

Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (*Rutaceae*)

Anthelmintic activity of aqueous extract of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves (*Rutaceae*)

Táise Peneluc^{1*}; Luciana Ferreira Domingues²; Gisele Nunes de Almeida²; Maria Consuelo Caribé Ayres²; Eduardo Luiz Trindade Moreira²; Ana Carla Ferreira da Cruz²; Thereza Cristina Bório dos Santos Calmon de Bittencourt²; Maria Angela Ornelas de Almeida²; Maria José Moreira Batatinha²

¹Curso de Medicina Veterinária, União Metropolitana de Educação e Cultura – UNIME

²Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia – UFBA

Recebido em 22 de Abril de 2008

Aceito em 5 de Outubro de 2009

Resumo

O estudo avaliou a atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* em dois experimentos. O teste in vitro utilizou cultivos de fezes de caprinos tratados com diferentes concentrações do extrato: (134,5 a 335,0 mg.mL⁻¹). No teste in vivo, utilizaram-se 20 ovelhas: G1 tratado durante quatro dias (0,63 g.kg⁻¹ PV); G2, mesma dose, por oito dias; G3, ivermectina (200 µg.kg⁻¹); e G4, sem tratamento. In vitro, observou-se redução de larvas de *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum* superior a 95% nas concentrações de 193,7 a 335,0 mg.mL⁻¹. In vivo, a redução de ovos por grama de fezes foi de 51, 56 e 90%, respectivamente, para G1, G2 e G3, no oitavo dia de tratamento, enquanto para os estágios imaturos e adultos variou de 0 a 91% no G1 e 26 a 94% no G2. A eficácia da ivermectina alcançou 99% para L4 e L5 de *H. contortus* e 100% para as demais espécies de nematoides. Parâmetros clínicos e bioquímicos permaneceram na faixa de normalidade, e as análises histopatológicas não revelaram alterações sugestivas de toxicidade. Embora altamente efetivo in vitro, o extrato aquoso de folhas de *Z. rhoifolium* foi pouco eficaz in vivo na redução de nematoides gastrintestinais.

Palavras-chave: *Zanthoxylum rhoifolium*, fitoterápico, anti-helmíntico, nematóides, pequenos ruminantes.

Abstract

The study evaluated the anthelmintic activity of aqueous extract of *Zanthoxylum rhoifolium* leaves in two experiments. In vitro test, cultures of goat fecal samples were treated with different concentrations of extract (134.5 to 335.0 mg.mL⁻¹). In vivo test was composed of 20 sheep: G1: treated with 0.63 g.kg⁻¹, during four days; G2: same dose, for eight days; G3: ivermectin (200 µg.kg⁻¹) and G4 untreated group. In vitro results showed a reduction of *Haemonchus* spp, *Trichostrongylus* spp. and *Oesophagostomum* spp. larvae greater than 95% in the concentrations between 335.0 and 193.7 mg.mL⁻¹. Faecal egg counting reduction was 51, 56 and 90% in G1, G2 and G3, respectively, while immature stages and adults ranged from 0 to 91% in G1 and from 26 to 94% in G2. Ivermectin effectiveness was 99% for L4 and L5 of *H. contortus* and 100% for other nematodes species. Clinical and biochemical parameters have remained in the normality and histopathologic analyses did not show alteration suggesting absence of toxicity. Although the great effectiveness of *Z. rhoifolium* leaves extract in vitro test, it displayed poor efficiency in vivo regarding gastrointestinal nematodes reduction.

Keywords: *Zanthoxylum rhoifolium*, phytotherapy, anthelmintic, nematodes, small ruminant.

Introdução

As helmintoses em ruminantes representam significativo problema sanitário, tendo em vista o grande número de rebanhos acometidos e as várias alterações orgânicas que podem ocasionar, mesmo com a diversidade de anti-helmínticos sintéticos usados no seu controle que,

por outro lado, tem gerado o desenvolvimento de nematoides resistentes aos medicamentos (MATTOS et al., 2003; MELO et al., 2003; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2006).

Como modo alternativo para o controle de parasitos, as plantas medicinais, com seus diferentes constituintes, vêm sendo estudadas in vitro e in vivo contra espécies de nematoides gastrintestinais de ruminantes (ALMEIDA et al., 2007; BATATINHA et al., 2004; COSTA et al., 2006; KRYCHAK-FURTADO et al., 2005).

*Autor para correspondência: Táise Peneluc

Curso de Medicina Veterinária,

União Metropolitana de Educação e Cultura – UNIME,

Av. Luís Tarquínio Pontes, 600, CEP 42700-000, Lauro de Freitas – BA, Brasil

e-mail: taisepeneluc@hotmail.com

Zanthoxylum rhoifolium, rutácea popularmente conhecida como mamica-de-porca, mamica-de-cadela, laranjeira-brava e espinho-cheiroso, distribui-se principalmente em regiões de cerrado (SALGADO et al., 1998) e florestas Atlântica e Amazônica (PIRANI, 2005). Para essa espécie, foram atribuídas propriedades antibacteriana (GONZAGA et al., 2003; MOURA et al., 1999; da SILVA et al., 2006), antifúngica (da SILVA et al., 2006), antiplasmodial (JULLIAN et al., 2006) e citotóxica para células de carcinomas humanos (da SILVA et al., 2007). Outras espécies, como a *Z. liebmannianum* (NAVARRETE; HONG, 1996), *Z. xanthoxyloides* (AKHTAR et al., 2000) e *Z. zantoxoyloides* (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005) tiveram atividade anti-helmíntica e *Z. chiloperone* efeito leishmanicida (FERREIRA et al., 2002).

Os alcaloides nitidina e cantina têm sido descritos como os constituintes farmacologicamente ativos de *Z. rhoifolium* (FERREIRA et al., 2002; JULLIAN et al., 2006). A seleção de *Z. rhoifolium* foi baseada em relatos populares do seu uso no controle de carrapatos e helmintos de ruminantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do extrato aquoso das folhas, dessa espécie vegetal sobre nematoides gastrintestinais de caprinos in vitro, e in vivo em ovinos

Material e Métodos

Folhas de *Z. rhoifolium*, oriundas do município de Iguai na Bahia, foram identificadas botanicamente, sendo a excisada depositada sob o nº 551 no Herbário Antonio Nonato Marques, da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola, Salvador, Bahia. As folhas foram secas à temperatura ambiente e trituradas em aparelho de *mixer*. Ao material foi adicionada água destilada, em quantidade suficiente para homogeneização mecânica, por um período de 24 horas. A mistura foi filtrada e liofilizada, obtendo-se o extrato aquoso, que foi mantido sob congelamento (-20 °C).

Para avaliar o efeito do extrato aquoso de *Z. rhoifolium* sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais, as amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de caprinos naturalmente infectados, mantidos sem tratamento anti-helmíntico por pelo menos 60 dias. Essas amostras foram submetidas à contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (GORDON; WHITLOCK, 1939), e aquelas que apresentaram OPG maior que 2.000 foram misturadas, formando um único homogeneizado, para a realização dos cultivos de larvas (UENO et al., 1998).

A determinação das concentrações do extrato in vitro foi baseada em resultados de ensaio prévio, no qual a concentração de 335 mg.mL⁻¹ revelou-se como sendo a mais eficaz. A partir desta, cinco outras foram obtidas, 279,1; 232,5; 193,7; 161,4 e 134,5 mg.mL⁻¹, utilizando-se um intervalo fixo de 1,3.

As diferentes concentrações do extrato foram testadas, em triplicatas, nos cultivos de larvas constituídos de 2 g de fezes, 2 g de serragem e 2 mL do extrato. Os controles positivo e negativo foram tratados, respectivamente, com doramectina (1%) e água destilada. O delineamento experimental foi repetido três vezes para assegurar a validação dos resultados. As coproculturas foram incubadas em estufas a 34 °C, durante sete dias, e as larvas

infectantes foram coletadas e identificadas genericamente (UENO; GONÇALVES, 1998).

O efeito de cada concentração dos extratos sobre as larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos foi determinado pelo cálculo dos percentuais pelo teste de redução de larvas por grama de fezes (VIZARD; WALLACE, 1987). As diferenças entre as concentrações dos extratos foram avaliadas pela Análise de Variância Univariada do programa estatístico SPSS através do teste TuKey (Tukey's Honest Significant Difference - Versão 13.0). Devido à variação do número de larvas infectantes observadas nas diferentes concentrações testadas, os valores foram submetidos à transformação logarítmica, empregando-se a equação: $y = \log(x + 25)$ (BOX; COX, 1964).

No teste in vivo, utilizaram-se 20 ovelhas mestiças de Santa Inês de dois a três anos de idade, pesando entre 22 e 43 kg, que permaneceram sem tratamento anti-helmíntico por 60 dias. Módulos de piquetes (1,5 a 2,0 ha) para pastejo rotacionado em *Brachiaria humidicola* e *B. brizantha* foram utilizados por ovelhas mestiças Santa Inês, separadas em lotes de 400 animais, mantidas em módulos formados de 20 a 25 piquetes onde pastejavam livremente e recebiam água e sal mineral *ad libitum*.

A infecção por nematoides gastrintestinais foi confirmada antes do início do experimento, por contagem de OPG (GORDON; WHITLOCK, 1939), e os animais distribuídos em quatro grupos experimentais, G1 e G2 com seis ovinos cada e G3 e G4 com quatro animais cada. O método de alocação por grupos foi de acordo com a contagem de OPG.

Utilizou-se a máxima concentração (59 mg.mL⁻¹) baseada no peso seco do extrato e foi estimada a capacidade ruminal máxima de 500 mL, alcançando a dose de 0,63 g.kg⁻¹. O extrato foi administrado aos animais por via oral. O G1 foi tratado por quatro dias; G2 tratado com a mesma dose durante oito dias; G3 recebeu, oralmente, dose única de ivermectina (200 µg.kg⁻¹), uma vez que já se usava o produto na propriedade de origem dos animais com elevada eficácia; e o G4, controle, sem tratamento. As fezes foram colhidas diretamente da ampola retal para contagem de OPG, coprocultura e identificação de larvas de nematoides gastrintestinais, como descrito anteriormente.

As amostras foram colhidas de todos os animais a cada quatro dias e examinadas individualmente para quantificação e identificação de ovos (UENO; GONÇALVES, 1998). As fezes de cada indivíduo foram homogeneizadas para a realização de coprocultura representativa do grupo. Na avaliação dos testes in vivo, o efeito anti-helmíntico é assegurado quando o percentual de redução do número de larvas é superior a 95% (HONER; BIANCHIN, 1989).

No último dia de cada tratamento, os animais foram necropsiados (UENO; GONÇALVES, 1998) para contagem e identificação dos helmintos gastrintestinais (LEVINE, 1968), baseados nos procedimentos e métodos de eutanásia em animais (Resolução Nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 20 de junho de 2002). No ato da necropsia, foram colhidos, para exames histopatológicos, fragmentos de fígado e rim, fixando-os em formol neutro tamponado a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 5 µm foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (LUNA, 1968) para diagnóstico morfológico.

As avaliações clínica, bioquímica e anátomo-histopatológica foram realizadas para registrar qualquer evento toxicológico do extrato aquoso de *Z. rhoifolium* nos ovinos. O exame clínico dos animais (ROSENBERGER et al., 1993) foi realizado uma vez ao dia, pela manhã, durante os 16 dias do período experimental, sendo registrada a temperatura corporal, as frequências respiratória e cardíaca e os movimentos ruminais. Diariamente, os animais receberiam o extrato aquoso de *Z. rhoifolium* na dose de 0,63 g.kg⁻¹. A cada quatro dias, foi avaliado o peso corporal individualmente.

Para monitorar as funções renal e hepática, as análises de creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT) foram determinadas no soro, separado por centrifugação a 1.000 xg, por 10 minutos e congelado a -20 °C até o momento do uso. Para as dosagens, utilizaram-se kits comerciais DOLES, e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro, com comprimentos de onda específicos para cada prova.

Para avaliação da eficácia de cada tratamento, seguiram-se os critérios estabelecidos pela Portaria Nº. 48/1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para determinação da eficácia de anti-helmínticos em ruminantes, uma vez que não foram definidos esses critérios para produtos naturais, considerando-se altamente efetivo >98%; efetivo 90 a 98%; moderadamente efetivo 80 a 89% e insuficientemente ativo <80%. As diferenças nas concentrações dos extratos e os resultados obtidos das mensurações séricas de AST, GGT, ureia e creatinina e dos parâmetros clínicos foram avaliadas pela Análise de Variância Univariada, pelo programa estatístico SPSS (Versão 13.0).

Resultados e Discussão

Nos testes in vitro, o extrato aquoso das folhas de *Z. rhoifolium* reduziu o número de larvas de nematoides gastrintestinais ($p < 0,05$) nas quatro maiores concentrações, de 335 a 193,7 mg.mL⁻¹, com o percentual de redução do número de larvas superior a 95% (Tabela 1). A atividade antiparasitária do gênero *Zanthoxylum* foi registrada contra *Haemonchus contortus* em ovinos (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005) e contra os protozoários *Leishmania amazonensis* (FERREIRA et al., 2002) e *Plasmodium falciparum* (JULLIAN et al., 2006; ROSS et al., 2004). Na investigação in vitro

sobre a atividade antiplasmodial de *Z. rhoifolium*, constatou-se que compostos alcaloides, como a nitidina, apresentou potente efeito sobre o protozoário *P. falciparum*, por sua ação citotóxica, inibidora da DNA topoisomerase I (JULLIAN et al., 2006). O α -sanshool isolado de *Z. liebmannianum* reduziu o OPG em ovinos naturalmente infectados, após administração oral de 200 mL a 4% (NAVARRETE; HONG, 1996).

Nos testes in vivo, observou-se diminuição da média do número de ovos, no oitavo dia de tratamento, para os grupos G2, G3 e G4, enquanto para o G1 verificou-se aumento do OPG. Contudo, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Os percentuais de redução do número de ovos foram 51 e 56% para os grupos G1 e G2, respectivamente. As coproculturas foram formadas por um único homogeneizado, por grupo experimental, cujos percentuais de larvas de terceiro estágio (L3) dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum* foram, respectivamente, para o G1 = 52; 13; 29 e 6%; G2 = 92, 5, 0 e 3%; G3 = 99, 0, 0 e 1%; e para o G4 = 6, 38, 12 e 44%.

Embora estatisticamente não tenham sido observadas diferenças significativas no OPG entre os tratamentos, seja com o extrato aquoso de *Z. rhoifolium*, seja com ivermectina, numericamente, o grupo G1 excedeu dos demais grupos, em virtude da carga parasitária elevada apenas em um animal. Essa resposta individual explica-se pela heterogeneidade na susceptibilidade do hospedeiro à infecção pelo parasito, por causa da distribuição binomial negativa (AMARANTE et al., 2004; VON ZUBEN, 1997). Esse evento pode ter contribuído para dificultar a manifestação mais evidente de possíveis diferenças entre os grupos tratados, apesar dos testes de padronização indicarem o uso de animais com média de contagem de ovos de helmintos acima de 150 ovos (COLES et al., 1992). Provavelmente, trabalhando-se com animais com maior carga parasitária, os resultados poderiam ser mais evidenciados (KRYCHAK-FURTADO, 2006).

O percentual de redução de larvas do quarto (L4) e quinto (L5) estágios foi inferior a 95% para os grupos de ovinos tratados com extrato aquoso de *Z. rhoifolium* (Tabela 2). No entanto, quando se comparou o percentual de redução de nematoides das espécies *Trichostrongylus axei*, *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* em relação aos dias de tratamento, constatou-se melhor eficácia para o grupo G2. A eficácia da ivermectina foi

Tabela 1. Médias, desvios-padrão e percentuais de redução (PR) do número de larvas de terceiro estágio (L3) de nematoides gastrintestinais de caprinos, obtidas de coproculturas tratadas com extrato aquoso de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Concentrações do extrato (mg.mL ⁻¹)	<i>Haemonchus</i> spp.		<i>Oesophagostomum</i> spp.		<i>Trichostrongylus</i> spp.		Total de Larvas (L3)	
		PR		PR		PR		PR
335	0 ± 0,00 ^a	99	0 ± 0,00 ^a	99	0 ± 0,00 ^a	98	0 ± 0,00 ^a	99
279,1	3,88 ± 11,66 ^a	99	0,55 ± 1,66 ^a	99	0,55 ± 1,66 ^a	98	5 ± 13,22 ^a	99
232,5	33,88 ± 48,65 ^a	98	0 ± 0,00 ^a	99	0,55 ± 1,66 ^a	98	34,44 ± 48,37 ^a	99
193,7	118,88 ± 144,71 ^a	96	12,77 ± 15,83 ^a	98	19,44 ± 16,47 ^a	96	151,11 ± 173,49 ^a	98
161,4	257,77 ± 85,88 ^b	85	86,11 ± 43,64 ^b	93	62,77 ± 57,28 ^b	91	406,66 ± 114,64 ^b	89
134,5	386,66 ± 152,90 ^b	75	105,55 ± 40,57 ^b	91	59,44 ± 39,56 ^b	90	551,66 ± 158,84 ^b	86
Doramectina 1%	0 ± 0,00 ^a	99	0 ± 0,00 ^a	99	0 ± 0,00 ^a	98	0 ± 0,00 ^a	99
Controle	1882,77 ± 630,71 ^b	0	1740,55 ± 1322,80 ^b	0	937,22 ± 1111,22 ^b	0	4560,54 ± 2565,79 ^b	0

Letras não coincidentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); PR = Percentual de Redução.

Tabela 2. Médias, desvios-padrão (DP) e percentuais de redução (%) do número de nematoides gastrintestinais recuperados de ovinos mestiços de Santa Inês, após o tratamento com o extrato aquoso de folhas de *Zantoxylum rhoifolium*.

Gêneros	G1		G2		G3		G4	
	Média ± DP	%	Média ± DP	%	Média ± DP	%	Média ± DP	%
<i>Haemonchus</i>	1012,50 ± 1475,79 ^a	73	1607,50 ± 1265,21 ^a	26	252,50 ± 287,21 ^a	99	1870 ± 776,44 ^a	0
<i>Trichostrongylus</i>	3347,50 ± 6351,62 ^{ab}	12	402,50 ± 527,28 ^{ab}	83	0,0 ± 0,0 ^a	100	1678,66 ± 1371,09 ^b	0
<i>Cooperia</i>	907,50 ± 1729,00 ^a	0	62,50 ± 125,00 ^a	68	0,0 ± 0,0 ^a	100	97,5 ± 195 ^a	0
<i>Oesophagostomum</i>	13,50 ± 12,79 ^a	91	7,00 ± 5,94 ^a	94	0,0 ± 0,0 ^a	100	73,00 ± 48,92 ^b	0

Letras diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa ($p < 0,05$); G1- 0,63 g.kg⁻¹ / 4 dias; G2- 0,63 g.kg⁻¹ / 8 dias; G3- Ivermectina (200 µg.kg⁻¹); G4 – Sem Tratamento.

de 99% para os estágios L4 e L5 de *H. contortus* e de 100% para as demais espécies de nematoides (Tabela 2).

As diferenças no percentual de redução de parasitas entre estudos in vitro e in vivo têm sido registradas. A atividade anti-helmíntica, in vitro, do suco de alho e do seu extrato metanólico, revelou elevada eficácia sobre larvas do gênero *Haemonchus* (ALMEIDA et al., 2004), contudo, quando caprinos foram tratados por via oral com o suco de alho (1 g.kg⁻¹ PV), registrou-se baixo percentual de redução de nematoides gastrintestinais (BATATINHA et al., 2004).

A ausência de similaridade entre resultados de testes anti-helmínticos in vitro comparados com as avaliações in vivo pode ser justificada pela variação ambiental e duração do tratamento (MARTIN et al., 2001). No presente trabalho, observou-se que os animais do grupo G2, tratados com o dobro do tratamento do G1, revelaram potencial anti-helmíntico para três gêneros de nematoides, exceto *Haemonchus*. Essa não similaridade pode ser consequente à ação de micro-organismos do rúmen ou de determinados compostos sobre os constituintes químicos ativos, por influência na absorção ou solubilidade (ADEMOLA et al., 2005; BATATINHA et al., 2004). A microflora ruminal pode ser responsável pela alteração do metabolismo ou do mecanismo de ação de alguns nutrientes, medicamentos ou materiais bioativos, quando administrados oralmente (VANDAMME; ELLIS, 2004). No entanto, nenhuma referência foi encontrada sobre o metabolismo ruminal dos constituintes da *Z. rhoifolium*. A ausência de efeitos, nos testes in vivo, pode ser explicada também pela baixa concentração utilizada comparativamente à dose efetiva nos testes in vitro, além dos extratos utilizados nos testes in vitro estarem em contato direto com os parasitos, fato que não ocorre nas avaliações in vivo.

O período de jejum antes da administração deve ser considerado para avaliação de efeitos farmacológicos de plantas medicinais (SILVA et al., 2003). No presente estudo, os animais foram mantidos em jejum por, pelo menos, 24 horas antes de receberem os tratamentos, tempo considerado por Egualé et al. (2007) suficiente para facilitar a propagação da substância testada pelo trato gastrintestinal. Por outro lado, o efeito in vivo provavelmente poderia ser potencializado pelo aumento da dose ou pela repetição da dose por mais tempo. Isso poderia aumentar o tempo de contato entre os constituintes ativos de *Z. rhoifolium* e o parasito e, dessa forma, aumentar a redução na sua fecundidade. Contudo, efeitos tóxicos no hospedeiro podem ser evidenciados, o que sugere cautela (ANTHONY et al., 2005).

O tratamento foi eficaz contra *O. columbianum*, contudo, os ovinos dos grupos tratados com o extrato (G1 e G2) e com o

anti-helmíntico (G3) apresentaram uma infecção leve (<50) por esse parasito, quando comparados aos animais não tratados (G4), no qual a infecção foi moderada (50-100) (UENO; GONÇALVES, 1998). Contudo, deve-se ponderar que, em animais previamente expostos, os estágios adultos desse nematoide são raros, decorrentes da formação de nódulos pelo desenvolvimento da resposta imune (hipersensibilidade do tipo IV) que retêm o quarto estágio larval na mucosa intestinal (DASH, 1973).

Na avaliação clínica dos ovinos, os parâmetros de temperatura corporal, frequências respiratória e cardíaca e movimentos ruminais permaneceram na faixa de normalidade, antes (dia 0) e durante (4º e 8º dias) a administração do extrato, sendo considerados sem significância clínica. A comparação das médias em cada momento e entre os grupos não apresentou diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Não foram observadas reações de fotossensibilização em nenhum dos animais tratados com o extrato, e as médias de peso no final do experimento não diferiram entre os grupos tratados e controle ($p > 0,05$).

Os valores dos marcadores bioquímicos séricos, que avaliaram as funções hepática e renal dos animais, conservaram-se na faixa de normalidade, apesar do aumento nas médias dos valores das concentrações de AST, creatinina e uréia, no 8º. dia de tratamento; não houve, contudo, diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos e os períodos. Com relação à dosagem de GGT, entre os animais tratados com o extrato vegetal (G1 e G2) e os grupos-controle (G3 e G4), foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no 4º dia, enquanto no 8º dia a média dos valores de GGT dos ovinos do grupo G4 foi superior aos demais grupos ($p < 0,05$).

A administração oral do extrato aquoso foi bem tolerada pelos ovinos, uma vez que não apresentaram alterações laboratoriais ou clínicas significantes. Considerando-se que todos os valores de AST, GGT, uréia e creatinina encontraram-se dentro dos valores de referência para ovinos (KANECO et al., 1997), e que as diferenças significativas observadas para GGT referem-se ao grupo controle, o qual não recebeu o extrato da planta nem o anti-helmíntico, registra-se que o extrato aquoso de *Z. rhoifolium*, na concentração utilizada, não causou alterações que pudessem sugerir toxicidade nos animais. Não há registro sobre intoxicação por *Z. rhoifolium* em animais de produção, no entanto, o amido α -sanshool, constituinte isolado de *Z. liebmannianum*, quando injetado intraperitonealmente em ratos, induziu convulsões tônico-clônicas (NAVARRETE; HONG, 1996).

Macroscopicamente, não foram encontradas alterações no fígado e rins dos ovinos tratados com o extrato aquoso de *Z. rhoifolium* e, nas análises histológicas, as alterações foram de natureza degenerativa e inflamatória de caráter discreto, apresentando principalmente tumefação celular e esteatose hepática e nefrite intersticial focal e esteatose renal discreta, não havendo justificativas que associem essas alterações aos constituintes ativos presentes na planta, uma vez que os animais tratados com 0,63 g.kg⁻¹ de peso vivo do extrato, e aqueles pertencentes aos grupos-controle apresentaram lesões semelhantes em termos de natureza e caráter.

Com este estudo, pode-se concluir que o extrato aquoso de folhas de *Z. rhoifolium*, nas concentrações utilizadas, foi efetivo no teste *in vitro*, porém pouco eficaz *in vivo*, na redução de nematoides gastrintestinais de ovinos mestiços Santa Inês. A partir desses resultados, novas metodologias poderão ser utilizadas a fim de obter a validação do efeito anti-helmíntico de *Z. rhoifolium* em ruminantes, bem como em outras espécies animais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Doutora Marta Fagundes Neves pela preparação e registro da exsiccata; aos médicos veterinários Adriana Cavalcante, que cedeu gentilmente os animais, e José Borges Nery Junior, pelo fornecimento do material vegetal; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Referências

- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of Sheep: Studies *in vitro* and *in vivo*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 3, p. 223-235, 2005.
- ALMEIDA, M. A. O. et al. Avaliação *in vitro* do extrato alcoólico e do suco de alho (*Allium sativum* Linn.) sobre nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2004.
- ALMEIDA, M. A. O. et al. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Mentha piperita* L. e de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre cultivos de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 57-59, 2007.
- AKHTAR, M. S. et al. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2000.
- AMARANTE, A. F. T. et al. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1-2, p. 91-106, 2004.
- ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 462-468, 2005.
- BATATINHA, M. J. M. et al. Efeitos *in vitro* dos extratos de folhas de *Musa cavendishii* Linn. e de sementes de *Carica papaya* Linn. sobre culturas de larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 1, p. 11-15, 2004.
- BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.
- COLES, G. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importances. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.
- COSTA, C. T. C. et al. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 306-310, 2006.
- DASH, K. M. The life cycle of *Oesophagostomum columbianum* (Curtice, 1890) in sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 3, n. 6, p. 843-851, 1973.
- Da SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Antibacterial and antifungal activities of volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 9, p. 657-659, 2006.
- Da SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.
- EGUALE, T. et al. *Haemonchus contortus*: *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 340-345, 2007.
- FERREIRA, M. E. et al. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 199-202, 2002.
- GONZAGA, W. et al. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n. 4, p. 371-374, 2003.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A. New technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.
- HONER, M. R.; BIANCHIN, I. **Teste para quantificar a resistência de nematódeos contra produtos anti-helmínticos**. Campo Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -CNPQ, 1989. 5 p. (Comunicado Técnico, nº 32).
- HOUNZANGBE-ADOTE, M. S. et al. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 78, n. 2, p. 155-160, 2005.
- JULLIAN, V. et al. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 348-352, 2006.
- KANECO, J. J.; HARVEI, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KRYCHAK-FURTADO, S. et al. Efeito de *Carica papaya* L. (Caricaceae) e *Musa paradisiaca* Linn. (Musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 191-197, 2005.
- KRYCHAK-FURTADO, S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 127f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1968. 600 p.

- LUNA, L. G. Preparation of tissue. In: _____ **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3 ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258 p.
- MARTIN, M.; MCORKLE, C. M.; MATHIAS, E. **An Annotated Bibliography of Community Animal Healthcare. Ethnoveterinary Medicine**. London: Intermediate Technology Development Group Publishing, 2001. p. 1379-1384.
- MATTOS, M. J. T. et al. Sensibilidade dos nematódeos gastrintestinais de caprinos ao ivermectin na região da Grande Porto Alegre, RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 3, p. 155-160, 2003.
- MELO, A. C. F. L. et al. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.
- MOURA, N. F. et al. Antibacterial activity of *Zanthoxylum rhoifolium*. **Fitoterapia**, v. 69, n. 3, p. 271-272, 1999.
- NAVARRETE, A.; HONG, E. Anthelmintic properties of alpha-sanshool from *Zanthoxylum liebmannianum*. **Planta Medica**, v. 62, n. 3, p. 250-251, 1996.
- PIRANI, J. R. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: **RUTACEAE. Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p. 189-204, 2005.
- ROSENBERGER, G. et al. **Exame clínico dos bovinos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.
- ROSS, S. A. et al. Syncarpamide, a New Antiplasmodial (+)-Norepinephrine Derivative from *Zanthoxylum syncarpum*. **Journal Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 88 -90, 2004.
- SALGADO, M. A. S. et al. Crescimento inicial de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em diferentes condições de sombreamento. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 3, p. 37-45, 1998.
- SILVA, S. L. C. et al. Ação anti-helmíntica de extratos brutos de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr. e *Andira fraxinifolia* Benth., em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetraptera*. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 58, p. 23-29, 2003.
- UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 2 ed. República Dominicana: Universidade Autónoma de Santo Domingo, 1998. 166 p.
- VANDAMME, T. H. F.; ELLIS, K. J. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1415-1436, 2004.
- VIZARD, A. L.; WALLACE, R. J. A simplified faecal egg count reduction test. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, n. 4, p. 109-111, 1987.
- Von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 99-107, 2006.
- Von ZUBEN, C. J. Implicações da agregação espacial de parasitas para a dinâmica populacional na interação hospedeiro-parasita. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 523-530, 1997.