

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DO HIDROLATO DE *Mentha villosa* Huds. (LAMIACEAE) EM NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS**

**Érica Maria Nascimento**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DO HIDROLATO DE *Mentha villosa* Huds. (LAMIACEAE) EM NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS**

**Érica Maria Nascimento**

Orientador: Dr. John Furlong

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2008

Nascimento, Érica Maria

Avaliação do efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos / Érica Maria Nascimento. -- 2008.

65 f. il.

Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal)–  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

1. Plantas medicinais. 2. Fitoterapia. 3. Helmintos. I. Título.

CDU 615.32:633.88

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DO HIDROLATO DE *Mentha villosa* Huds. (LAMIACEAE) EM NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS.**

**Érica Maria Nascimento**

Orientador: Dr. John Furlong

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Aprovada em 29 de fevereiro de 2008



Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata

Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora



Dr. John Furlong

Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora

**Dedico,**

Aos meus pais, Expedito e Isabel, pelo exemplo e incentivo em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, escolhida a dedo por Deus, pelo apoio durante toda a minha vida;

Ao Dr. John Furlong pela orientação, incentivo e principalmente pelo bom humor, carinho e amizade de sempre;

Aos membros da banca Dr. Daniel Sales Pimenta, incentivador deste estudo e cuja parceria possibilitou a realização dos meus primeiros estudos com plantas medicinais e Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata pela contribuição e pelo socorro sempre prestado com gentileza;

Aos pesquisadores Dra. Ana Carolina de Souza Chagas e Dr. Erik Daemon Pinto pela colaboração e sugestões ao trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia: Éder, Aline, Carol, Elder, Dani, Bárbara, Ana e a todos que tanto me ajudaram na execução dos experimentos;. Muito obrigada a todos vocês!

Aos colegas do Campo Experimental Santa Mônica: Sydney, João, Adilson, Marcelo, Marina, Leandro, Renata e Lísia, também à Juliana pela companhia e auxílio no trabalho de campo.

Ao Vanderson e colegas do laboratório de fitoquímica do Departamento de Botânica da UFJF, pelo auxílio durante as intermináveis extrações. Aos colegas da Central Analítica de Far-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, pela realização das análises cromatográficas;

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas - Comportamento e Biologia Animal, pela oportunidade de realização deste estudo.

A todos os demais professores, colegas e funcionários da UFJF e da Embrapa que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 - Infecções por nematóides gastrintestinais.....	3
2.2 - Resistência dos nematóides a anti-helmínticos sintéticos.....	4
2.3 - Histórico da utilização de plantas medicinais.....	4
2.4 - Óleos essenciais.....	5
2.5 - Plantas utilizadas como anti-helmínticas.....	5
2.6 - Considerações gerais sobre <i>Mentha</i> e sobre a família Lamiaceae.....	6
2.7 - Caracterização de <i>Mentha villosa</i> Huds.....	6
2.8 - Composição do óleo essencial de <i>Mentha villosa</i> Huds. ....	7
2.9 - Propriedades de <i>Mentha villosa</i> Huds. e do óxido de piperitenona.....	8
2.10 - Uso popular de <i>Mentha</i> spp. L. como antiparasitário.....	9
3 - CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E HIDROLATO DE <i>Mentha villosa</i> Huds. (LAMIACEAE).....	11
3.1 - RESUMO.....	11
3.2 - INTRODUÇÃO.....	11
3.3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.3.1 - Coleta da Planta.....	12
3.3.2 - Extração do óleo essencial e hidrolato.....	12
3.3.3 - Análise cromatográfica do óleo essencial e do hidrolato.....	13
3.3.4 - Identificação dos constituintes.....	14
3.4 - RESULTADOS.....	14
3.5 - DISCUSSÃO.....	17
3.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
4 - CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO <i>IN VITRO</i> DO HIDROLATO DE <i>Mentha villosa</i> Huds. ....	22
4.1 - RESUMO.....	22



4.2 - INTRODUÇÃO.....	22
4.3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.3.1 - Coleta da Planta.....	23
4.3.2 - Extração do óleo essencial e hidrolato.....	23
4.3.3 - Preparação das diluições a serem testadas.....	23
4.3.4 - Teste anti-helmíntico <i>in vitro</i> .....	24
4.4 - RESULTADOS.....	26
4.5 - DISCUSSÃO.....	28
4.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
5 - CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO <i>IN VIVO</i> DO HIDROLATO DE <i>Mentha villosa</i> Huds. SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS.....	32
5.1 - RESUMO.....	32
5.2 - INTRODUÇÃO.....	32
5.3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.3.1 - Coleta da Planta e extração do hidrolato.....	33
5.3.2 - Animais experimentais.....	33
5.3.3 - Infecção artificial dos animais.....	34
5.3.4 - Teste anti-helmíntico <i>in vivo</i> .....	35
5.3.5 - Análise dos resultados.....	37
5.4 - RESULTADOS.....	38
5.5 - DISCUSSÃO.....	39
5.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Substâncias detectadas em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, realizada na Central Analítica da Far-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, com seus respectivos tempos de retenção (T.R.), Índices de Kovats consultados em literatura (IK-LIT) e calculados (IK-CAL) e teores relativos dessas substâncias nas amostras de óleo essencial e hidrolato extraídos por hidrodestilação a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds., coletadas na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora.....17
- TABELA 2: Número de larvas de nematóides gastrintestinais obtidas a partir de coprocultura realizada na Embrapa Gado de Leite, Juiz de fora, MG, utilizando-se amostras de fezes de bezerras criadas no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite e localizado no Município de Valença, RJ, contaminadas com ovos de nematóides gastrintestinais, submetidas a tratamento com água destilada (controle-negativo), albendazol (controle-positivo) e hidrolato extraído por hidrodestilação a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds. e testado em cinco concentrações (H 20%, H 40%, H 60%, H 80%, H 100%) (n = tamanho da amostra; x = média; DP = desvio-padrão; IC = intervalo de confiança de 95%).....27
- TABELA 3: Porcentagem de eficácia anti-helmíntica do hidrolato extraído a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds., administrado oralmente, durante dez dias consecutivos (dias 0 a +9), na dosagem de 1 ml/40 kg/dia, a bezerras, com oito a dez meses de idade, infectadas com nematóides gastrintestinais, criadas no Campo Experimental de Santa Mônica (Valença, RJ), pertencente à Embrapa Gado de Leite. A porcentagem de eficácia foi calculada com base na redução da contagem média de ovos de nematóides por grama de fezes (opg), obtida por comparação entre a contagem de opg realizada no período de pré-tratamento (dias -3 a -1) com a contagem durante o tratamento e no pós-tratamento.....38

TABELA 4: Contagem de ovos de nematóides por grama de fezes (opg) de bezerras mestiças (Holandês x Zebu), com oito a dez meses de idade, infectadas com nematóides gastrintestinais, tratadas com hidrolato de *Mentha villosa* Huds. administrado oralmente, durante dez dias consecutivos (dias 0 a +9), na dosagem de 1 ml/40 kg/dia (n = 5 bezerras); Ricobendazole® (aplicado no dia 0, por via subcutânea, em dose única de 1 ml/40 kg), constituindo o grupo controle-positivo (n = 6 bezerras) e água destilada, administrada oralmente, durante dez dias consecutivos (dias 0 a +9), constituindo o grupo controle-negativo (n = 6 bezerras) em teste anti-helmíntico *in vivo* realizado no Campo Experimental de Santa Mônica (Valença, RJ), pertencente à Embrapa Gado de Leite. As análises de opg foram realizadas durante os dias de pré-tratamento (dia -1), tratamento (dias +0 a +9) e pós-tratamento (dias +17 e +24).....39

**LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1: Partes aéreas de *Mentha villosa* Huds., oriunda da Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, em estágio reprodutivo, apresentando inflorescência no ápice caulinar.....7
- FIGURA 2: Estrutura molecular do óxido de piperitenona (1,2-epoxi-pulegona), também denominado de “rotundifolona”, presente no óleo essencial de *Mentha villosa* Huds.....8
- FIGURA 3: Extração do óleo essencial e hidrolato, pelo método de hidrodestilação em aparelho *Clevenger* a partir de ramos e folhas de *Mentha villosa* Huds., realizada no Laboratório de Fitoquímica no Departamento de Botânica/UFJF. A) Aparelho *Clevenger*. B) Detalhe do reservatório do aparelho, mostrando o óleo essencial, menos denso e o hidrolato de *M. villosa*.....13
- FIGURA 4: Cromatograma obtido em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do óleo essencial extraído por hidrodestilação a partir de ramos e folhas de *Mentha villosa* Huds., cultivada na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora.....15
- FIGURA 5: Cromatograma obtido em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do hidrolato extraído por hidrodestilação a partir de ramos e folhas de *Mentha villosa* Huds., cultivada na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora.....16
- FIGURA 6: Recipientes contendo coprocultura, devidamente identificados e posicionados de maneira invertida para obtenção de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de bovinos em experimento de avaliação da atividade anti-helmíntica de *Mentha villosa* Huds., realizado no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de leite, Município de Juiz de fora, MG.....25

FIGURA 7: Número de larvas de nematóides gastrintestinais obtidas a partir de teste anti-helmíntico *in vitro* da atividade ovicida em bovinos, pelo método de coprocultura quantitativa, realizada na Embrapa gado de leite, Juiz de Fora, MG. As amostras de fezes provenientes de bezerras mestiças (Holandês x Zebu) criadas no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, (Município de Valença, RJ) contendo ovos de nematóides gastrintestinais, foram submetidas a tratamento com hidrolato de *M. villosa* Huds. em cinco diferentes concentrações (H 20%, H 40%, H 60%, H 80%, H 100%), a tratamento com água destilada (controle-negativo) e com Albendazol® (controle-positivo).....27

FIGURA 8: Porcentagem de eficácia do hidrolato extraído por hidrodestilação a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds., em teste anti-helmíntico *in vitro* da atividade ovicida em nematóides gastrintestinais de bovinos, pelo método de coprocultura quantitativa, realizada na Embrapa gado de leite, Juiz de Fora, MG. Amostras de fezes de bezerras mestiças (Holandês x Zebu) criadas no Campo Experimental de Santa Mônica (Valença, RJ), pertencente à Embrapa Gado de Leite, contendo ovos de nematóides gastrintestinais, foram submetidas a tratamento com hidrolato de *M. villosa* em cinco concentrações (H 20%, H 40%, H 60%, H 80%, H 100%) e a Albendazol® (controle-positivo). Para o cálculo da porcentagem de eficácia foi comparado o número de larvas obtidas nos grupos de tratamento e controle-positivo, com aquele obtido no grupo controle-negativo, no qual utilizou-se água destilada.....28

FIGURA 9: Recipiente contendo coprocultura realizada a partir de amostras de fezes de bezerras mestiças (Holandês x Zebu) contaminadas com ovos de nematóides gastrintestinais, posicionado de maneira invertida, para possibilitar a saída de larvas infectantes (L3) através dos espaços entre o frasco de vidro e a placa de Petri, posteriormente utilizadas em infecção artificial de bezerras criadas no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no Município de Valença, RJ. ....34

FIGURA 10: Administração oral em bezerra mestiça (Holandês x Zebu) do hidrolato de *Mentha villosa* Huds., por meio de uma seringa descartável, na dose de 0,1 ml/kg/dia durante dez dias consecutivos, em teste anti-helmíntico *in vivo* dessa substância, realizado nos meses de agosto e setembro de 2007, no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no Município de Valença, RJ.....36

FIGURA 11: Bezerras mestiças (Holandês x Zebu) em piquete, alimentadas com capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum), além de ração (2 kg/animal/dia) e água *ad libitum*, onde foram mantidas das 8:30 às 16:00 durante os dias de realização do teste anti-helmíntico *in vivo* do hidrolato de *Mentha villosa* Huds., realizado durante os meses de agosto e setembro de 2007 no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no Município de Valença, RJ.....37

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
°C	graus Celsius
eV	elétron-volt
µm	micrômetro
H 20%	Hidrolato de <i>Mentha villosa</i> a 20%
H 40%	Hidrolato de <i>Mentha villosa</i> a 40%
H 60%	Hidrolato de <i>Mentha villosa</i> a 60%
H 80%	Hidrolato de <i>Mentha villosa</i> a 80%
H 100%	Hidrolato de <i>Mentha villosa</i> a 100%
IK	índice de Kovats
IK-LIT	índice de Kovats consultados em literatura
IK-CALC	índices de Kovats calculados
kg	quilograma
l	litro
m	metro
min	minuto
T.R.	tempo de retenção
opg	ovos por grama de fezes
rpm	rotações por minuto
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

## RESUMO

Atualmente tem sido de grande interesse o estudo da atividade anti-helmíntica de plantas medicinais em ruminantes. *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) é uma erva aromática que tem sido utilizada popularmente devido às diversas propriedades medicinais, inclusive para o controle de verminoses, sendo o óxido de piperitenona, substância presente no óleo essencial da planta, possivelmente responsável por esta atividade. O presente estudo teve como objetivo determinar a composição química do óleo essencial e respectivo hidrolato de *M. villosa* por meio de análise cromatográfica e testar a atividade anti-helmíntica do hidrolato desta planta tanto *in vitro*, pelo método de coprocultura quantitativa, quanto *in vivo*, em bezerras infectadas por nematóides gastrintestinais, através do teste de redução no número de ovos de nematóides nas fezes dos hospedeiros. A análise cromatográfica mostrou a presença de óxido de piperitenona como constituinte majoritário no óleo essencial e no hidrolato de *M. villosa* (teores relativos de 65,16% e 93,62% respectivamente). No teste *in vitro*, o hidrolato nas concentrações de 40%, 60% e 80% e 100% apresentou porcentagem de eficácia de 91,88%, 94,15%, 98,40% e 100% respectivamente, mostrando atividade ovicida significativa sobre nematóides gastrintestinais de bezerros. Entretanto, os resultados do teste *in vivo* mostraram ausência de atividade anti-helmíntica do hidrolato de *M. villosa* na dose de 0,1ml/Kg/dia nos animais tratados.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais, fitoterapia, helmintos.



## ABSTRACT

Currently, it has been of great interest to study the anthelmintic activity of medicinal plants in ruminants. *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) is an aromatic herb that has been popularly used based on various medicinal properties, including for the control of nematode infections, being piperitenone oxide, the substance present in the essential oil of this plant, possibly responsible for this activity. This study aimed to determine the chemical composition of the essential oil and respective hidrolact of *M. villosa* through chromatographic analysis and test the anthelmintic activity of hidrolact of this plant both *in vitro*, by the quantitative coproculture method, and *in vivo*, in calves infected with gastrointestinal nematodes, through the egg count reduction test in feces of the hosts. The chromatographic analysis showed the presence of piperitenone oxide as the major constituent in essential oil and hidrolact of *M. villosa* (relative levels of 65.16% and 93.62% respectively). In *in vitro* tests, the hidrolact at the concentrations 40%, 60% and 80% and 100% obtained percentage of effectiveness of 91.88%, 94.15%, 98.40% and 100% respectively, showing significant ovicidal activity against gastrointestinal nematodes in calves. However, the hidrolact of *M. villosa* showed no *in vivo* anthelmintic activity at 0,1 ml/Kg/day on the treated animals.

**Key-words:** Medicinal plants, phytotherapy, helminths.

## INTRODUÇÃO

A contaminação por helmintos é um sério problema enfrentado por criadores de bovinos atualmente em todo o mundo. As helmintoses gastrintestinais podem levar a um comprometimento da saúde do animal parasitado, devido aos sinais clínicos adversos provocados por essas infecções, tais como: fraqueza, diarreia e perda de peso (SPÓSITO FILHA *et al.*, 2002)

O controle das helmintoses é frequentemente realizado pelo uso de anti-helmínticos sintéticos, entretanto estes apresentam algumas desvantagens, como altos custos e risco de poluição ambiental (MACIEL *et al.*, 2006). Além disto, segundo RANGEL *et al.* (2005), estes produtos são largamente utilizados na pecuária e, muitas vezes, administrados sem critérios epidemiológicos, permitindo o estabelecimento de resistência na população parasitária. Sendo assim, uma estratégia alternativa para a realização de um controle sustentável de nematóides de importância veterinária é o desenvolvimento de anti-helmínticos não-sintéticos que diminuam a necessidade do tratamento convencional (KAPLAN, 2004).

Segundo CHAGAS (2004), a análise fitoquímica de plantas, os testes para a comprovação da ação efetiva de seus princípios ativos e um conhecimento mais amplo das estratégias de controle dos parasitos, podem oferecer novas oportunidades de controle efetivo e econômico dos agentes das doenças parasitárias. Dessa forma, é importante que o efeito anti-helmíntico das plantas medicinais seja verificado experimentalmente em estudos de parasitologia tanto *in vitro* como *in vivo*. Assim, os resultados obtidos nesses testes poderão contribuir também para pesquisas futuras que possam comprovar a atividade anti-helmíntica

de *Mentha villosa* Huds. em outros animais, inclusive em humanos.

Vários estudos referentes à utilização de plantas medicinais têm sido realizados buscando-se o controle de helmintoses em animais criados para fins comerciais, como ovinos, caprinos e bovinos. Segundo ANTHONY *et al.* (2005), os óleos essenciais de plantas (e/ou os princípios ativos) podem ser utilizados como alternativas ou aliados às terapias antiparasitárias convencionais. Os óleos essenciais constituem um grupo importante de produtos de origem vegetal de importância econômica. De forma geral, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos (RADÜNZ, 2004).

Dentre as espécies vegetais consideradas possuidoras de propriedades medicinais segundo a crença popular, algumas são utilizadas como anti-helmínticas, a exemplo do gênero *Mentha* L., pertencente à família Lamiaceae, que contém espécies popularmente conhecidas como hortelãs. *M. villosa* é um híbrido que apresenta grande importância medicinal e social por sua ação contra parasitos intestinais para humanos. O estudo químico do óleo essencial de *M. villosa* registra a presença de quantidades de 30% a 90 % de óxido de piperitenona, mas ainda não se conseguiu determinar se seria este ou outro o componente que age como seu princípio ativo, principalmente com relação ao seu efeito anti-parasitário (LORENZI & MATOS, 2002).

Partindo-se da hipótese de que o tratamento com hidrolato de *M. villosa*, por conter alto teor relativo de óxido de piperitenona, possui efeito anti-helmíntico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sobre nematóides gastrintestinais de bovinos, esta pesquisa teve como objetivo determinar a composição química do óleo essencial e do hidrolato de *M. villosa* por meio de análise cromatográfica, testar a atividade ovicida *in vitro* do hidrolato de *M. villosa* pelo método de coprocultura quantitativa e avaliar a atividade *in vivo* do hidrolato de *M. villosa* sobre nematóides gastrintestinais de bovinos, por meio do teste de redução no número de ovos de nematóides nas fezes dos hospedeiros.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Infecções por nematóides gastrintestinais**

As infecções com helmintos gastrintestinais em ruminantes, um sério problema que ocorre em todo o mundo, determinam importantes perdas econômicas, devido tanto à mortalidade, quanto à redução na produtividade dos animais (AMARANTE, 2004). Dentre os sinais clínicos adversos provocados por essas infecções nos hospedeiros, pode-se citar prostração, diarreia e perda de peso, o que compromete a saúde do hospedeiro.

Os nematóides mais frequentemente encontrados parasitando o trato gastrintestinal de bovinos incluem os gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Trichuris* e *Oesophagostomum*, entre outros (LIMA *et al*, 1997; BORDIN, 2004), sendo todos pertencentes à superfamília Strongyloidea (UENO & GONÇALVES, 1998).

Os nematóides da superfamília Strongyloidea apresentam ciclos de vida bastante semelhantes entre si, podendo ser divididos em fase pré-parasitária e parasitária. A fase pré-parasitária inicia-se com a postura de ovos pelas fêmeas presentes no trato gastrintestinal. Estes chegam ao meio externo juntamente com as fezes, e, com temperatura, umidade e oxigênio adequados, evoluem para um ovo larvado em primeiro estágio de desenvolvimento (L1). Sete dias em média após a oviposição, as larvas eclodem. Livres, essas larvas prosseguem o desenvolvimento, passando pela fase de segundo estágio (L2) e culminando com uma larva de terceiro estágio (L3) que corresponde à fase infectante. A fase parasitária inicia-se com a infecção do animal a partir da ingestão da larva de terceiro estágio (L3). Uma

vez ingerida, a larva passa pelas porções anteriores do trato digestório, migrando então para o local de preferência, onde completa o desenvolvimento larval, tornando-se adulta em um tempo médio de três semanas. O ciclo, de modo geral, é do tipo direto e não migratório (FURTADO, 2006).

### **Resistência dos nematóides a anti-helmínticos sintéticos**

O controle das helmintoses vem sendo realizado através do uso de anti-helmínticos sintéticos, entretanto este procedimento apresenta alguns problemas como altos custos, resíduos nos alimentos, risco de contaminação ambiental e o desenvolvimento de populações de nematóides resistentes a todas as classes de anti-helmínticos (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006).

No âmbito dos grandes ruminantes, algumas referências técnicas situando forte evidência de resistência, vêm se avolumando consideravelmente (BORDIN, 2004). RANGEL *et al.* (2005) identificaram resistência à ivermectina 1% e doramectina 1% em uma dada população de helmintos dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus* em bovinos de corte. SOUTELLO *et al.* (2007) detectaram resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. especialmente à ivermectina em bovinos do nordeste do Estado de São Paulo. A resistência a Albendazole e levamisole também foi observada.

### **Histórico da utilização de plantas medicinais**

O uso de plantas medicinais pelo ser humano é tão antigo quanto à origem das civilizações, sendo encontrado em todas as populações e em todos os grupos étnicos conhecidos. A partir da fitoterapia foram descobertos diversos medicamentos usados na medicina tradicional (MARTINS, 2000).

Segundo CHECHINEL FILHO & YUNES (1998), dada a quantidade de plantas existentes no planeta, a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde, entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliada sob os aspectos biológicos. As substâncias farmacologicamente ativas obtidas das plantas estão relacionadas, quase sempre, aos metabólitos secundários por elas produzidos.

## Óleos essenciais

Os metabólicos secundários não têm uma função aparente no metabolismo primário da planta, mas freqüentemente têm um papel ecológico: atrativos para polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou servem como defensores químicos contra microorganismos, insetos e predadores superiores e até mesmo contra outras plantas (aleloquímicos) (CHAGAS, 2004). Dentre os metabólitos secundários, estão presentes os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, apresentando como principal característica a volatilidade. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos (RADÜNZ, 2004).

O conjunto de substâncias químicas voláteis, presentes nos óleos essenciais, é formado de classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, fenilpropanonas, alcoóis aldeídos e, em alguns casos, por hidrocarbonetos alifáticos, entre outros (SANTOS *et al.*, 2004).

A produção de óleos essenciais nas plantas está geralmente associada à presença de estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares e ductos de óleos ou resinas que contêm grande variedade de terpenos, considerados os sítios primários de acúmulos desse material (FAHN, 1979). MARTINS (2002), em um estudo de anatomia foliar por meio de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em *Mentha spicata* L. e *Mentha spicata x suaveolens*, demonstrou a presença de tricomas glandulares do tipo capitado e peltado nessas espécies.

## Plantas utilizadas como anti-helmínticas

O uso de plantas medicinais para fins anti-parasitários tem sido focado freqüentemente na saúde humana, mas também tem sido aplicado na prática veterinária e no manejo da saúde animal (ROCHFORD *et al.*, 2008).

KAPLAN (2004) considera importante que sejam realizados estudos objetivando a validação científica dos efeitos anti-parasitários de produtos vegetais em ruminantes, antes de sua aplicação como um método de controle de parasitos. Estes estudos também poderão promover uma valorização do conhecimento popular a respeito do uso de plantas medicinais.

## Considerações gerais sobre *Mentha* e sobre a família Lamiaceae

A família Lamiaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. Caracterizam-se por serem ervas ou arbustos comumente aromáticos, com ramos geralmente quadrangulares, folhas geralmente opostas, inflorescência geralmente cimosa. Em Lamiaceae estão incluídas muitas ervas aromáticas cultivadas no Brasil, como a lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), a erva-cidreira (*Melissa officinales* L.), o poejo (*Mentha pulegium* L.), a alfavaca (*Ocimum basilicum*), o orégano (*Origanum vulgare*), o boldo brasileiro (*Plectranthus barbatus*), o alecrim (*Rosmarinos officinalis* L.), o tomilho (*Thymus vulgaris*) e a hortelã (*Mentha* spp.) (SOUZA & LORENZI, 2005).

Dentre as plantas citadas pela população como tendo efeito anti-parasitário, estão algumas espécies de hortelãs, ervas aromáticas perenes que são cultivadas por seus óleos essenciais e usadas tanto na medicina tradicional quanto na culinária. Estas plantas pertencem ao gênero *Mentha* L., que é nativo do hemisfério norte e ocorre em todos os cinco continentes. O gênero *Mentha* inclui ervas aromáticas de difícil classificação taxonômica devido à grande variabilidade em seus caracteres morfológicos e frequente hibridização (LORENZO *et al.*, 2002), sendo alguns híbridos de difícil florescimento em condições naturais, conforme verificado em observação pessoal. Segundo MATOS (1994), somente as plantas cultivadas em serras mais frias e chuvosas apresentam flores uma vez por ano.

### Caracterização de *Mentha villosa* Huds.

Várias espécies de *Mentha* têm sido investigadas por suas atividades biológicas e pelos óleos essenciais produzidos por suas folhas (PAULUS *et al.*, 2005). Dentre elas pode-se destacar *M. villosa* Huds. (FIG. 1), uma planta medicinal e aromática cultivada em todo o Brasil e largamente utilizada pelas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos (PAULUS *et al.*, 2005). *M. villosa* é citada por alguns autores como sendo um híbrido entre *M. spicata* L. e *M. suaveolens* Ehrh (GOBERT *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2007; MOBOT, 2008). Apesar de haver divergência entre autores quanto à nomenclatura da espécie, já que a mesma é encontrada em literatura científica tanto como “*Mentha x villosa*” quanto como “*Mentha villosa*”, o banco de dados do "Missouri Botanical Garden" (MOBOT, 2008), web site de referência em nomenclatura botânica, utiliza a grafia “*Mentha villosa*”.

*M. villosa* apresenta folhas ovais, curtamente pecioladas, com aroma forte e bem característico. As flores, quando aparecem, ficam dispostas em espigas curtas terminais (FIG. 1). Formam estolhos que crescem horizontalmente e dão origem a novos caules como se

fossem novas plantas (LORENZI & MATOS, 2002).



FIGURA 1: Partes aéreas de *Mentha villosa* Huds., oriunda da Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, em estágio reprodutivo, apresentando inflorescência no ápice caulinar.

### **Composição do óleo essencial de *Mentha villosa* Huds.**

A identificação dos componentes ativos nos extratos vegetais, a quantificação destes nas plantas e a estimativa de sua biodisponibilidade no hospedeiro, são passos essenciais para fortalecer a evidência da atividade anti-helmíntica das plantas medicinais, aumentando a consistência dos resultados (ATHANASIADOU *et al.*, 2007).

Vários autores detectaram a presença de 1,2-epoxi-pulegona, também denominada óxido de piperitenona ou rotundifolona (FIG. 2), um monoterpene oxigenado (cetona), como constituinte majoritário no óleo essencial de *M. villosa*, em teores relativos variando de 30% a 100% (SOUSA *et al.*, 1997; LORENZO *et al.*, 2002; RADÜNZ, 2004; POGGIAN *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.* 2004; NASCIMENTO *et al.* 2005; MARTINS *et al.*, 2007). No entanto, não se conseguiu determinar se seria este ou outro o componente que age como seu princípio ativo anti-parasitário (LORENZI & MATOS, 2002). INNECO *et al.*, (2003), por outro lado, afirmam que a 1,2-epoxi-pulegona é considerada o princípio ativo anti-parasitário, sendo muito eficiente no combate às verminoses. Alguns outros constituintes incluindo monoterpênóides e sesquiterpenóides também foram identificados no óleo essencial de *M. villosa* (MARTINS *et al.*, 2007).



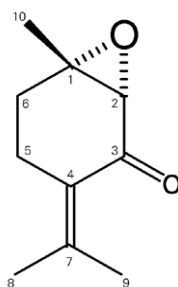


FIGURA 2: Estrutura molecular do óxido de piperitenona (1,2-epoxi-pulegona), também denominado de “rotundifolona”, presente no óleo essencial de *Mentha villosa* Huds.

Um estudo realizado por POGGIAN *et al.* (2004), abordando a constituição química do óleo essencial de algumas espécies de *Mentha*, demonstraram a presença de óxido de piperitenona no óleo de *M. villosa* com teor relativo de 100% e, em *M. crispata*, com teor relativo de 12,57% em média; em outras espécies como *M. arvensis* e *M. pulegium* não foi detectado o óxido de piperitenona no óleo essencial.

### **Propriedades de *Mentha villosa* Huds. e do óxido de piperitenona.**

Há na literatura vários relatos da utilização de *M. villosa* pela população devido às suas propriedades medicinais. Esta espécie destaca-se pelo uso culinário na forma de chás com efeito medicinal, sendo comumente utilizada como espasmolítica, antivomitiva, carminativa, estomáquica e anti-helmíntica (LORENZI & MATOS, 2002). É usada ainda, na alimentação como condimento e na indústria extrai-se a essência, geralmente empregada em perfumaria e na fabricação de bebidas e doces (MARTINS *et al.*, 1995). De acordo com o levantamento realizado por MEDEIROS *et al.* (2004), *M. villosa* é utilizada no tratamento da gripe e da bronquite, associada a outras plantas, na forma de xarope e a adição de leite às folhas trituradas é usada no tratamento da verminose em crianças. BIESKI (2005) realizou um levantamento de conhecimentos tradicionais dos usuários do Sistema Único de Saúde da Região Sul de Cuiabá quanto à utilização das plantas medicinais e aromáticas. Dentre as plantas citadas, *M. villosa* é utilizada pela população para gases e também como vermífuga, analgésica, anti-séptica, antiespasmódica, antiemética, colagoga, estomáquica, antiinflamatória e tônica.

Alguns autores demonstraram experimentalmente as propriedades farmacológicas de *M. villosa* e de seu constituinte majoritário. SOUSA *et al.* (1997) concluíram, em um estudo realizado em cobaias, que o óxido de piperitenona tem efeito relaxante da musculatura lisa intestinal. LAHLOU *et al.* (2001) testaram os efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *M.*

*villosa* e de seu principal constituinte, em ratos anestesiados. Neste estudo, o tratamento com o óleo essencial induziu efeitos hipotensivos e bradicardizantes. Posteriormente, LAHLOU *et al.* (2002) investigaram as respostas cardiovasculares à injeção intravenosa de óleo essencial. O óleo essencial também causou a diminuição da pressão arterial desses animais. GUEDES *et al.* (2004a) e GUEDES *et al.* (2004b) também demonstraram a ação hipotensiva e vasorelaxante do óleo essencial de *M. villosa*. Seu extrato aquoso proporcionou ainda estabilidade osmótica a eritrócitos humanos, evitando a ocorrência de choque hipotônico (FREITAS *et al.*, 2008).

O constituinte majoritário do óleo de *M. villosa*, também demonstrou experimentalmente atividade repelente a insetos. TRIPATHI *et al.* (2004) testaram a atividade do óxido de piperitenona como tóxico, repelente e retardante da reprodução do mosquito vetor da malária *Anopheles stephensi*. Esta substância mostrou atividade ovicida, larvicida, inibidora do desenvolvimento, repelente e adulticida contra o inseto testado.

### **Uso popular de *Mentha* spp. L. como anti-parasitário**

Alguns estudos etnofarmacológicos têm relatado a utilização de plantas do gênero *Mentha* L., incluindo *M. villosa*, como tendo atividade antiparasitária. Esta espécie tem mostrado ação anti-parasitária para amebíases, giardíases, tricomoníases urogenitais e shistosomíase (SOUSA *et al.*, 1997; MONTE & OLIVEIRA, 2001). TOZZE JR. *et al.* (2006) também relatam o uso de *M. villosa* no tratamento contra ameba, giárdia e tricomonas, com elevado percentual de cura. MEDEIROS *et al.* (2004), realizaram um levantamento das plantas medicinais utilizadas pelos sítiantes da reserva do Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro. Dentre as plantas citadas em entrevistas, a adição de leite às folhas trituradas de *M. villosa* é usada para cura de vermes em crianças.

FURTADO (2006) citou *M. suaveolens* entre algumas plantas promissoras quanto à avaliação mais detalhada de seu potencial anti-helmíntico, tanto *in vitro* quanto clínico. O autor listou espécies vegetais referenciadas como anti-helmínticas em levantamento bibliográfico retroativo em 40 anos. Dentre as plantas, encontram-se algumas espécies de *Mentha* - *M. piperita* subsp. *citrata* “alevante, hortelã-roxo” Briq., *M. pulegium* L. “poejo”, *M. spp.* “hortelã” e *M. suaveolens* Ehrh. “hortelã-grande” - para uso humano ou veterinário como vermífugo.

O uso de óleos essenciais é pouco explorado em ruminantes. Além disto, esta área de pesquisa é limitada a estudos *in vitro* com poucos experimentos realizados *in vivo* (ROCHFORD *et al.*, 2008). Dessa forma, é importante que o possível efeito anti-helmíntico de *M. villosa*, pouco avaliado, seja verificado experimentalmente em estudos de parasitologia veterinária

tanto *in vitro* como *in vivo*. Os resultados obtidos nesses testes podem contribuir também para pesquisas futuras que possam comprovar a atividade anti-helmíntica desta planta em outros animais, inclusive em humanos.

## CAPÍTULO 1

### CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E HIDROLATO DE *Mentha villosa* Huds. (LAMIACEAE)

#### RESUMO

*Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) é uma planta utilizada popularmente como anti-helmíntica, além de outras atividades farmacológicas. O estudo químico desta espécie registra a presença de óxido de piperitenona como constituinte majoritário, com teor variando de 30 a 90% no óleo essencial, sendo este o possível princípio ativo dessa espécie. Este estudo teve como objetivo caracterizar o óleo essencial e o hidrolato de *M. villosa* para determinação do teor relativo de seus constituintes por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A análise química das amostras, extraídas por hidrodestilação, confirmou a presença de óxido de piperitenona como constituinte majoritário no óleo essencial e hidrolato, apresentando teores relativos de 65, 16% e 93,62% respectivamente.

#### INTRODUÇÃO

Várias substâncias consideradas farmacologicamente ativas provenientes de plantas medicinais são obtidas dos óleos essenciais. Os óleos essenciais são frações voláteis naturais, extraídas de plantas aromáticas que evaporam à temperatura ambiente (SANTOS *et al.*, 2004). Eles podem aromatizar as soluções aquosas, sendo denominadas hidrolatos (RADÜNZ, 2004).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular estão as hortelãs, pertencentes ao gênero *Mentha* (Lamiaceae). *Mentha villosa* Huds., citada por alguns autores como sendo um híbrido entre *M. spicata* L. e *M. suaveolens* Ehrh (GOBERT *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2007), é uma erva perene, ereta, com 30-40 cm de altura, originária da Europa e hoje cultivada em vários países, inclusive no Brasil. *M. villosa* destaca-se pelo uso culinário na forma de chás com efeito medicinal, sendo comumente utilizada como espasmolítica, antivomitiva, carminativa, estomáquica e anti-helmíntica, por via oral, bem como anti-séptica e antiprurido, por via local (LORENZI & MATOS, 2002).

O estudo químico desta espécie registra a presença de óxido de piperitenona (1,2-epoxi-pulegona) como constituinte majoritário, com teor variando de 30 a 90% (SOUSA *et al.*, 1997; LORENZO *et al.*, 2002; RADÜNZ, 2004; MARTINS *et al.*, 2007), entretanto ainda não se conseguiu determinar se este componente age como seu princípio ativo, principalmente com

relação ao seu possível efeito anti-parasitário (LORENZI & MATOS, 2002). Alguns estudos atribuíram efeitos hipotensivos, bradicardizantes e relaxantes musculares ao óxido de piperitenona (LAHLOU *et al.*, 2001; LAHLOU *et al.*, 2002; GUEDES *et al.*, 2004a; GUEDES *et al.*, 2004b), além de ação repelente em insetos (TRIPATHI *et al.*, 2004).

Segundo ATHANASIADOU *et al.* (2007), a identificação dos componentes ativos nos extratos vegetais e a quantificação destes nas plantas são passos essenciais para tornar os resultados referentes à comprovação de sua atividade anti-helmíntica mais confiáveis. Portanto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o óleo essencial, bem como o hidrolato de *M. villosa* para determinação do teor relativo de seus constituintes, principalmente do óxido de piperitenona, identificado por alguns autores como o possível princípio ativo desta espécie vegetal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta da Planta

Amostras do ramo e das folhas de *M. villosa* foram coletadas às 8:00 na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Exsiccatas foram depositadas no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF sob o número de registro CESJ-48632.

### Extração do óleo essencial e hidrolato

As partes aéreas de *M. villosa* foram secadas sobre bancada à temperatura ambiente até se obter peso constante (atingido após 15 dias) para posterior extração do óleo essencial e do hidrolato, realizada no Laboratório de Fitoquímica, no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora. A extração foi feita pelo método de hidrodestilação em aparelho *Clevenger* (FIG. 3 A) com condensador vertical de bola, no qual a planta (900 g de material seco) foi inserida num balão volumétrico contendo 5 l de água destilada, sendo o balão adaptado ao extrator e mantido em caixa de areia (funcionando como manta aquecedora) em temperatura suficiente para que o sistema entrasse em ebulição. Durante o período em que o sistema permaneceu em ebulição (duas horas) os vapores de água e as substâncias voláteis oriundas da planta foram conduzidos ao condensador adaptado ao aparelho, permitindo a destilação e a circulação contínua dos mesmos através do sistema fechado e vaso-comunicante, fazendo com que o óleo essencial da planta e respectivo hidrolato (caracterizado como a fração aquosa contendo o óleo essencial emulsionado) se

acumulassem gradualmente no reservatório de separação do aparelho (FIG. 3 B). Após a coleta do óleo essencial e o hidrolato, os mesmos foram mantidos em congelador (-18°C) dentro de frascos de vidro vedados e protegidos da luz, até a realização de análise cromatográfica.

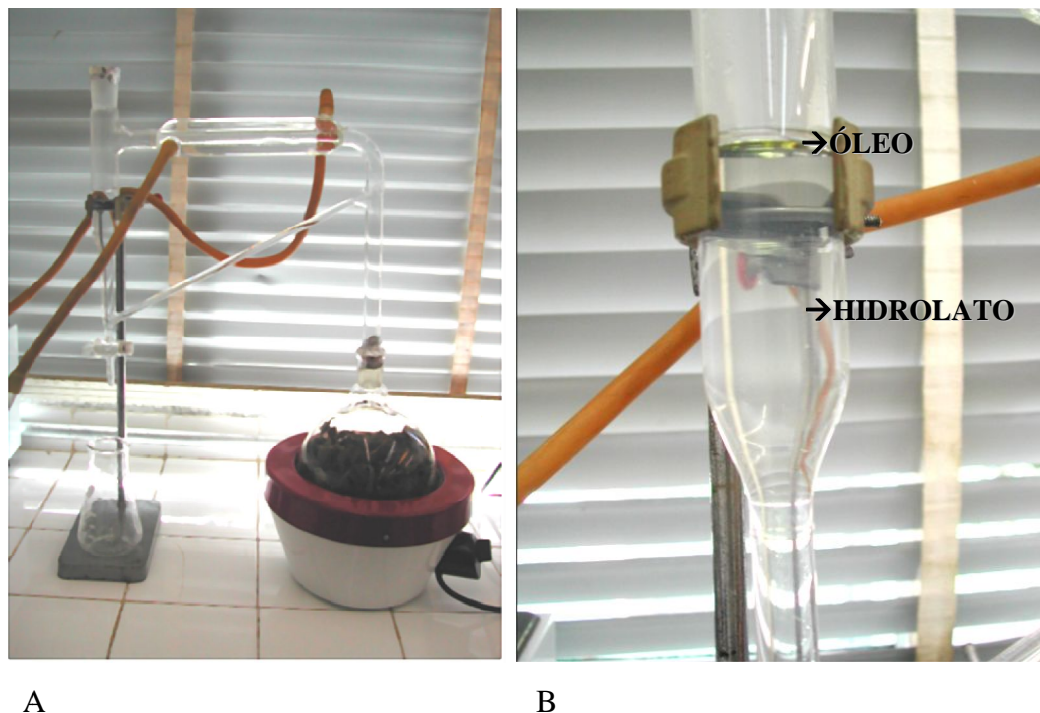


FIGURA 3: Extração do óleo essencial e hidrolato, pelo método de hidrodestilação em aparelho *Clevenger* a partir de ramos e folhas de *Mentha villosa* Huds., realizada no Laboratório de Fitoquímica no Departamento de Botânica/UFJF. A) Aparelho *Clevenger*. B) Detalhe do reservatório do aparelho, mostrando o óleo essencial, menos denso e o hidrolato de *M. villosa*.

### **Análise cromatográfica do óleo essencial e do hidrolato**

Uma pequena parcela do óleo essencial bem como do hidrolato obtido (5 ml) foi armazenada em congelador e conduzida em recipiente térmico à Central Analítica da Farmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, para a realização de análise. Esta foi feita utilizando-se cromatografia por arraste gasoso em aparelho HP6890 acoplado à espectrometria de massas em aparelho Agilent 5973-N munido de um banco de dados para identificação das substâncias presentes. Foi usada uma coluna capilar do tipo DB-5MS com 0,30µm de espessura do filme, 28,8m de comprimento e 250µm de diâmetro interno. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo inicial de 0,5ml/min e as separações foram realizadas com injetor a 250°C, detector a 280°C e a seguinte programação de temperatura: 70°C até 235°C

em 60 minutos. Os parâmetros da operação de espectrometria de massas foram 70 eV, fonte iônica de 250°C, impacto de elétrons.

A amostra de óleo essencial foi submetida à análise cromatográfica apenas como meio de caracterização e quantificação dos constituintes presentes, permitindo comparações com outros estudos que utilizem o óleo essencial da espécie vegetal em questão. Já o hidrolato, utilizado para os testes de eficácia anti-helmíntica do presente estudo, foi analisado quimicamente para determinar a presença e o teor de óxido de piperitenona.

### Identificação dos constituintes

Para identificação de cada componente do óleo essencial e do hidrolato, foram utilizadas as fragmentações moleculares fornecidas pelo aparelho de análise cromatográfica, comparação da fragmentação e consulta dos Índices de Kovats em literatura de referência (ADAMS, 1995), comparando-os com o Índice de Kovats calculado com base no cromatograma de padrão de hidrocarbonetos (C8-C24; C28;C32; C36; C40). O Índice de Kovats foi calculado, empregando-se a seguinte fórmula:

$$100 \times Z + 100 \left( \frac{T.R. (Subst.) - T.R. (Hidroc. <)}{T.R. (Hidroc. >) - T.R. (Hidroc. <)} \right)$$

onde: Z = número de carbonos da molécula a ser identificada, obtida pelo número de carbonos do cromatograma de padrão de hidrocarbonetos (T.R. correspondente); T.R.(Subst.) = Tempo de retenção da substância a ser identificada; T.R. (Hidroc. >) e T.R. (Hidroc. <) = Tempos de retenção do hidrocarboneto localizado em posição anterior e posterior em relação ao tempo de retenção da substância a ser identificada.

## RESULTADOS

A partir dos dados fornecidos no espectrômetro de massas, além da consulta em literatura de referência e cálculo do Índice de Kovats, foi possível identificar 21 constituintes, entre mono e sesquiterpenos, no óleo essencial de *M. villosa*. O óxido de piperitenona foi confirmado como o componente majoritário, sendo detectado em teor relativo de 65,16%, seguido de outras substâncias como Germacreno-D, Terpin-4-ol, Trans-beta-farneseno e Acetato de Octenil, apresentando teores relativos de 4,81%, 4,29%, 3,12% e 2,17% respectivamente, além de outros constituintes menos abundantes. Apenas um componente do óleo essencial não pôde ser identificado (FIG. 4; TAB. 1).

No hidrolato de *M. villosa* foram detectados somente dois constituintes. O óxido de piperitenona foi o constituinte majoritário apresentando 93,62%, o que representa quase a totalidade de substâncias detectadas (94,15%). O outro componente identificado foi o Terpin-4-ol, com teor relativo de 0,53% (FIG. 5; TAB. 1).

Em ambas as análises, observou-se que os tempos de retenção mostraram consistência quanto à seqüência de substâncias detectadas, e o Índice de Kovats calculado apresentou-se próximo àquele consultado na literatura de referência.

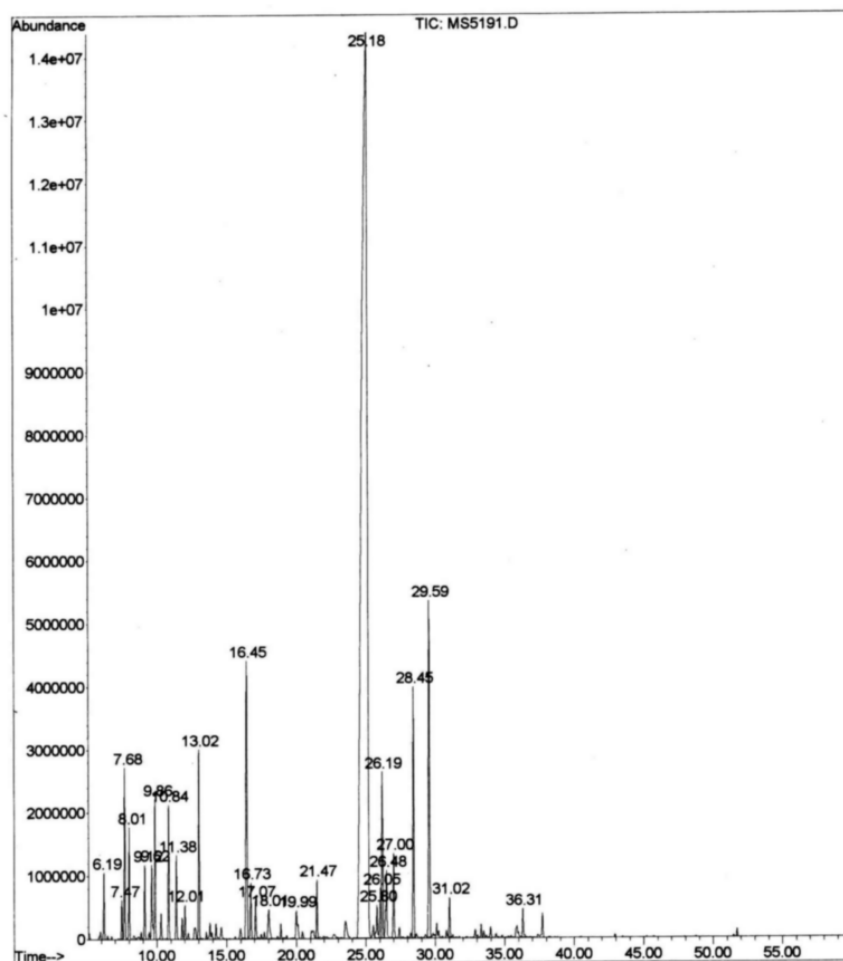


FIGURA 4: Cromatograma obtido em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do óleo essencial extraído por hidrodestilação a partir de ramos e folhas de *Mentha villosa* Huds., cultivada na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora.



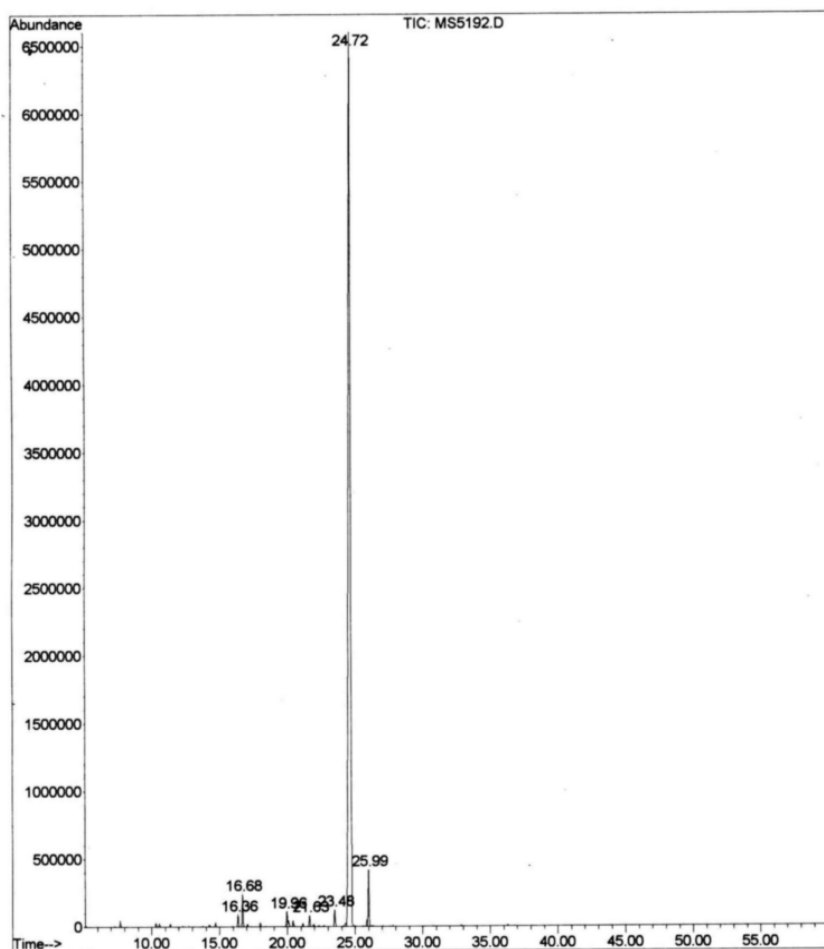


FIGURA 5: Cromatograma obtido em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do hidrolato extraído por hidrodestilação a partir de ramos e folhas de *Mentha villosa* Huds., cultivada na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

TABELA 1: Substâncias detectadas em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, realizada na Central Analítica da Far-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, com seus respectivos tempos de retenção (T.R.), Índices de Kovats consultados em literatura (IK-LIT) e calculados (IK-CAL) e teores relativos dessas substâncias nas amostras de óleo essencial e hidrolato extraídos por hidrodestilação a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds., coletadas na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

T.R.	SUBSTÂNCIA	IK-LIT	IK-CALC	TEORES RELATIVOS (%)	
				ÓLEO	HIDROLATO
6,19	alfa-pineno	939	945,5	0,73	-
7,46	sabineno	976	975,7	0,44	-
7,68	(não identificada)	-	981,0	1,95	-
8,01	beta-mirceno	991	988,8	1,17	-
9,12	alfa-terpineno	1018	1015,4	0,82	-
9,64	limoneno	1031	1028,0	1,03	-
9,86	cis-ocimeno	1040	1033,3	1,52	-
10,84	gama-terpineno	1062	1056,9	1,50	-
11,4	hidrato de Cis-sabineno	1068	1070,4	0,98	-
12,01	terpinoleno	1088	1085,1	0,38	-
12,99	acetato de Octenil	1110	1107,8	2,17	-
16,41	terpin-4-ol	1177	1182,0	4,29	0,53
17,07	alfa-terpineol	1189	1196,3	0,52	-
24,98	óxido de piperitenona	1363	1372,5	65,16	93,62
25,75	beta-elemeno	1391	1390,2	0,49	-
25,96	cis-jasmono	1394	1395,0	0,68	-
26,45	alfa-gurjuneno	1409	1406,5	1,12	-
26,98	trans-cariofileno	1418	1419,2	1,11	-
28,44	trans-beta-farneseno	1458	1454,3	3,12	-
29,6	germacreno-D	1480	1482,2	4,81	-
31,01	delta-cadineno	1524	1516,9	0,51	-
36,31	alfa-cadinol	1653	1653,2	0,40	-
	TOTAL (%)			94,90	94,15

## DISCUSSÃO

Nas análises cromatográficas realizadas no presente estudo, detectou-se o óxido de piperitenona como constituinte majoritário no óleo essencial de *M. villosa*. Isso também foi observado em estudos anteriores, nos quais a substância, também denominada de 1,2-epoxi-

pulegona ou rotundifolona, apresentou-se como o componente mais abundante no óleo essencial de *M. villosa*, em teores relativos variando de 30% a 100% (SOUSA *et al.*, 1997; LORENZO *et al.*, 2002; POGGIAN *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.* 2004; NASCIMENTO *et al.* 2005). MARTINS *et al.* (2007) identificaram 28 componentes no óleo essencial de *M. villosa*, sendo 13 monoterpenos, 10 sesquiterpenos, 1 éster, 1 fenilpropanóide além de 3 não identificados. Neste estudo o óxido de piperitenona foi detectado como constituinte principal, apresentando-se em teor de 35,9%.

No experimento conduzido por RADÜNZ (2004), o componente majoritário no óleo essencial de *M. villosa* extraído da planta fresca também foi o óxido de piperitenona, representando aproximadamente 60,3% do total de substâncias detectadas. Comparando-se os constituintes identificados por RADÜNZ (2004) aos detectados no presente estudo, foi possível determinar 12 substâncias coincidentes (beta-mirceno, limoneno, cis-ocimeno, hidrato de cis-sabineno, terpin-4-ol, beta-elemeno, alfa-gurjuneno, trans-cariofileno, trans-beta-farneseno, germacreno-D e delta-cadineno, além do óxido de piperitenona), perfazendo um total de 85,31% de substâncias coincidentes quanto ao teor relativo encontrado no presente estudo.

Em estudos anteriormente realizados, utilizando amostras de *M. villosa* coletadas na UFJF, NASCIMENTO *et al.* (2004) detectaram a presença de óxido de piperitenona no óleo essencial desta espécie, quando coletada em diferentes horários do dia (às 8:00, 13:00 e 18:00) e também ao comparar-se o óleo essencial extraído de folhas jovens e senescentes, sendo que em todas as condições acima mencionadas o teor relativo desse constituinte apresentou-se acima de 70%. Posteriormente, ao avaliar a influência de diferentes tratamentos pós-coleta (armazenamento em congelador por dez dias, secagem em estufa a 55°C por cinco dias e extração do óleo a partir do material fresco) sobre o teor de óxido de piperitenona no óleo essencial de amostras de folhas jovens e senescentes de *M. villosa*, NASCIMENTO *et al.* (2005) observaram a presença deste constituinte em teor relativo acima de 60% em todas as amostras analisadas. Neste estudo, as condições nas quais se obteve maior teor de óxido de piperitenona. foram: óleo extraído de folhas senescentes frescas (100%) e tratamento em estufa, tanto em folhas jovens (98,7%) quanto senescentes (100%). Segundo GOBBO-NETO & LOPES (2007), o metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores como condições de coleta, estabilização e estocagem, influenciando assim na qualidade e conseqüentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos, entretanto, em alguns casos, pode não ocorrer esta variação em função de fatores. Os trabalhos anteriormente realizados na UFJF mostram a estabilidade da molécula de , já que esta foi detectada em alto teor relativo, mesmo quando *M. villosa* foi exposta a diferentes procedimentos realizados previamente à extração de seu óleo essencial.

RADÜNZ (2004) também destacou a variação da composição do óleo de *M. villosa* em diferentes localidades do mundo, sendo o óxido de piperitenona detectado com teor de 55,4% no Brasil e de 0,15 a 61,8% na Grécia, enquanto que nos Estados Unidos esta substância não foi encontrada no óleo essencial. Isto mostra que a análise química para determinação das substâncias presentes nas plantas medicinais é de suma importância, pois podem ocorrer variações nos constituintes da mesma espécie quando cultivada sob diferentes condições ambientais.

Verificou-se maior teor relativo de óxido de piperitenona no hidrolato (93,62%) que no óleo essencial (65,16%). Isso pode ser explicado pelo fato de o óleo essencial apresentar-se mais concentrado, assim, um maior número de constituintes se mostrou presente, o que diminui, em contrapartida, o teor relativo do constituinte mais abundante. Já o hidrolato, que apresenta-se emulsionado em água, podendo ser considerado como uma diluição do óleo essencial, apresenta um número menor de constituintes, e, dessa forma, este é detectado em maior teor relativo. Essa caracterização química é fundamental para definição de concentrações a serem utilizadas em testes de bioatividade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. 1995. **Identification of essential oils by gas chromatography / mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois. 468 p.
- ATHANASIADOU, S; GITHIORI, J. & KYRIAZAKIS, I. 2007. Medicinal plants for helminths parasite control: facts and fiction. **Animal**, **1**(9): 1392-1400.
- GOBERT, V.; MOJA, S.; COLSON, M. & TABERLET, P. 2002. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany**, **89** (12): 2017-2023.
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, **30**(2): 374-381.
- GUEDES, D.N.; SILVA, D.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. & MEDEIROS, I.A. 2004a. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytomedicine**, **11**: 490-497.

- GUEDES, D.N.; SILVA, D.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. & MEDEIROS, I.A. 2004b. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **37** (12): 1881-1887.
- LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.; LEAL-CARDOSO, J.H. & TOSCANO, C.F. 2001. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetised rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**, **67**(7): 638-643.
- LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H. 2002. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. **Phytomedicine**, **9**: 715-720.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, SP. 512 p.
- LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CANIGUERAL, S. 2002. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **45** (4): 1-6.
- MARTINS, A.P.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.; NOVÁK, Cs. & ÉHEN, Z. 2007. Preparation and characterization of *Mentha x villosa* Hudson oil- $\beta$ -cyclodextrin complex. **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, **88** (2): 363-371.
- NASCIMENTO, E.M., POGGIAN, C.F., MOTTA, B.L., PIMENTA, D.S. 2004. Teor de óxido de piperitenona em *Mentha villosa* (Lamiaceae). I – Coleta de ramos senescentes e jovens em diferentes horários. **Anais do X Seminário Mineiro de Plantas Medicinais**. p. 175-176.
- NASCIMENTO, E.M., BARBOSA, L.S. & PIMENTA, D.S. 2005. Teor de óxido de piperitenona no óleo essencial de *Mentha villosa* Huds (Lamiaceae) em folhas jovens e senescentes submetidas a diferentes métodos de tratamento pós-coleta. **XI Seminário Mineiro de plantas medicinais – 2ª jornada farmacêutica: resumo dos trabalhos**. UFVJM. Diamantina.

- POGGIAN, C.F., NASCIMENTO, E.M., LESSA, B.M. & PIMENTA, D.S. 2004. Detecção de óxido de piperitenona no óleo essencial de seis espécies de *Mentha* (Lamiaceae) cultivadas na UFJF. **Anais do X Seminário Mineiro de Plantas Medicinais**. P. 173 – 174.
- RADÜNZ, L.L. 2004. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds)**. Tese de Doutorado. Viçosa: UFV. 90 p.
- SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C. & NETO, O.G.R. 2004. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado técnico n. 99**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA.
- SOUSA, P.J.C.; MAGALHÃES, P.J.C.; LIMA, C.C.; OLIVEIRA, V.S. & LEAL-CARDOSO, J.H. 1997. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **30** (6): 787-791.
- TRIPATHI, A.K.; PRAJPATI, V.; AHMAD, A.; AGGARWAL, K.K. & KIIANUJA, S.P.S. 2004. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant, toward malarian vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **Journal of Medical Entomology**, **41** (1): 691-698.

## CAPÍTULO 2

### AVALIAÇÃO DO EFEITO anti-helmíntico *IN VITRO* DO HIDROLATO DE *Mentha villosa* Huds. (LAMIACEAE)

#### RESUMO

O uso de plantas medicinais para controle de nematóides de importância veterinária tem sido apontado como uma alternativa ao uso de anti-helmínticos sintéticos, principalmente devido ao fenômeno de resistência dos helmintos a essas drogas. *Mentha villosa* Huds. tem sido utilizada pela população devido às suas diversas propriedades farmacológicas, inclusive para o controle de verminoses. Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do hidrolato de *M. villosa*, em cinco diferentes concentrações (20%, 40%, 60%, 80% e 100%), no desenvolvimento de ovos de nematóides gastrintestinais de bezerras, por meio da técnica de coprocultura quantitativa. Somente o hidrolato a 20% apresentou-se pouco efetivo. Os hidrolatos a 40%, 60% e 80% apresentaram porcentagem de eficácia de 91,88%, 94,15% e 98,40% respectivamente. Já o hidrolato a 100%, mostrou-se equivalente ao controle-positivo, realizado pela utilização do anti-helmíntico Albendazol®, que apresentou efetividade de 100%.

#### INTRODUÇÃO

O controle de nematóides de bovinos é feito pela utilização de anti-helmínticos sintéticos. No entanto, a seleção de populações de helmintos resistentes, fruto freqüente da má utilização ou da má qualidade dessas drogas, já detectada por décadas em ovinos (BORDIN, 2004), está atualmente sendo encarada, e de forma irrefutável, em grandes ruminantes (KAPLAN, 2004). Sendo assim, uma estratégia alternativa para a realização de um controle sustentável de nematóides de importância veterinária é o desenvolvimento de novas pesquisas utilizando anti-helmínticos não-sintéticos que diminuam a necessidade do tratamento convencional (KAPLAN, 2004).

Desse modo, uma variedade de métodos tem sido explorada para validar as propriedades anti-helmínticas de algumas plantas medicinais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (GITHIORI *et al.*, 2006). Os testes *in vitro* constituem-se na observação da ação do fármaco pelo contato direto com os estádios de ovo ou larva do parasito, para avaliar seu efeito sobre o desenvolvimento de ovos e eclosão ou mortalidade das larvas. (COSTA, 2004).

Há relatos em literatura que abordam o uso popular de *M. villosa* devido às suas propriedades farmacológicas, inclusive seu uso como anti-parasitário para amebíases, giardíases, tricomoníases urogenitais e shistosomíases (SOUSA *et al.*, 1997; TOZZE JR. *et al.*, 2006) e também para o controle de verminoses em humanos (LORENZI & MATOS, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2004; BIESKI 2005).

A partir das informações acima descritas, e considerando-se que não foram encontrados em literatura estudos que abordem a atividade anti-helmíntica de *M. villosa* em helmintos de bovinos, este experimento teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do hidrolato de *M. villosa* sobre o desenvolvimento de ovos de nematóides gastrintestinais de bovinos, por meio da técnica de coprocultura quantitativa.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta da Planta

Amostras do ramo e das folhas de *M. villosa* foram coletadas às 8:00h na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Exsiccatas foram depositadas no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF sob o número de registro CESJ-48632.

### Extração do óleo essencial e hidrolato

As partes aéreas de *M. villosa* foram mantidas em sacos plásticos e acondicionadas em congelador (-18°C) por 20 dias até extração do hidrolato, realizada no Laboratório de Fitoquímica, no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora. A extração foi feita pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger, onde a planta (100 g de material fresco) permaneceu em ebulição por duas horas em 1 L de água. Após descarte do óleo essencial, o hidrolato (caracterizado como a fração aquosa contendo o óleo essencial emulsionado) foi mantido em congelador (-18°C) dentro de frascos de vidro vedados e protegidos da luz.

### Preparação das diluições a serem testadas

A partir do hidrolato extraído, foram preparadas as seguintes soluções com adição de água destilada: hidrolato 100%, hidrolato 80%, hidrolato 60%, hidrolato 40% e hidrolato 20%. Os frascos contendo estas soluções foram mantidos em congelador (-18°C) até a



realização dos testes, quando os frascos foram agitados para proporcionar sua emulsão, ou seja, para garantir que o óleo essencial presente no hidrolato se distribuisse de maneira uniforme na solução aquosa.

### **Teste anti-helmíntico *in vitro***

Para a realização do teste *in vitro* foram obtidas amostras de fezes contaminadas naturalmente com ovos de nematóides gastrintestinais, sendo estas provenientes de bezerras mestiças (Holandês x Zebu) criadas no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no Município de Valença, RJ. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, mantidas em sacos plásticos sob refrigeração (aprox. 5°C) e enviadas em caixas de isopor ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, onde foram realizados os procedimentos de exame das fezes, coprocultura e contagem das larvas de nematóides, no período de março a junho de 2007.

Primeiramente, procedeu-se a contagem de ovos por grama de fezes (opg), em *Câmara de McMaster* de acordo com a técnica modificada de GORDON & WHITLOCK (1939), citada em UENO & GONÇALVES (1998), para verificação do nível de contaminação. Foi então realizado o teste para avaliação do efeito do hidrolato de *M. villosa* sobre a eclosão de larvas de nematóides gastrintestinais. Os grupos testados consistiram em:

- A - controle- negativo, no qual foi utilizada água destilada;
- B - controle-positivo, onde foi usado o anti-helmíntico comercial Albendazol®, que possui atividade ovicida, larvicida e adulticida;
- C - grupo de tratamento, com a utilização do hidrolato em cinco concentrações:
  - C1: hidrolato a 20%;
  - C2: hidrolato a 40%;
  - C3: hidrolato a 60%;
  - C4: hidrolato a 80%;
  - C5: hidrolato a 100%.

Para cada tratamento foram feitas 30 repetições, cada uma composta de 2 g de fezes homogeneizadas, totalizando 210 amostras, devidamente identificadas.

O cultivo de larvas de nematóides gastrintestinais foi realizado pelo método de coprocultura quantitativa, adaptado de UENO & GONÇALVES (1998) e inicialmente descrito por ROBERTS & O'SULLIVAN (1950), que consistiu na mistura de 2 g de fezes secas e esterilizadas, 2 g das fezes contaminadas com ovos de nematóides gastrintestinais e 2 ml da solução a ser testada (hidrolato a 20%, 40%, 60%, 80% ou 100%, água destilada ou

Albendazol®). Essas amostras foram então homogeneizadas e colocadas em copos de plástico descartável com capacidade para 50 ml. Estes foram acondicionados em uma bandeja plástica coberta com plástico transparente perfurado e forrada no fundo com papel-toalha umedecido com água, para conservar a umidade. A bandeja foi mantida em estufa climatizada (tipo BOD), sob temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de aproximadamente 80%, onde permaneceu por sete dias, sendo o papel-toalha umedecido com água destilada, quando necessário.

Após o sétimo dia de cultivo, foi acrescentada água destilada cuidadosamente nos copos plásticos até enchê-los e estes foram tampados com uma placa de Petri e virados rapidamente. Foram adicionados 15 ml de água destilada nas placas, onde os copos foram mantidos invertidos por 24 horas para a saída de larvas infectantes (L3) de nematóides gastrintestinais através dos pequenos espaços entre o copo e a placa.



FIGURA 6: Recipientes contendo coprocultura, devidamente identificados e posicionados de maneira invertida para obtenção de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de bovinos em experimento de avaliação da atividade anti-helmíntica de *Mentha villosa* Huds., realizado no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de leite, Município de Juiz de fora, MG.

Após este período, o conteúdo de cada placa de Petri foi coletado com uma pipeta e colocado em tubos plásticos com capacidade para 15 ml devidamente identificados, sendo um tubo para cada repetição nos tratamentos. Os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 1.500 rpm. para facilitar a sedimentação das larvas no fundo dos mesmos. Posteriormente, o conteúdo de líquido dos tubos foi drenado com uma pipeta e descartado, de forma a não ser aspirado o sedimento com as larvas. Foi mantido o líquido com dois cm de profundidade em todos os tubos de ensaio. As amostras foram então mantidas em refrigerador ( $10^{\circ}\text{C}$ ) por no máximo 30 dias, onde permaneceram até a contagem das larvas ao microscópio.

A análise microscópica consistiu na coleta de aproximadamente 3 ml do conteúdo previamente homogeneizado com auxílio de uma pipeta de Pasteur introduzida no fundo do tubo de ensaio. Procedeu-se então o preparo de lâminas temporárias (aproximadamente três lâminas com duas lamínulas de 20 x 20 mm cada, por tudo de ensaio) e contagem das larvas de nematóides vivas e mortas com auxílio de um contador manual. As larvas foram identificadas utilizando-se o Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes elaborado por UENO & GONÇALVES (1998).

Para a determinação da porcentagem de eficácia das substâncias testadas, foi empregada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Eficácia} = \left( \frac{\text{Média do número de larvas do grupo controle} - \text{Média do número de larvas do grupo tratado}}{\text{Média do número de larvas do grupo controle}} \right) \times 100$$

Foram empregados os testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Dunn, a níveis de significância de 5% (Programa Graph Pad Instat<sup>tm</sup>) para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos experimentais, já que a amostra não apresentou distribuição normal, de acordo com o teste de Barlett.

## RESULTADOS

O hidrolato de *M. villosa* apresentou o efeito ovicida esperado sobre nematóides gastrintestinais de bovinos no teste *in vitro*, sendo este efeito dose-dependente. Os valores médios e de desvio-padrão do número de larvas obtidas das coproculturas submetidas a tratamento com cinco concentrações de hidrolato, bem como dos grupos controle com água destilada e Albendazol® estão representados na TAB. 2 e na FIG. 7.

Quanto à porcentagem de eficácia das substâncias testadas, somente o hidrolato a 20% apresentou-se abaixo de 90% (66,44%). O hidrolato a 40%, 60% e 80% apresentou porcentagem de eficácia de 91,88%, 94,15% e 98,40% respectivamente sobre a inibição da eclodibilidade das larvas. Já o hidrolato a 100%, mostrou máxima eficácia, sendo esta equivalente ao controle-positivo utilizando o anti-helmíntico Albendazol®. Os percentuais de eficácia das substâncias testadas estão representados na FIG. 8.

Com relação aos nematóides presentes nas amostras analisadas ao microscópio, observou-se predominância dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus*, que representaram, juntamente, cerca de 90% das larvas encontradas, além dos gêneros *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus* em menor número (cerca de 6% e 4%, respectivamente).

TABELA 2: Número de larvas de nematóides gastrintestinais obtidas a partir de coprocultura realizada na Embrapa Gado de Leite, Juiz de fora, MG, utilizando-se amostras de fezes de bezerras criadas no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite e localizado no Município de Valença, RJ, contaminadas com ovos de nematóides gastrintestinais, submetidas a tratamento com água destilada (controle-negativo), Albendazol® (controle-positivo) e hidrolato extraído por hidrodestilação a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds. e testado em cinco concentrações (H 20%, H 40%, H 60%, H 80%, H 100%) (n = tamanho da amostra; x = média; DP = desvio-padrão; IC = intervalo de confiança de 95%).

	Água destilada	H 20%	H 40%	H 60%	H 80%	H 100%	Albendazol®
n	30	30	30	30	30	30	30
x ± DP	148,10 <sup>a</sup> ± 66,54	49,70 <sup>ab</sup> ± 24,45	12,03 <sup>bc</sup> ± 12,60	8,67 <sup>c</sup> ± 8,10	2,37 <sup>cd</sup> ± 2,77	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
IC	123,26 – 172,94	40,57 – 58,83	7,33 – 16,74	5,64 – 11,69	1,33 – 3,40	–	–

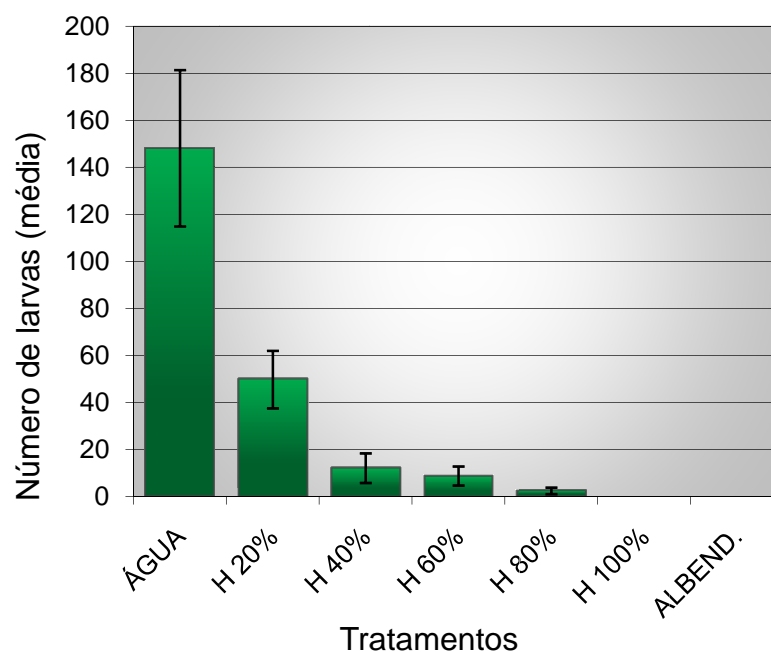


FIGURA 7: Número de larvas de nematóides gastrintestinais obtidas a partir de teste anti-helmíntico *in vitro* da atividade ovicida em bovinos, pelo método de coprocultura quantitativa, realizada na Embrapa gado de leite, Juiz de Fora, MG. As amostras de fezes provenientes de bezerras mestiças (Holandês x Zebu) criadas no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, (Município de Valença, RJ) contendo ovos de nematóides gastrintestinais, foram submetidas a tratamento com hidrolato de *M. villosa* Huds. em cinco diferentes concentrações (H 20%, H 40%, H 60%, H 80%, H 100%), a tratamento com água destilada (controle-negativo) e com Albendazol® (controle-positivo).

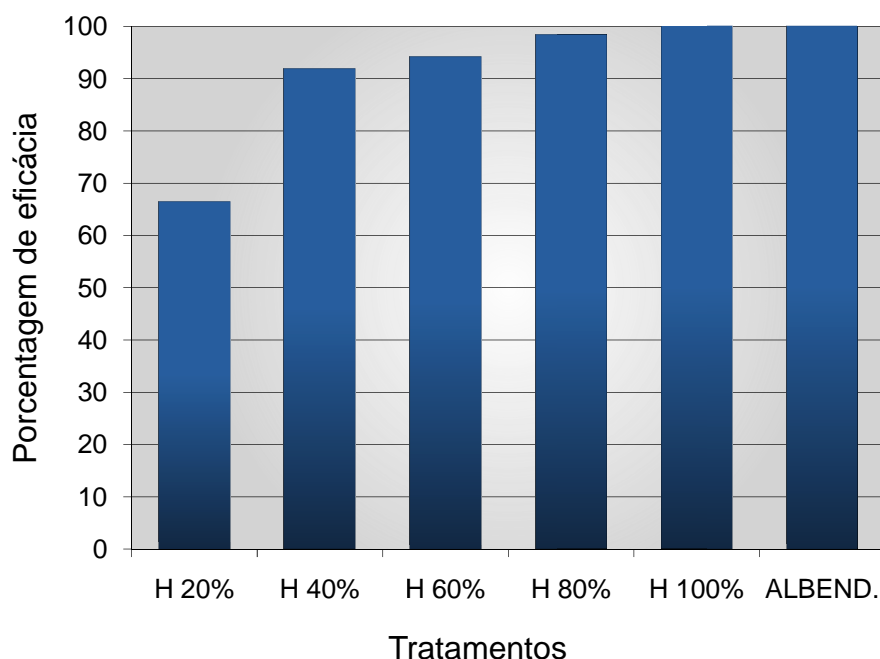


FIGURA 8: Porcentagem de eficácia do hidrolato extraído por hidrodestilação a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds., em teste anti-helmíntico *in vitro* da atividade ovicida em nematóides gastrintestinais de bovinos, pelo método de coprocultura quantitativa, realizada na Embrapa gado de leite, Juiz de Fora, MG. Amostras de fezes de bezerras mestiças (Holandês x Zebu) criadas no Campo Experimental de Santa Mônica (Valença, RJ), pertencente à Embrapa Gado de Leite, contendo ovos de nematóides gastrintestinais, foram submetidas a tratamento com hidrolato de *M. villosa* em cinco concentrações (H 20%, H 40%, H 60%, H 80%, H 100%) e a Albendazol® (controle-positivo). Para o cálculo da porcentagem de eficácia foi comparado o número de larvas obtidas nos grupos de tratamento e controle-positivo, com aquele obtido no grupo controle-negativo, no qual utilizou-se água destilada.

## DISCUSSÃO

O hidrolato de *M. villosa* apresentou efeito ovicida esperado sobre nematóides gastrintestinais de bovinos no teste *in vitro*, sendo este efeito dose-dependente. Somente o hidrolato a 20% apresentou porcentagem de controle abaixo de 90% (66,44%). O hidrolato a 40% e 60% apresentou porcentagem de controle de 91,88%, 94,15% respectivamente.

Considerando a classificação do índice de eficácia proposto pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (COLES *et al.*, 1992), um produto químico comercial é altamente efetivo se apresentar mais de 90% de ação contra o parasito tratado, moderadamente efetivo, quando atua entre 80% a 90%, pouco efetivo quando a ação está entre 60 e 80% e não efetivo em níveis abaixo de 60%. De acordo com esta premissa, os resultados obtidos mostram a alta eficácia do hidrolato de *M. villosa* nas concentrações de 40%, 60%, 80% e 100%. KETZIS *et al.*, (2006) afirmam, por outro lado, que um critério de eficácia único (por exemplo, > 90% de redução da carga parasitária) não pode ser aplicado à novos métodos de controle, devendo haver maior tolerância que para os anti-helmínticos

comerciais. Isto evidencia a alta eficácia do hidrolato obtida no teste *in vitro*, realizado no presente experimento.

As concentrações de hidrolato a 80% e 100%, mostraram eficácia acima de 98% (98,40% e 100%) respectivamente, valor considerado altamente efetivo segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de acordo com as recomendações contidas na Portaria Nº 48 de 12 de maio de 1997, que regulamenta o licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Já as concentrações de hidrolato entre 40% e 60% apresentaram-se efetivas, segundo a mesma Portaria, já que resultaram em valores de porcentagem de eficácia incluídos na faixa de 90% a 98%. O efeito ovicida do hidrolato a 100% foi o mesmo encontrado para o controle-positivo com o anti-helmíntico comercial Albendazol®, que mostrou eficácia de 100%.

A comprovada efetividade *in vitro* do hidrolato de *M. villosa* em concentrações acima de 40%, mostra ação promissora desta espécie vegetal para controle das helmintoses gastrintestinais de bovinos *in vitro*, sendo necessários testes adicionais relativos à dosagem e à sua possível atividade também *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIESKI, I.G.C. 2005. **Plantas aromáticas no Sistema Único de Saúde da região sul de Cuiabá-MT**. Monografia de especialização, Lavras: UFLA, 92 p.
- BORDIN, E.L. 2004. Algumas considerações sobre a resistência de nematodas gastrintestinais de ruminantes aos anti-helmínticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **13**, (0): 80-81.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, **44**: 35-44.
- COSTA, C.T.C. 2004. **Atividade anti-helmíntica de *Azadirachta indica* A. Juss sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. 60 p.

- GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S. & THAMSBORG, S.M. 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, **139**: 308-320.
- GORDON, H.M.L. & WHITLOCK, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Commonwealth Scientific and Industrial Organization**, **12**(1): 50-52.
- KAPLAN, R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, **20** (10): 477-481.
- KETZIS, J.K.; VERCRUYSE, J.; STROMBERG, B.E.; LARSEN, M.; ATHANASIADOU, S. & HOUDIJK, J.G.M. 2006. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. **Veterinary Parasitology**, **139**: 321-335.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, SP. 512 p.
- MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S. & ANDREATA, R.H.P. 2004. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, **18**(2): 391-399.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. **Diário Oficial da União N°92**, de 16 de maio de 1997.
- ROBERTS, F.H.S. & O'SULLIVAN, J.P. 1950. Methods of egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agricultural Research**, **1**: 99-102.
- SOUSA, P.J.C.; MAGALHÃES, P.J.C.; LIMA, C.C.; OLIVEIRA, V.S. & LEAL-CARDOSO, J.H. 1997. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **30** (6): 787-791.

TOZZE JR., H.J.; GARCIA JR., D. & MASSOLA JR. N. S. 2006. Ocorrência de oídio em *Mentha x villosa*. **Summa Phytopathology, Botucatu** 32 (2): 198.

UENO, H. & GONÇALVES, P.C. 1998. **Manual para diagnóstico das helmintoses de bovinos**. 4ª ed. JICA, UFBA-UFRGS.



## CAPÍTULO 3

### AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VIVO* DO HIDROLATO DE *Mentha villosa* Huds. EM NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS

#### RESUMO

As plantas medicinais representam uma alternativa sustentável à quimioterapia convencional com relação às suas propriedades anti-parasitárias. *Mentha villosa* Huds., uma erva aromática pertencente à família Lamiaceae, foi citada em estudos etnofarmacológicos que relatam sua atividade anti-helmíntica para uso humano. Considerando-se que o uso de óleos essenciais é pouco explorado em ruminantes, este experimento objetivou avaliar o efeito anti-helmíntico *in vivo* do hidrolato de *M. villosa*, emulsão do óleo essencial em solução aquosa, em bezerras mestiças (Holandês x Zebu) infectadas artificialmente por nematóides gastrintestinais. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo de tratamento, no qual foi administrado 0,1 ml/kg/dia de hidrolato de *M. villosa* oralmente durante dez dias consecutivos; grupo controle-negativo, no qual foi feita a administração oral de 15 ml de água destilada durante dez dias e grupo controle-positivo, cujos animais receberam Ricobendazol em dose única por via subcutânea. A partir de coletas realizadas diariamente durante o período de tratamento além de duas coletas sete dias e 14 dias após o término do tratamento, procedeu-se o teste de diminuição na contagem de ovos nas fezes. Os resultados mostraram ausência de atividade anti-helmíntica *in vivo* do hidrolato de *M. villosa* nesses animais.

#### INTRODUÇÃO

Por representar uma alternativa sustentável à quimioterapia convencional, o uso de plantas medicinais e o interesse em suas propriedades anti-parasitárias tem aumentado, conforme mostrado por várias revisões na área de medicina veterinária em diferentes continentes (HOUNZANGBE-ADOTE *et al.*, 2005).

Dentre as plantas consideradas promissoras quanto à sua ação no controle de nematóides gastrintestinais está a *Mentha villosa* Huds., uma erva aromática pertencente à família Lamiaceae e já citada por alguns autores em estudos etnofarmacológicos, devido à sua ação anti-helmíntica para humanos (LORENZI & MATOS, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2004; BIESKI 2005).

Os testes *in vivo* avaliam a eficácia anti-helmíntica através da redução da contagem de ovos de helmintos nas fezes dos hospedeiros. Este teste envolve o tratamento de animais infectados natural ou artificialmente e pode ser realizado em ruminantes, eqüídeos e suínos, avaliando todos os tipos de anti-helmínticos e com todas as espécies de nematóides expelidos pelas fezes no estágio de ovo (COSTA, 2004). SEGUNDO ROCHFORD *et al.* (2008), o uso de óleos essenciais é pouco explorado em ruminantes. Além disto, essa área de pesquisa é limitada a estudos *in vitro*, com poucos experimentos realizados *in vivo*. Dessa forma, este experimento objetivou avaliar o efeito anti-helmíntico *in vivo* do hidrolato de *M. villosa*, em bezerras mestiças (Holandês x Zebu) infectadas por nematóides gastrintestinais, através do teste de diminuição na contagem de ovos de nematóides gastrintestinais nas fezes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta da Planta e extração do hidrolato

Foram coletadas amostras das partes aéreas de *M. villosa* às 8:00 na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas na Universidade Federal de Juiz de Fora.

A partir de 100 g da planta, conservada em congelador (-18°C) logo após a coleta, procedeu-se a extração do hidrolato pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger. O material vegetal permaneceu em ebulição em 1L de água durante duas horas. Após descarte do óleo essencial, o hidrolato foi acondicionado em frasco de vidro vedado e protegido da luz dentro do congelador (-18°C). Foram realizadas tantas extrações quantas necessárias para a obtenção do volume de hidrolato suficiente para a realização do teste *in vivo*. Previamente à realização do teste, o frasco contendo hidrolato, utilizado em concentração única de 100%, foi transferido para refrigerador (aprox. 5°C), sendo agitado antes de ser oferecido aos animais.

### Animais experimentais

O teste anti-helmíntico *in vivo* de redução da contagem de ovos fecais foi conduzido no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, situado no município de Valença, RJ.

Foram utilizadas bezerras mestiças (Holandês x Zebu), fêmeas, com oito a dez meses de idade aproximadamente e peso médio de 137,9 kg (Desvio-padrão = 28,2 kg). Estes animais não receberam qualquer tipo de tratamento anti-helmíntico nas doze semanas antecedentes ao início do experimento.

Todos os animais utilizados no experimento apresentavam sua própria identificação, representada por números marcados em brincos plásticos aplicados na orelha e tatuagem. A identificação dos grupos experimentais foi feita por meio da colocação de cordas de nylon coloridas no pescoço, de modo que cada grupo correspondesse a uma determinada cor.

### **Infecção artificial dos animais**

Após análises periódicas do nível de infecção dos animais por meio da contagem de ovos por grama de fezes em *Câmara de McMaster*, de acordo com a técnica modificada de GORDON E WHITLOCK (1939), citada em UENO E GONÇALVES (1998), e tendo em vista o nível de infecção insuficiente para a realização dos testes, conforme detectado nas análises, procedeu-se uma infecção artificial nas bezerras, realizada três meses antes do início dos tratamentos. Para tal, foram coletadas amostras fecais destes animais, seguido do cultivo de larvas de nematóides gastrintestinais pelo método de coprocultura quantitativa, adaptada de UENO & GONÇALVES (1998) e inicialmente descrita por ROBERTS & O'SULLIVAN (1950), utilizando-se os mesmos procedimentos da coprocultura realizada no teste *in vitro* (CAP. 2) entretanto, sem aplicação de qualquer substância e utilizando-se aproximadamente 4 kg de fezes, armazenadas em frascos de vidro com capacidade para 500 ml (FIG. 9)



FIGURA 9: Recipiente contendo coprocultura realizada a partir de amostras de fezes de bezerras mestiças (Holandês x Zebu) contaminadas com ovos de nematóides gastrintestinais, posicionado de maneira invertida, para possibilitar a saída de larvas infectantes (L3) através dos espaços entre o frasco de vidro e a placa de Petri, posteriormente utilizadas em infecção artificial de bezerras criadas no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no Município de Valença, RJ.

As larvas L3 obtidas foram acondicionadas, juntamente com 600 ml de água destilada em um frasco de vidro, mantido sob refrigeração (aprox. 5°C) e enviado em caixa de isopor ao Campo Experimental de Santa Mônica em Valença, RJ, onde a solução contendo as larvas foi administrada oralmente a 24 bezerras por meio de uma seringa descartável.

### **Teste anti-helmíntico *in vivo***

Três meses após a infecção artificial e três dias antes do início do teste (dia -3), os animais foram pesados em balança eletrônica. Três dias previamente ao início dos tratamentos (dias -3 a -1), foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes, diariamente, às 7:30.

A contagem de opg foi realizada a partir da adição de 54 ml de solução hipersaturada de açúcar (composta por 500 g de açúcar, 360 ml de água destilada e 6,5 ml de formol 40%) a 6 g de fezes, de acordo com técnica descrita em UENO & GONÇALVES (1998). Essa mistura foi então homogeneizada e coada para descarte da porção sólida. A parte líquida foi colocada em tubos plásticos com capacidade para 15 ml, sendo feitas três repetições para cada amostra de fezes. Os tubos foram então centrifugados por 3 minutos a 1500 rpm. Posteriormente, o volume dos tubos foi completado com solução de açúcar até obter o menisco na superfície. Colocou-se uma lamínula (20 x 20 mm) sobre cada menisco, onde foi mantida por 10 minutos para que os ovos dos nematóides (menos densos que o líquido) ficassem aderidos a esta. As lamínulas foram então retiradas e colocadas em lâminas, para posterior contagem de todos os ovos presentes, sob microscópio.

A partir da contagem de ovos realizada (média entre os três dias), foram formados três grupos experimentais, sendo os grupos constituídos inicialmente de 6 bezerras. No entanto, como o grupo tratado apresentou um animal discrepante quanto à contagem de opg., este foi retirado da amostra, resultando assim, em dois grupos-controle formados por 6 animais, e um grupo-tratado constituído por 5 animais.

- 1- grupo controle-negativo (água destilada);
- 2- grupo de tratamento (hidrolato a 100% de *Mentha villosa*);
- 3- grupo controle-positivo (anti-helmíntico sintético Ricobendazole®).

A administração das substâncias dos grupos 1 e 2 foi realizada uma vez ao dia, sempre entre 7:30 e 8:00, durante dez dias consecutivos (dia 0 ao dia +9), sendo feitas oralmente por meio de uma seringa descartável inserida no canto da boca dos animais, para evitar o fechamento da goteira esofágica, reflexo da amamentação, que faz com que o leite vá ao abomaso sem cair no rúmen (FIG. 10). No grupo 1, foram administrados 15 ml de água destilada igualmente para todos os animais. Os animais do grupo 2 receberam hidrolato na

dose de 0,1 ml/kg/dia, dosagem esta superestimada em cinco vezes a partir do indicado tradicionalmente para humanos (MARTINS *et al.*, 1995), calculado com base na massa fresca da planta, por volume de hidrolato obtido na extração, já que não foi encontrada na literatura uma dosagem da espécie vegetal em questão, utilizada em bovinos. Nos animais do grupo 3 foi aplicado o anti-helmíntico Ricobendazole® (sulfóxido de albendazol, veículo q.s.p. - Ourofino) no primeiro dia de tratamento (dia 0) por via subcutânea no pescoço dos animais, em dose única de 1 ml/40 kg com auxílio de pistola dosificadora, conforme indicado pelo fabricante.



FIGURA 10: Administração oral em bezerra mestiça (Holandês x Zebu) do hidrolato de *Mentha villosa* Huds., por meio de uma seringa descartável, na dose de 0,1 ml/kg/dia durante dez dias consecutivos, em teste anti-helmíntico *in vivo* dessa substância, realizado nos meses de agosto e setembro de 2007, no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Empresa Gado de Leite, localizado no Município de Valença, RJ.

Previamente à realização dos tratamentos (dias -3 a -1), foram coletadas amostras de fezes dos 18 bezerras diretamente da ampola retal, sendo as amostras individualizadas em sacos plásticos e identificadas para realização de nova contagem de opg utilizando-se a técnica de solução de açúcar descrita anteriormente. Estas coletas foram realizadas diariamente durante dez dias (dia +1 ao dia +10) e também uma e duas semanas após o final dos tratamentos (dias +17 e +24). Parte da amostra de fezes da última coleta dos animais do grupo 1 foi utilizada para obtenção de larvas L3 através de coprocultura, usando-se o mesmo método descrito anteriormente, com o objetivo identificar e quantificar as larvas presentes. As larvas foram identificadas utilizando-se o Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes elaborado por UENO & GONÇALVES (1998).

Durante o período de administração dos tratamentos e coleta de fezes, as bezerras foram mantidas em jejum, sempre das 16:00 do dia anterior até o momento em que foram tratadas, sendo então transferidas para piquetes contendo pastagem de capim elefante

(*Pennisetum purpureum*, Schum), além de ração (2 kg/animal /dia) e água *ad libitum* (FIG. 11).



FIGURA 11: Bezerras mestiças (Holandês x Zebu) em piquete, alimentadas com capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum), além de ração (2 kg/animal/dia) e água *ad libitum*, onde foram mantidas das 8:30 às 16:00 durante os dias de realização do teste anti-helmíntico *in vivo* do hidrolato de *Mentha villosa* Huds., realizado durante os meses de agosto e setembro de 2007 no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no Município de Valença, RJ.

### Análise dos resultados

Apesar da separação dos animais entre os grupos ter sido feita de modo que as médias de opg. entre os grupos experimentais fossem as mais próximas possíveis, devido à ocorrência de alto desvio-padrão quanto à contagem de opg. entre os animais componentes dos grupos, bem como entre os grupos experimentais, e isso se tornou ainda mais evidente após a retirada de um animal do grupo tratado, não foi possível realizar comparações entre o grupo-tratado e os grupos-controle. Desse modo, apesar da não utilização de testes estatísticos, os dados referentes à contagem de opg dos grupos-controle estão representados nos resultados, à título de caracterização do acompanhamento realizado nesses animais durante o experimento.

A porcentagem de eficácia do hidrolato testado foi determinada com base na contagem de opg feita durante o tratamento e no pós-tratamento (dias 0 a +9, +17 e +24), tendo como base o período de pré-tratamento (média entre os dias -3, -2, e -1). Para isso, foi empregada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Eficácia do hidrolato (dia X)} = \left( \frac{\text{Média de opg (dias } -3 \text{ a } -1) - \text{Média de opg (dia X)}}{\text{Média de opg (dias } -3 \text{ a } -1)} \right) \times 100$$

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa / UFJF (protocolo: 054/2006-CEA).

## RESULTADOS

O hidrolato de *M. villosa* na dose utilizada (0,1 ml/kg/dia) não provocou redução na contagem de ovos nas fezes das bezerras infectadas por nematóides gastrintestinais, não resultando no efeito anti-helmíntico esperado, o que pode ser verificado nos dados de eficácia do hidrolato testado, nas análises de opg realizadas previamente ao tratamento (dia -1), durante (dias 0 a +9) e após o tratamento (dias +17 e +24) (TAB 3; FIG. 11). Os resultados referentes à contagem de opg (média e desvio-padrão) dos animais tratados com o hidrolato estão representados na TAB 4. Apesar da não realização de testes estatísticos para comparação entre os grupos-controle e o grupo-tratado, os dados referentes ao opg dos animais que receberam água destilada ou Albendazol®, estão registrados na TAB 4.

TABELA 3: Porcentagem de eficácia anti-helmíntica do hidrolato extraído a partir de folhas e ramos de *Mentha villosa* Huds., administrado oralmente, durante dez dias consecutivos (dias 0 a +9), na dosagem de 1 ml/40 kg/dia, a bezerras, com oito a dez meses de idade, infectadas com nematóides gastrintestinais, criadas no Campo Experimental de Santa Mônica (Valença, RJ), pertencente à Embrapa Gado de Leite. A porcentagem de eficácia foi calculada com base na redução da contagem média de ovos de nematóides por grama de fezes (opg), obtida por comparação entre a contagem de opg realizada no período de pré-tratamento (dias -3 a -1) com a contagem durante o tratamento e no pós-tratamento.

Dias de análise de opg	Eficácia do hidrolato de <i>M. villosa</i> (%)
Dia 0	-4,93
Dia +1	6,96
Dia +2	11,49
Dia +3	8,96
Dia +4	-28,04
Dia +5	1,46
Dia +6	9,8
Dia +7	-77,65
Dia +8	11,35
Dia +9	-131,11
Dia +10	-81,69
Dia +17	-273,31
Dia +24	-175,61

TABELA 4: Contagem de ovos de nematóides por grama de fezes (opg) de bezerras mestiças (Holandês x Zebu), com oito a dez meses de idade, infectadas com nematóides gastrintestinais, tratadas com hidrolato de *Mentha villosa* Huds. administrado oralmente, durante dez dias consecutivos (dias 0 a +9), na dosagem de 1 ml/40 kg/dia (n = 5 bezerras); Ricobendazole® (aplicado no dia 0, por via subcutânea, em dose única de 1 ml/40 kg), constituindo o grupo controle-positivo (n = 6 bezerras) e água destilada, administrada oralmente, durante dez dias consecutivos (dias 0 a +9), constituindo o grupo controle-negativo (n = 6 bezerras) em teste anti-helmíntico *in vivo* realizado no Campo Experimental de Santa Mônica (Valença, RJ), pertencente à Embrapa Gado de Leite. As análises de opg foram realizadas durante os dias de pré-tratamento (dia -1), tratamento (dias +0 a +9) e pós-tratamento (dias +17 e +24).

Dias de análise de opg	Hidrolato de <i>M. villosa</i> (média de opg ± desvio-padrão)	Ricobendazole® (média de opg ± desvio-padrão)	Água destilada (média de opg. ± desvio-padrão)
Dia -1	150,26 ± 68,47	272,84 ± 168,12	270,65 ± 100,29
Dia 0	157,67 ± 179,41	226,06 ± 47,48	357,39 ± 212,60
Dia +1	139,80 ± 215,90	12,39 ± 11,14	241,39 ± 189,75
Dia +2	133,00 ± 159,35	0,72 ± 0,74	244,28 ± 234,56
Dia +3	136,80 ± 207,70	0,28 ± 0,25	245,61 ± 205,25
Dia +4	192,40 ± 147,84	0,50 ± 0,46	313,83 ± 208,79
Dia +5	148,07 ± 130,30	0,44 ± 0,40	301,94 ± 202,08
Dia +6	135,53 ± 186,13	0,11 ± 0,17	373,11 ± 281,06
Dia +7	266,93 ± 411,65	0,72 ± 0,49	267,72 ± 219,54
Dia +8	133,20 ± 139,06	0,11 ± 0,27	227,11 ± 211,75
Dia +9	347,27 ± 297,58	0,17 ± 0,28	250,50 ± 168,91
Dia +10	273,00 ± 385,25	0,11 ± 0,27	186,83 ± 130,07
Dia +17	560,93 ± 701,22	0,50 ± 0,75	374,61 ± 348,39
Dia +24	414,13 ± 556,93	127,89 ± 287,52	249,83 ± 231,07

## DISCUSSÃO

No teste *in vivo*, o hidrolato de *M. villosa*, na dosagem utilizada (1 ml/kg/dia), não provocou redução na contagem de ovos de nematóides nos bovinos amostrados, apesar dos resultados encontrados anteriormente no teste *in vitro* (CAP. 2). Pode ocorrer, com certa frequência, em experimentos que abordem o efeito anti-helmíntico de algumas substâncias, disparidade entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (FURTADO, 2006; ROCHFORD *et al.*, 2008). Outros experimentos anteriormente realizados, também obtiveram resultados de alta eficácia de determinadas substâncias quando estas foram testadas *in vitro*, ao passo que os testes *in*



*vivo* não resultaram em um controle satisfatório da carga parasitária. Por exemplo, *Chenopodium ambrosioides* e seu óleo essencial reduziram a viabilidade dos ovos de *H. contortus* em teste *in vitro*, porém não apresentaram efeito sobre a redução do número de nematóides adultos ou ovos, quando administrada a caprinos (KETZIS *et al.*, 2002). No estudo realizado por COSTA (2004), o extrato etanólico de *Azadirachta indica* inibiu 98,2% da eclosão de ovos na concentração de 3,1 mg/ml e 87,1% do desenvolvimento larval na concentração de 50 mg/ml, no entanto, quando testado *in vivo*, a planta não provocou diferença significativa entre os parâmetros avaliados quando comparado ao grupo controle. Em outros estudos, as plantas medicinais testadas apresentaram efeito anti-helmíntico *in vitro*, mas não *in vivo* sobre nematóides gastrintestinais de ruminantes (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006; FURTADO, 2006; PESSOA, *et al.*, 2002). Isto pode ter ocorrido porque consideráveis diferenças fisiológicas são esperadas de estar presentes entre condições *in vitro* e *in vivo* (GITHIORI *et al.*, 2006). Segundo EGUALE *et al* (2007), o efeito negativo nos testes *in vivo* pode ser atribuído à biotransformação de alguns dos componentes ativos dentro do trato digestivo do hospedeiro. O sistema digestivo peculiar dos ruminantes pode mudar o metabolismo ou o modo de ação de alguns nutrientes, medicamentos ou materiais bioativos quando administrados oralmente (VANDAMME & ELLIS, 2004).

Com relação à metodologia utilizada no teste *in vivo*, o principal método de detecção de resistência de nematóides a anti-helmínticos sintéticos continua sendo o teste de redução na contagem de ovos na fezes, que pode ser usado com todos os grupos de anti-helmínticos (RANGEL *et al.*, 2005; COLES *et al.*, 2006). Esse método também é utilizado por vários autores para analisar a atividade anti-helmíntica de plantas em ruminantes (GITHIORI *et al.*, 2004; CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006; FURTADO, 2006; POMROY & ADLINGTON, 2006) e também recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de acordo a Portaria Nº 48 de 12 de maio de 1997, que regulamenta o licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Segundo FURTADO (2006), a redução na contagem dos ovos nas fezes não está diretamente associada a uma mortalidade do parasito, podendo ocorrer apenas supressão na eliminação dos ovos. Porém, este fato por si só, já é um bom recurso no controle parasitário, pois determina diminuição da contaminação da pastagem, que passa a apresentar menor número de larvas infectantes.

As coletas de fezes para realização da contagem de opg no teste *in vivo* foram feitas em período utilizado comumente em outros experimentos. COLES *et al.* (1992), recomendam que as fezes sejam coletadas entre o dia 10 e o dia 14 após o tratamento, pois a análise em tempo inferior poderia gerar resultados equivocados.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados foi o número de animais utilizados por grupo experimental. COLES *et al.* (1992) recomendam 15 animais por grupo,

entretanto VERCRUYSSSE *et al.* (2001) relataram que, em casos de pesquisa, o experimento pode contar com, no mínimo, seis animais por grupo, assim como recomenda a Portaria Nº 48 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No presente estudo foram utilizados seis animais nos grupos-controle e cinco no grupo-tratado, devido à dificuldade em se obter animais com o mínimo de opg suficiente para a realização do teste, mesmo após realização de infecção artificial. Outros estudos, relativos a teste anti-helmíntico *in vivo* em ruminantes, principalmente utilizando-se ovinos e caprinos, também contaram com seis animais por grupo experimental (FURTADO, 2006; POMROY & ADLINGTON, 2006).

Segundo SILVA *et al.* (2003), outros fatores devem ser levados em consideração quando se está analisando a atividade medicinal de uma planta, como por exemplo, a dose total administrada e o período de jejum antes da administração. No presente estudo, os animais foram mantidos em jejum por, pelo menos, 15 horas antes de receberem os tratamentos, tempo este considerado suficiente para facilitar a propagação da substância testada através do trato gastrointestinal. Por outro lado, o efeito *in vivo* provavelmente poderia ser potencializado pelo aumento da dose ou pela repetição da dose por mais tempo. Isto poderia aumentar o tempo de contato entre o hidrolato e o parasito e, presumivelmente, aumentar a redução na fecundidade destes. Entretanto, o aumento na dose pode causar efeitos tóxicos nos hospedeiros e por isso deve ser feito com cautela.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIESKI, I.G.C. 2005. **Plantas aromáticas no Sistema Único de Saúde da região sul de Cuiabá-MT**. Monografia de especialização, Lavras: UFLA, 92 p.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. 2006. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. 83p.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, **44**: 35-44.

- COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A. & VERCRUYSSSE, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, **136**: 167-185.
- COSTA, C.T.C. 2004. **Atividade anti-helmíntica de *Azadirachta indica* A. Juss sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. 60 p.
- EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A. & MAKONNEM, E. 2007. *Haemonchus contortus*: *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental Parasitology**, **116**: 340-345.
- FURTADO, S.K. 2006. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no Estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 127 p.
- GITHIORI, J.B.; HÖGLUND, J.; WALLER, P.J. & BAKER, R.L. 2004. Evaluation of anthelmintic properties of some plants used as livestock dewormers against *Haemonchus contortus* infections in sheep. **Parasitology**, **129**: 245-253.
- GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S. & THAMSBORG, S.M. 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, **139**: 308-320.
- GORDON, H.M.L. & WHITLOCK, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Commonwealth Scientific and Industrial Organization**, **12**(1): 50-52.
- HOUNZANGBE-ADOTE, M.S., PAOLINI, V., FOURASTE, I., MOUTAIROU, K. & HOSTE, H. 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, **78**: 155-160.

- KETZIS, J.K.; TAYLOR, A.; BOWMAN, D.D.; BROWN, D.L.; WARNIC, L.D. & ERB, H.N. 2002. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. **Small Ruminant Research**, **44**: 193-200.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, SP. 512 p.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. & DIAS, J.E. 1995. **Plantas Mediciniais**. 1<sup>a</sup> ed. Imprensa Universitária. Viçosa, MG. 220 p.
- MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S. & ANDREATA, R.H.P. 2004. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, **18**(2): 391-399.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. **Diário Oficial da União N°92**, de 16 de maio de 1997.
- PESSOA, L.M.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L. & LUCIANO, J.H.S. 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, **109**: 59-63.
- POMROY, W.E. & ADLINGTON, B.A. 2006. Efficacy of short-term of sulla (*Hedysarum coronarium*) to young goats against a mixed burden of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, **136**: 363-366.
- RANGEL, V.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. & SANTOS JR, E.J. 2005. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **57** (2): 186-190.
- ROBERTS, F.H.S. & O'SULLIVAN, J.P. 1950. Methods of egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agricultural Research**, **1**: 99-102.

- ROCHFORD, S.; PARKER, A.J.; DUNSHEA, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**, **69**: 299-322.
- SILVA, S.L.C.; BORBA, H.R.; BONFIM, T.C.B.; CARVALHO, MG; CAVALCANTI, H.L. & BARBOSA, C.G. 2003. 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**, **58**: 23-29.
- UENO, H. & GONÇALVES, P.C. 1998. **Manual para diagnóstico das helmintoses de bovinos**. 4ª ed. JICA, UFBA-UFRGS.
- VANDAMME, TH.F. & ELLIS, K.J. 2004. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **56**: 1415-1436.
- VERCRUYSSSE, J., HOLDSWORTH, P., LETONJA, T., BARTH, D., CONDER, G., HAMAMOTO, K., OKANO, K., 2001. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines. **Veterinary Parasitology**, **96**: 171-193.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram a presença de alto teor relativo de óxido de piperitenona no hidrolato de *Mentha villosa* Huds., por meio de análise cromatográfica, substância considerada por alguns autores como responsável pelo efeito anti-helmíntico da planta, que tem sido relatada em estudos etnofarmacológicos. Apesar de o hidrolato mostrar-se efetivo no controle de larvas de nematóides gastrintestinais de bovinos em teste *in vitro*, este não causou uma redução na contagem de ovos por grama de fezes em bezerras infectadas por nematóides gastrintestinais, quando administrado oralmente aos animais durante dez dias. A partir dos resultados obtidos, outras metodologias poderão ser utilizadas em busca da possível comprovação antiparasitária desta planta para o controle de helmintos de ruminantes, bem como de outros animais, incluindo testes pré-clínicos, utilizando-se outros modelos experimentais que possam contribuir para a validação do efeito anti-helmíntico de *M. villosa* também em humanos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AMARANTE, A.F.T. 2004. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **13** (0): 68-71.
- ANTHONY, J.P.; FYFE, L. & SMITH, H. 2005. Plant active components – a resource for antiparasitic agents?. **Trends in Parasitology**, **21**(10): 462 – 468.
- ATHANASIADOU, S; GITHIORI, J. & KYRIAZAKIS, I. 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, **1**(9): 1392-1400.
- BIESKI, I.G.C. 2005. **Plantas aromáticas no Sistema Único de Saúde da região sul de Cuiabá-MT**. Monografia de especialização, Lavras: UFLA, 92 p.
- BORDIN, E.L. 2004. Algumas considerações sobre a resistência de nematodas gastrintestinais de ruminantes aos anti-helmínticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **13**, (0): 80-81.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. 2006. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. 83 p.
- CHAGAS, A.C.S. 2004. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **13** supl.(1): 156-160.
- CHECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, **21** (1): 99-105.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. 1979. London: Academic Press, p. 158-222.
- FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M.; HUSS, J.C.C.; SOUZA, T.M.T.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B. & PENHA-SILVA, N. 2008. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, **22**: 219-224.

- FURTADO, S.K. 2006. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no Estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 127 p.
- GUEDES, D.N.; SILVA, D.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. & MEDEIROS, I.A. 2004a. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytomedicine**, **11**: 490-497.
- GUEDES, D.N.; SILVA, D.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. & MEDEIROS, I.A. 2004b. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, **37** (12): 1881-1887.
- GOBERT, V.; MOJA, S.; COLSON, M. & TABERLET, P. 2002. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany**; **89** (12): 2017-2023.
- INNECO, R.; CRUZ, G.F.; VIEIRA, A.V.; MATTOS, S.H. & CHAVES, F.C.M. 2003. Espaçamento, época e número de colheitas em hortelã-rasteira (*Mentha x villosa* Huds). **Revista Ciência Agronômica**, **34** (2): 247-251.
- KAPLAN, R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, **20** (10): 477-481.
- LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.; LEAL-CARDOSO, J.H. & TOSCANO, C.F. 2001. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetised rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**, **67**(7): 638-643.
- LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H. 2002. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. **Phytomedicine**, **9**: 715-720.
- LIMA, W.S.; FAKURI, E.; GUIMARÃES, M.P. & MALACCO, M.A. 1997. Dinâmica das helmintoses de bovinos de leite na região metalúrgica de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **6** (2): 97-103.



- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, SP. 512 p.
- LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CANIGUERAL, S. 2002. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **45** (4): 1-6.
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C. & CASTRO, C.M.S. 2006. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, **140**(1-2):98-104.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. & DIAS, J.E. 1995. **Plantas Mediciniais**. 1ª ed. Imprensa Universitária. Viçosa, MG. 220 p.
- MARTINS, P.M. 2000. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. Dissertação Mestrado. Viçosa: UFV. 77p.
- MARTINS, N.B.G.; Estudos de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata x suaveolens* (Lamiaceae). 2002. **Bragantia, Campinas**, **61**(3): 205-218.
- MARTINS, A.P.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.; NOVÁK, CS. & ÉHEN, Z. 2007. Preparation and characterization of *Mentha x villosa* Hudson oil- $\beta$ -cyclodextrin complex. **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, **88** (2): 363-371.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 1994. 2ª ed. EUFC. Fortaleza, CE. 179 p.
- MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S. & ANDREATA, R.H.P. 2004. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, **18**(2): 391-399.
- MOBOT. 2008. **Missouri Botanical Garden**. Banco de dados. Disponível em <http://mobot.org>, acesso em janeiro de 2008.

- MONTE, F.J.Q. & OLIVEIRA, E.F. 2001. Triterpenóides pentacíclicos de *Mentha x villosa*: Identificação estrutural e atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, **24** (4): 491-500.
- NASCIMENTO, E.M., POGGIAN, C.F., MOTTA, B.L., PIMENTA, D.S. 2004. Teor de óxido de piperitenona em *Mentha villosa* (Lamiaceae). I – Coleta de ramos senescentes e jovens em diferentes horários. **Anais do X Seminário Mineiro de Plantas Mediciniais**. p. 175-176.
- NASCIMENTO, E.M., BARBOSA, L.S. & PIMENTA, D.S. 2005. Teor de óxido de piperitenona no óleo essencial de *Mentha villosa* Huds (Lamiaceae) em folhas jovens e senescentes submetidas a diferentes métodos de tratamento pós-coleta. **XI Seminário Mineiro de plantas medicinais – 2ª jornada farmacêutica: resumo dos trabalhos**. UFVJM. Diamantina.
- PAULUS, D.; MEDEIROS, S.L.P.; SANTOS, O.S.; RIFFEL, C.; FABBRIN, E.G. & PAULUS, E. 2005. Substratos na produção hidropônica de mudas de hortelã. **Horticultura Brasileira**, **23** (1): 48-50.
- POGGIAN, C.F., NASCIMENTO, E.M., LESSA, B.M. & PIMENTA, D.S. 2004. Detecção de óxido de piperitenona no óleo essencial de seis espécies de *Mentha* (Lamiaceae) cultivadas na UFJF. **Anais do X Seminário Mineiro de Plantas Mediciniais**. P. 173 – 174.
- RADÜNZ, L.L. 2004. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds)**. Tese de Doutorado. Viçosa: UFV. 90 p.
- RANGEL, V.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. & SANTOS JR, E.J. 2005. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **57** (2): 186-190.
- ROCHFORT, S.; PARKER, A.J.; DUNSHEA, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**, **69**: 299-322.

- SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C. & NETO, O.G.R. 2004. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado técnico n. 99**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA.
- SOUSA, P.J.C.; MAGALHÃES, P.J.C.; LIMA, C.C.; OLIVEIRA, V.S. & LEAL-CARDOSO, J.H. 1997. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **30** (6): 787-791.
- SOUTELLO, R.G.V.; SENO, M.C.Z. & AMARANTE, A.F.T. 2007. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, **148**: 360–364.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias das Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum.
- SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S.M.; REBOUÇAS, M.M. & BARCI, L.A.G. 2002. Diagnóstico de enfermidades parasitárias em animais domésticos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, **69** (supl.): 1-306.
- TOZZE JR., H.J.; GARCIA JR., D. & MASSOLA JR. N. S. 2006. Ocorrência de oídio em *Mentha x villosa*. **Summa Phytopathology, Botucatu** **32** (2): 198.
- TRIPATHI, A.K.; PRAJPATI. V.; AHMAD, A.; AGGARWAL, K.K. & KIIANUJA, S.P.S. 2004. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant, toward malarian vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **Journal of Medical Entomology**, **41** (1): 691-698.
- UENO, H. & GONÇALVES, P.C. 1998. **Manual para diagnóstico das helmintoses de bovinos**. 4ª ed. JICA, UFBA-UFRGS.