, F.; BRUCE, L. A.; CALDER, A. G.; MILNE, E.; COOP, R. L.; JACKSON, F.; HORGAN, G. W.; MACRAE, J. C. Subclinical infection with the nematode *Trichostrongylus colubriformis* increases gastrointestinal tract leucine metabolism and reduces availability of leucine for other tissues. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 78, p. 380-390, 2000.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Os taninos condensados podem auxiliar no controle das infecções parasitárias agindo em dois pontos críticos: (i) evitando ou minimizando o estabelecimento de novas infecções parasitárias no animal; já que tem ação direta sobre as larvas infectantes e formas adultas de nematódeos e (ii) agindo na descontaminação das pastagens, já que concentrações elevadas de taninos condensados nas fezes podem agir sobre as larvas de primeiro estágio, impedindo que estas atinjam a fase infectante, auxiliando, assim, na descontaminação das pastagens.

A dose de extrato de acácia ($1,6 \text{ g kg}^{-1} \text{ PV}$), foi a mais adequada ao fornecimento animal. A ação anti-helmíntica do extrato de acácia foi evidenciada, indicando que o uso dos taninos condensados nos controles alternativos das parasitoses gastrintestinais originadas por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, deve ser estudado e testado em regiões com problemas de resistência às drogas anti-helmínticas ou em fazendas que incorporaram o sistema de produção orgânica.

A principal contribuição destes compostos, em longo prazo, seria a diminuição no número de aplicações de anti-helmínticos, aumentando o intervalo entre as mesmas, diminuindo assim, o risco de desenvolvimento de cepas resistentes às drogas utilizadas. Entretanto, mais estudos tornam-se necessários para o desenvolvimento de um produto comercial baseado no extrato de acácia, o qual poderia ser utilizado em grande escala na cadeia de produção de ovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.A.G.; CARMELLO, M.J.; PADOVANI, C.R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.29, p.31-38, 1992.

AMARANTE, A.F.T.; BAGNOL JUNIOR, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.73, p.89-104, 1997a.

AMARANTE, A. F. T.; POMROY, W. E.; CHARLESTON, W. A. G.; LEATHWICK, D. M.; TORNERO, M. T. T. Evaluation of a Larval Development Assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 27, p. 305-311, 1997b.

AMARANTE, A. F. T.; GODOY, W. A. C.; BARBOSA, M. A. Nematode egg counts, packed cell volume and body weight as parameters to identify sheep resistant and susceptible to infections by gastrointestinal nematodes. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 14, p. 331-339, 1998.

AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: Sociedade Brasileira de Zootecnia. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.461-473.

AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.120, p.91-106, 2004.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R.L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30, p.1025-1033, 2000a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R.L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, London, v.146, p.728-732, 2000b.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effect of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p. 205-219, 2001a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R. L. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **British Journal of Nutrition**, London, v. 86, p. 697-706, 2001b.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production system. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 63, p. 631-639, 2004.

BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. The implication of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.81, p.263-272, 1999.

BISSET S.A.; MORRIS, C.A. Feasibility and Implications of Breeding Sheep for Resilience to Nematode Challenge. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.9, n.8-9, p.869-877, 1996.

BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; HOUDIJK, J.G.M.; ROCHA, R.A.; CABRAL FILHO, S.L.; GENNARI, S.M. Influence of dietary supply on resistance to infection with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Inês lambs. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, York, 2003. **Proceedings...** York: BSAS, 2003. p.93.

BRICARELLO, P.A.; GENNARI, S.M.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; VAL, C.M.S.L.; GONÇALVES DE GONÇALVES, I; ECHEVERRIA, F.A.M. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following

natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, 51, 75-83, 2004.

BUTTER, N.L.; DAWSON, J.M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P.J. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**. Cambridge, v.134, p.89-99, 2000.

COLES, G. C.; TRITSCHLER, J. P.; GIORDANO, D. J.; SCHMIDT, A. L. Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 45, p. 50-53, 1988.

COOP, R. L.; SYKES, A. R. Interactions between gastrointestinal parasites and nutrients. In: FREER, M.; DOVE, H. (Ed.). **Sheep Nutrition**. Wallingford: CABI, p. 313-331, 2002.

GEERTS S. AND GRYSSELS B. Anthelmintic resistance in human helminths: a review. **Tropical Medicine and International Health**, London, v.6, n.11, p. 915-921, 2001.

GOPAL, R.M.; POMROY, W.E.; WEST, D.M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.781-786, 1999.

GRAY, G.D.; BARGER, I.A.; LE JAMBRE, L.F.; DOUCH, P.G.C. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pasture contaminated with parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.22, n.4, p.417-425, 1992.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.256, p. 4494-4497, 1981.

HERVÁS, G.; PÉREZ, V.; GIRÁLDEZ, F.J.; MANTECÓN A.R.; ALMAR, M.M.; FRUTOS, P. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.129, p. 44-54, 2003.

HOLMES, P.H. Pathogenesis of trichostrongylosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.18, p.89-101, 1995.

HÖRDEGEN, P.; HERTZBERG, H.; HEIMANN, J.; LANGHANS, W.; MAURER, V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 51-60, 2003.

HOSKIN, S. O., WILSON, P. R., BARRY, T. N., CHARLESTON, W. A. G. & WAGHORN, G. C. Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). **Research in Veterinary Science**, London, v. 68, p. 223-230, 2000.

HOUDIJK, J.G.M.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Reducing the degree of protein scarcity rapidly increases immunity to nematodes in ewes. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.60, p.515-525, 2001.

JACKSON F. Anthelmintic resistance - the state of play. [The British Veterinary Journal](#), London, v.149, p.123-38,1993.

JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**, London, v. 120, p. 95-107, 2000.

KAWANO, E.L.; YAMAMURA, M.H.; RIBEIRO, E.L.A. **Efeitos do tratamento com anti-helmínticos em cordeiros naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais sobre os parâmetros hematológicos, ganho de peso e qualidade de carcaça**. 2000. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - CCA, DMVP, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

KNOX, M. R.; DENG, K.; NOLAN, J. V. Nutritional programming of young sheep to improve later-life production and resistance to nematode parasites: a brief review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 43, p. 1431-1435, 2003.

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

LARRAURI JA, RUPEREZ P & SAURA CALIXTO F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.45, p. 1390–1393, 1997.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.139-146, 1999.

MACRAE J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.52, p.121-130, 1993.

MAIE, N.; BEHRENS, A.; KNICKER, H.; KÖGEL-KNABNER, I. Changes in the structure and protein binding ability of condensed tannins during decomposition of fresh needles and leaves. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 577-589, 2003.

MAKKAR, HPS. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 49, p. 241-256, 2003.

MARLEY C.L.; COOK R., KEATINGE R.; BARRETT J.; LAMPKIN NH. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.112, p.147–155, 2003.

MAX, R. A.; DAWSON J. M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P. J.; KIMAMBO, A. E.; KASSUKU, A. A.; MTENGA, L. A. Effect of condensed tannins extracts on gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Goat keepers cluster reports: project R7424. Disponível em: <[http://uploads.vli.co.uk/lpp/disseminations/R7424/R7424%20\(02\)%20\(9543\)%20Effect%20of%20condensed%20tannin%20extracts.pdf](http://uploads.vli.co.uk/lpp/disseminations/R7424/R7424%20(02)%20(9543)%20Effect%20of%20condensed%20tannin%20extracts.pdf)>. Acesso em: 20.12.2005.**

MEEUSEN, E.N.T. Rational Design of Nematode Vaccines; Natural Antigens. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.26, n.8/9,p.813-818, 1996.

MIN, B. R.; HART, S. P. Tannins for suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 81, n. 2, p. 102-109, 2003.

MINHO, A.P.; CABRAL FILHO, S.L.S.; BRICARELLO, P.A.; RODRIGUES, R.R.; BUENO, I.C.S.; GODOY, P.B.; NOZELLA, E.F.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep naturally infected. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.; REUNIÃO DA ASSOCIASSÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., Porto Alegre, 2003b. **Anais...** Porto Alegre: Associação Latino-americana de Produção animal, 2003.

MINHO A.P.; GODOY, P.B.; GENNARI, S.M.; CASTILHO, L.A.; ABDALLA, A.L. Taninos condensados no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO DE LATINO-AMERICANO DE RICKETTISIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004.

MINHO, A.P.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on *Haemonchus contortus* in sheep experimentally infected In: BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE ANNUAL MEETING, York, 2005. In vitro and analytical techniques; **proceedings...** York: University of York, 2005.

MOLAN, A.; WAGHORN, G. C.; MIN, B. R.; MCNABB, W. C. The effects of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. **Folia Parasitológica**, České Budějovice, v. 47, p. 39-44, 2000.

MOLAN, A. L.; WAGHORN, G. C.; MCNABB, W. C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. **Veterinary Record**, London, v. 150, p. 65-69, 2002.

MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.8, n.1, p.75-86, 1999.

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

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

MUNN, E.A. Rational Design of Nematode Vaccines: Hidden Antigens. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.23, n.4, p.359-366, 1997.

NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; WAGHORN, G.C.; CHARLESTON, W.A.G. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.125, p.281-289, 1995.

NIEZEN, J. H.; WAGHORN, G. C.; CHARLESTON, W. A. G. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 78, p. 13-21, 1998a.

NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; WAGHORN, G.C.; CHARLESTON, W.A.G. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.80, p.15-27, 1998b.

NIEZEN, J. H.; CHARLESTON, W. A. G.; ROBERTSON, H. A.; SHELDON, D.; WAGHORN, G. C.; GREN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, p. 229-245, 2002a.

NIEZEN, J. H.; WAGHORN, G. C.; GRAHAM, T.; CARTER, J. L.; LEATHWICK, D. M. The effect of diet fed to lamb on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, n. 4, p. 269-283, 2002b.

NGUYEN T.M.; BINH D.V.; ORSKOV E.R. effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. **Animal Feed Science and Technology**, Washington, v.121, p.77-87, 2005.

PAOLINI, V.; FRAYSSINES, A.; DE LA FARGE. S.; DORCHIES, P.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on established populations and in incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. **Veterinary Research**, Paris, v. 34, p. 331-339, 2003a.

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J. P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, P. H.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infect with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, p. 253-261, 2003b.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223-230, 1986.

ROCHA, R.A. **Resistência de ovinos Santa Inês e Ile de France às infecções por nematódeos gastrintestinais**. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.55, p.65-75, 2004.

SANGSTER, N.C.; GILL, J. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.15, n.4, p.141-146, 1999.

SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; SOUZA JÚNIOR, F. A. de. Crescimento e características de carcaça de cordeiros mestiços Santa Inês e Somalis x SRD em regime semi-intensivo de criação. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, n. 5, p.948-952, set./out., 2005.

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

SYKES, A. R. Parasitism and production in farm animals. **Animal Production**, v 59, p. 155-172, 1994.

TYRREL, K.L.; DOBSON, R.J.; STEIN, P.A.; WALKDEN-BROWN, S.W. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.107, p.85-93, 2002.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166 p.

URIARTE, J.; WALDERRÁBANO, J. Grazing management strategies for control of parasitic diseases in intensive sheep production systems. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.37, p.243-255, 1990.

WALLER PJ, ECHEVARRIA F, EDDI C, MACIEL S, NARI A & HANSEN JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: general overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.62, p.181-187, 1996.

WALLER, P.J. anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.72, p.391-405, 1997.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. 1. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

VALDERRÁBANO, J.; DELFA, R.; URIARTE, J. Effect of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.104, p.327-338, 2002.

VAN HOURTERT, M.F.J.; BARGER, I.A.; STEELB, J.W.; WINDONA, R.G.; EMERY, D.L. Effects of dietary protein intake on responses of young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.56, n.1-3, p.163-180, 1995.

VAN WYK JA, STENSON MO, VAN DER MERWE JS, VORSTER RJ & VILJOEN G Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretória, v.66, n.4, p.273-284, 1999.

VITTI, D. M. S. S.; NOZELLA, E. F.; ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C. S.; SILVA FILHO, J. C.; COSTA, C.; BUENO, M. S.; LONGO, C.; VIEIRA, M. E. Q.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GODOY, P. B.; MUELLER-HARVEY, I. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 123-133, 2005.

YU, F.; BRUCE, L. A.; CALDER, A. G.; MILNE, E.; COOP, R. L.; JACKSON, F.; HORGAN, G. W.; MACRAE, J. C. Subclinical infection with the nematode *Trichostrongylus colubriformis* increases gastrointestinal tract leucine metabolism and reduces availability of leucine for other tissues. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 78, p. 380-390, 2000.