



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PROSPECÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Jatropha mollissima (POHL) BAILL. (EUPHORBIACEAE) E SEU EFEITO
SOBRE OVOS, LARVAS E ADULTOS DE *Haemonchus contortus* NO
SEMIÁRIDO PARAIBANO**

ANA RAQUEL CARNEIRO RIBEIRO

PATOS-PB

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PROSPECÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Jatropha mollissima (POHL) BAILL. (EUPHORBIACEAE) E SEU EFEITO
SOBRE OVOS, LARVAS E ADULTOS DE *Haemonchus contortus* NO
SEMIÁRIDO PARAIBANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Sistemas Agrosilvipastoris no Semiárido para a obtenção do título de Mestre.

Ana Raquel Carneiro Ribeiro

ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a ANA CÉLIA RODRIGUES ATHAYDE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. WILSON WOUFLAN SILVA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FRANCISCO ERNANI ALVES MAGALHÃES

**Patos-PB
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

R484p Ribeiro, Ana Raquel Carneiro
Prospecção química, toxicidade do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) e seu efeito sobre ovos, larvas e adultos de *Haemonchus contortus* no semiárido paraibano. / Ana Raquel Carneiro Ribeiro. – Patos, 2014.
32f.: color.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.

“Orientação: Profa. Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde”

“Coorientação: Prof. Dr. Wilson Wouflan Silva; Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães”.

Referências.

1. Plantas medicinais. 2. Nematódeos gastrintestinais. 3. Ovinos.
I.Título.

CDU 636: 633.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Prospecção química, toxicidade do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (POHL) BAILL. (EUPHORBIACEAE) e seu efeito sobre ovos, lavas e adultos de *Haemonchus contortus* no semiárido paraibano”

AUTORA: ANA RAQUEL CARNEIRO RIBEIRO

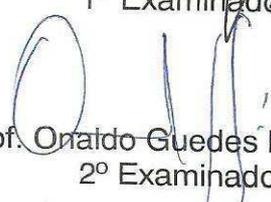
ORIENTADORA: Prof^a. Dra. ANA CÉLIA RODRIGUES ATHAYDE

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO


Prof.^a Ana Célia Rodrigues Athayde
Presidente


Prof. Adriano Fernandes Ferreira
1º Examinador


Prof. Onaldo Guedes Rodrigues
2º Examinador

Patos - PB, 27 de fevereiro de 2014


Prof. Onaldo Guedes Rodrigues
Coordenador

**“... Cantar e cantar e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz...”
(Gonzaguinha)**

Dedico:
Aos meus pais, Hildebrando e Lindaci e à minha irmã Esther, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pela vida, saúde e sabedoria a mim concedidas;

Aos meus avós Raimunda e Raimundo, pela acolhida aqui em Patos;

À professora Ana Célia, por aceitar me orientar e pela ajuda sempre que possível;

Ao professor Wouflan, por me ensinar tanto as práticas de laboratório quanto à escrita dos artigos e estar sempre disponível para me auxiliar;

Ao professor Ernani, que foi meu orientador na especialização e continuou me ajudando no mestrado, disponibilizando o laboratório e equipe, como ele disse “UNIDOS VENCEREMOS”;

Aos componentes do Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia da UECE/CECITEC/Tauá - CE, pela ajuda nas coletas, preparação de extratos, testes fitoquímicos e toxicológicos. Em especial à Daniele, Marcos Monteiro, Marcos Cavalcante, Messias, Flaviana, Cristiane e Gleiziane;

Aos companheiros de luta durante o experimento, Fábio e Do Carmo, na lida com os animais e testes em laboratório;

A todos os integrantes do laboratório de Bioquímica da UFCG, em especial ao Professor Vicente Queiroga, Professora Rosália, e à técnica Aline, pelo suporte concedido com materiais de laboratório e equipamentos;

Ao Professor Adriano e toda a equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFCG, em especial Auricélia e Eduardo, pela ajuda nos exames hematológicos;

Aos colegas que estudaram estatística noite e dia comigo: Fabíola, Evanaldo, Avelar, Caio, Aldo e Érico;

Aos demais colegas de turma: Flaviana, Márcia, Lívia, Milenna, Raissa, Thays, Edgar, Rafael, Alânia e Nalberlania;

Aos professores da Pós-Graduação em Zootecnia: Olaf Bakke, Cleber, Jacob, Ardebal e Bonifácio;

Ao secretário do programa, Ari Cruz, pela sua eficiência, dedicação e amizade com todos nós alunos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO 1.....	12
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2.....	22
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS.....	27
CONCLUSÃO	30
ANEXOS	32

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 01. Classificação de metabolitos e intensidade nas diversas partes da <i>Jatropha mollissima</i>	14
TABELA 02. Média do número de óbitos de <i>A. salina</i> frente às frações testadas e suas respectivas concentrações.....	15
TABELA 03. Valores de CL ₅₀ calculados para os diferentes extratos de <i>Jatropha mollissima</i> e respectivos intervalos de confiança de 95%.....	16

CAPÍTULO 2

Quadro 01: Delineamento do experimento <i>in vivo</i> com ovinos SRD submetidos a tratamentos com <i>J. mollissima</i> no semiárido paraibano.....	27
Quadro 02. Valores da CL ₅₀ calculados para o extrato do caule de <i>Jatropha mollissima</i> e intervalo de confiança de 95%.....	27
Quadro 03. Eficiência do extrato etanólico do caule de <i>Jatropha mollissima</i> sobre <i>Haemonchus contortus</i> de ovinos.....	27
Quadro 04. Média aritmética retransformada $[(\log (x+1))]$ e desvio padrão do OPG de ovinos artificialmente infectados com <i>H. contortus</i> , submetidos a diversos tratamentos com extrato etanólico de <i>J. mollissima</i>	27
Quadro 05. Valores percentuais médios do hematócrito (Ht) de ovinos artificialmente infectados com <i>Haemonchus contortus</i> nos diversos tratamentos.....	28

RIBEIRO, Ana Raquel Carneiro. **Prospecção química, toxicidade do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) e seu efeito sobre ovos, larvas e adultos de *Haemonchus contortus* no semiárido paraibano.** Patos, PB: UFCG, 2013. 32 p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar o potencial farmacológico da *Jatropha mollissima* (pinhão-bravo), como uma possível fonte de metabólitos com ação anti-helmíntica. Para tanto, realizou-se prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas, caule e raiz de *Jatropha mollissima*, bem como ensaios de toxicidade aguda (CL50) sobre *Artemia salina*, com os extratos nas concentrações 100, 500 e 1000 µg/mL. O extrato foi testado em coproculturas contendo larvas infectantes de *Haemonchus contortus*, na concentração 660,80 µg/ml e em animais a 660,80µg/ml e 1321,6µg/ml de concentração. Amostras de fezes foram coletadas semanalmente e, de sangue, quinzenalmente. Como resultado, foi confirmada a presença de: fenóis, taninos, flavonoides, xantonas, esteroides, triterpenóides, alcaloides, cumarinas e saponinas. Sobre *A. salina*, a evolução da toxidade dos extratos foi diretamente proporcional à concentração, sendo que a raiz revelou maior grau de toxicidade, seguida da folha e caule, com valores de CL50 223,61, 406,02 e 660,80, respectivamente. O extrato etanólico de *J. mollissima* inibiu a eclosão de ovos e o desenvolvimento de larvas de *H. contortus*, apresentando uma eficiência de 70,77%. O teste *in vivo* revelou 47 e 44% de redução do OPG nos grupos tratados com o extrato e apenas 13% com a ivermectina. Mesmo parasitados, os animais permaneceram clinicamente saudáveis e sem anemia. *Jatropha mollissima* demonstra ter potencial farmacológico e representa uma alternativa ao controle da verminose ovina.

Palavras-chave: Plantas medicinais, nematódeos gastrintestinais, ovinos.

RIBEIRO, Ana Raquel Carneiro. **Chemical prospecting, toxicity of the ethanol extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) and its effects on eggs, larvae and adults of *Haemonchus contortus* in semiarid of Paraíba.** Patos, PB: UFCG, 2013. 32 p. (Dissertation - Master's Degree in Zootechnics).

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the pharmacological potential of *Jatropha mollissima* (pinhão-bravo) as a possible source of metabolites with anthelmintic action. For this, we conducted the phytochemical screening of ethanol extracts of leaves, stem and root of *Jatropha mollissima*, as well as acute toxicity tests (LC50) on *Artemia salina*, with extracts at concentrations of 100, 500 and 1000 µg/mL. The extract was tested in fecal cultures containing infective larvae of *Haemonchus contortus*, at concentration of 660,80 µg/ and in animals at concentrations of 660,80µg/ml and 1321,6µg/ml. Fecal samples were collected weekly while blood ones were collected each fifteen days. As a result, it was confirmed the presence of phenols, tannins, flavonoids, xanthones, steroids, triterpenoids, alkaloids, coumarins and saponins. On *A. salina*, the evolution of the toxicity of the extracts was directly proportional to the concentration. The root showed higher degree of toxicity, followed by leaf and stem, presenting LC50 values of 223,61, 406,02 and 660,80 respectively. The ethanol extract of *J. mollissima* inhibited the hatching of eggs and the development of larvae of *H. contortus*, presenting an efficiency of 70.77%. *In vivo* test revealed an OPG reduction of 47 and 44% in the groups treated with the extract and only 13% with ivermectin. Even parasitized, animals remained clinically healthy and without anemia. *Jatropha mollissima* demonstrates to have pharmacological potential and represents an alternative to the control of sheep worms.

Keywords: Medicinal Plants, Gastrointestinal Nematodes, Sheep.

INTRODUÇÃO

A criação de ovinos e caprinos é uma importante fonte de renda para a região nordeste, no entanto, ainda é praticada de forma empírica e extensiva, posto que adota pouca tecnologia, além de apresentar baixos níveis de produtividade e de rentabilidade econômica. No Brasil, a caprinocultura constitui uma das atividades mais importantes, pois gera renda por via direta (criação) e indireta (queijarias e fábricas de couro). Entretanto, problemas nutricionais, de manejo e sanitários limitam a produção, que gera perdas econômicas e diminuição da rentabilidade dos rebanhos.

As helmintoses gastrintestinais representam a maior parcela de prejuízos para o setor produtivo. Os principais gêneros parasitas de caprinos e ovinos são: *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongylus*, *Moniezia*, *Cooperia*, *Oesophagostomum*, *Skrjabinema*, *Trichuris* e *Cysticercus*. O controle dessas parasitoses é feito principalmente empregando-se anti-helmínticos sintéticos, sem estudo prévio das reais causas de infecções. Essas drogas são administradas de maneira indiscriminada, podendo selecionar linhagens resistentes, poluir o meio ambiente, aumentar os riscos de intoxicação e os custos de produção.

Diante do exposto, a fitoterapia surge como uma alternativa, devido ao largo uso de plantas em medicina popular e à diversidade de espécies vegetais encontradas no Brasil, dentre as quais se destaca *Jatropha mollissima*, popularmente conhecido como pinhão-bravo, endêmico da Caatinga, que é usado empiricamente no combate a infecções diversas e estudado quanto a ações antimicrobianas.

Esses efeitos biológicos dos vegetais devem-se à presença de metabólitos secundários, substâncias químicas que a planta produz em resposta aos estímulos ambientais, como atração de polinizadores e defesa contra pragas. Dentre eles, são bastante estudados: fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavanóis, flavanonóis, xantonas, saponinas, cumarinas e quinonas.

No entanto, a maior parte das plantas medicinais nativas continua sendo usada de forma tradicional, sem conhecimento dos seus princípios ativos e efeitos colaterais, de modo que em muitas espécies esse estudo ainda não foi realizado. Portanto, depreende-se que são imprescindíveis novos estudos de prospecção de plantas medicinais, como fonte de princípios ativos para novas drogas, assim como testes pré-clínicos que evitem o uso desnecessário de animais, barateando os custos com pesquisas e obtendo resultados mais rápidos e precisos.

CAPÍTULO 1

**Prospecção fitoquímica e determinação da toxicidade de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill em
larvas de *Artemia salina* Leach**

(Manuscrito enviado ao periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)

Prospecção fitoquímica e determinação da toxicidade de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill em larvas de *Artemia salina* Leach

Ana Raquel Carneiro Ribeiro^{1*}; Fábio Duarte de Andrade¹; Maria do Carmo de Medeiros¹; Dayana Firmino de Moraes¹; Antonielson dos Santos²; Daniele Rodrigues de Lima³; Francisco Ernani Alves Magalhães³; Wilson Wouflan Silva²; Ana Célia Rodrigues Athayde¹

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG ²Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG ³Laboratório de Bioprospecção de produtos Naturais e Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará – UECE

Realizou-se a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas, caule e raiz de *Jatropha mollissima*, para identificação de seus constituintes químicos. A prospecção foi realizada por diferentes métodos envolvendo reações colorimétricas e de precipitação. Também foram montados ensaios de toxicidade aguda (CL50) sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, com os extratos etanólicos nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL. Como resultado desse trabalho, foi confirmada a presença de vários metabólitos secundários: fenóis, taninos, flavonoides, xantonas, esteroides, triterpenóides, alcaloides, cumarinas e saponinas. Os extratos se mostraram tóxicos sobre *A. salina*, com valores de CL50 menores que 1000 µg/mL e a evolução da toxicidade dos extratos foi diretamente proporcional à concentração. O extrato da raiz revelou maior grau de toxicidade, seguida da folha e caule, com valores de CL50 respectivamente 223,61; 406,02 e 660,80. Os resultados apresentados nesse trabalho corroboram a importância de plantas da Caatinga como novas fontes de metabólitos secundários com possível ação farmacológica.

Palavras-chave: Plantas medicinais, concentração letal, semiárido.

Phytochemical prospecting of ethanol extracts of the leaves, stem and root of *Jatropha mollissima* was conducted in order to have their chemical constituents identified. The prospecting was carried out by different methods involving colorimetric reactions and precipitation. Acute toxicity tests (LC50) against micro crustacean *Artemia salina* were also performed with ethanol extracts in concentrations of 100, 500 and 1000 µg/mL. As a result, we confirmed the presence of various secondary metabolites: phenols, tannins, flavonoids, xanthonenes, steroids, triterpenoids, alkaloids, coumarins and saponins. The extracts proved toxic against *A. salina* with CL50 values less than 1000 µg/mL and the evolution of the toxicity of the extracts was directly proportional to the concentration. The root extract showed a higher level of toxicity, followed by the leaf and stem extracts, with CL50 values of 223.61, 406.02 and 660.80 respectively. The results presented in this study confirm the importance of plants from Caatinga as new sources of secondary metabolites with possible pharmacological action.

Keywords: Medicinal plants, lethal concentration, semiarid.

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, a humanidade faz uso de plantas na medicina popular (Arcanjo *et al.*; 2012), esse conhecimento empírico se manteve até a atualidade e é importante como ponto de partida para o estudo científico de plantas medicinais, que ainda são escassos (Silva *et al.*, 2010). Após o estudo etnofarmacológico segue-se o estudo fitoquímico, por meio do qual é detectada a presença de metabólitos especiais, dentre eles fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavanóis, flavanonóis, xantonas, saponinas, cumarinas e quinonas (Rêgo Júnior *et al.*, 2011).

Para se avaliar o efeito tóxico desses metabolitos em laboratório, tem se usado como modelo o microcrustáceo marinho *Artêmia salina* (Nguta *et al.*; 2012). Esse ensaio é bastante utilizado como triagem inicial para bioatividade de produtos vegetais, pelo seu baixo custo, praticidade, rapidez na obtenção de resultados e por evitar o uso desnecessário de animais na experimentação farmacológica (Mukherjee, Patil, 2012).

A planta *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill., pertence à família Euforbiaceae e é popularmente conhecida como “pinhão-bravo”. É uma planta endêmica do bioma Caatinga, possui porte arbustivo e suas folhas caducam na época seca (Pompelli *et al.*, 2011). O látex e as folhas são tradicionalmente usadas como antiofídico (Roque *et al.*, 2010). Estudos anteriores têm demonstrado a presença de metabólitos especiais com ação antioxidante, citotóxica, moluscicida e larvicida (Melo *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012).

Baseado no exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a prospecção química preliminar para identificar seus constituintes químicos e estudar a CL50 dos extratos etanólicos de *Jatropha mollissima* sobre *Artemia salina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Botânico

Os procedimentos de coleta e herborização do material vegetal foram realizados baseando-se nas metodologias de Cartaxo *et al.* (2010). As plantas foram coletadas na microrregião dos Inhamuns (Tauá-Ceará), (040°18'05,4" W; 06°01'03,6" S). A exsiccata da planta encontra-se armazenada no Herbário Carirense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri-URCA, sob o número 6675.

Obtenção dos Extratos Botânicos

Foram confeccionados extratos etanólicos das folhas, caule e raiz de *J. mollissima*, cuja preparação baseou-se em metodologias de Pereira *et al.* (2009), com adaptações. Utilizou-se etanol 96% como solvente orgânico e após 96h de extração a frio, foram realizadas filtrações simples e os extratos orgânicos mantidos à temperatura ambiente ($30\pm 2^\circ\text{C}$) para evaporação total do solvente.

Prospecção química

Realizou-se prospecção química preliminar dos extratos orgânicos bioativos baseando-se em metodologias propostas por Silva *et al.* (2009) e Matos (2000). Foram executados testes qualitativos para identificar a presença de fenóis, taninos, flavanonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, esteroides, triterpenóides, alcaloides, cumarinas e saponinas. Os ensaios foram feitos em triplicata para cada extrato e como controles negativos, mantiveram-se tubos de ensaio contendo água destilada nas mesmas condições de cada teste.

Determinação da CL50

Os ensaios basearam-se na metodologia descrita por Araújo *et al.* (2010). Os testes foram realizados em triplicata com dez náuplios de *A. salina* em placas de Eliza contendo solução salina e extrato dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% para as concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ com um volume final de 5 mL por poço. Como controle positivo utilizou-se hipoclorito de sódio (NaClO) a 1%, como controles negativos solução salina e DMSO 1%. Após 24h em contato com essas soluções, realizou-se a contagem do número de náuplios sobreviventes, sendo consideradas mortas as larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos.

Análise dos dados

Para avaliar os resultados da prospecção química, foi realizada análise descritiva das mudanças de coloração e formação do precipitado. Os constituintes químicos dos extratos foram classificados em forte (+++), médio (++) , fraco (+) e ausente (-).

Na verificação da evolução da toxicidade do extrato de *J. mollissima* frente a *A. salina*, os valores obtidos com a médias dos náuplios mortos foram submetidos à análise estatística, estimando-se a concentração letal para 50% (CL50) das larvas através do método de Análise

de Probitos, pelo teste Spearman-Kärber com 95% de intervalo de confiança, utilizando-se o programa TRIMMED versão 1.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises fitoquímicas da *J. mollissima* revelaram a presença de metabólitos especiais nas diversas partes da planta (Tabela 01). Os testes demonstraram que na folha, caule e raiz houve variação na intensidade e nas classes de metabólitos. Nas folhas e no caule foi verificada a presença de taninos, metabólitos que possuem ação cicatrizante e antimicrobiana (Campos *et al.*, 2011).

Em todas as partes da planta observou-se presença de flavonóides, conhecidos por sua ação antioxidante (Duavy *et al.*, 2012). Apenas na raiz foi verificada a presença de fenóis, também com ação anti-oxidante (Pereira, Cardoso, 2012). As cumarinas, encontradas nos extratos das folhas, caule e raiz de *J. mollissima* possuem ação larvicida (Lima *et al.*, 2009). Nas folhas houve também a presença de saponinas, moléculas biologicamente ativas responsáveis por ação antioxidante, citotóxica e larvicida (Garcez *et al.*, 2013).

Estudos anteriores de caracterização química de extratos de plantas do gênero *Jatropha*, demonstraram a presença de alcaloides, cumarinas, taninos, flavonoides e saponinas (Ebuehi, Okorie, 2009; Hirota, 2011).

TABELA 01. Classificação de metabolitos e intensidade nas diversas partes da *Jatropha mollissima*

Classes de Metabólitos	<i>Jatropha mollissima</i>		
	Folha	Caule	Raiz
Esteroides	++	++	-
Triterpenóides	-	-	+++
Alcalóides	+	++	-
Cumarinas	++	+	+++
Saponinas	++	-	-
Flavanonóis	+++	++	++
Xantonas	+++	++	++
Fenóis	-	-	+++
Taninos	+++	+	-

Forte (+++), médio (++), fraco (+) e ausente (-).

A evolução da toxicidade dos extratos das diversas partes de *Jatropha mollissima* frente à *A. salina* foi diretamente proporcional à concentração dos extratos (Tabela 02). Houve mortalidade em todos os extratos testados e o número de óbitos de náuplios de *A. salina* variou de acordo com a parte da planta testada, sendo que o extrato da raiz foi o mais letal para os náuplios. Resultados similares foram encontrados por Medeiros *et al.* (2012), que também observaram maior toxicidade nos extratos da raiz de *Senna alata*. Provavelmente a raiz, por estar em constante atividade metabólica, concentra maior quantidade de metabólitos especiais que são os responsáveis pela toxicidade da planta (Viana *et al.*, 2008).

TABELA 02. Média do número de óbitos de *Artemia salina* frente às frações testadas e suas respectivas concentrações.

Concentrações dos Extratos ($\mu\text{g/mL}$)	Extratos Etanólicos de <i>J.mollissima</i>			Controles		
	Folha	Caule	Raiz	NaClO 1%	Solução Salina	EtOH 70
Número de óbitos de <i>A. salina</i>						
100	4	0	14	19	3	1
500	15	2	19	19	3	4
1000	26	30	27	19	3	7

NaClO 1%(solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%); EtOH 70 (etanol a 70% nas concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) e 95% intervalo de confiança.

As concentrações letais para 50% (CL50) dos náuplios de *A. salina* dos extratos das diversas partes de *J. mollissima* diferiram, sendo que o extrato da raiz apresentou maior grau de toxicidade, seguida dos da folha e caule (Tabela 03). Estes resultados comprovam a ação bioativa desses extratos de acordo com classificação descrita por Mayer (1982), que considera tóxicos extratos que apresentam CL50 abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A toxicidade é um parâmetro utilizado em testes para a detecção de substâncias bioativas e os resultados de seu estudo relacionam-se a diversas ações biológicas, como antimicrobiana e anti-helmíntica (Amarante *et al.*, 2011).

TABELA 03. Valores de CL₅₀ calculados para os diferentes extratos de *Jatropha mollissima* e respectivos intervalos de confiança de 95%.

<i>Jatropha mollissima</i>	CL ₅₀ (µg/mL)
Folha	406,02
Caule	660,80
Raiz	223,61

CL₅₀ (concentração letal para 50% dos náuplios de *A.salina*)

CONCLUSÃO

O presente estudo com os extratos etanólicos das folhas, caule e raiz da espécie *Jatropha mollissima* confirma presença de esteroides, triterpenóides, alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonóides, xantonas, fenóis e taninos. Os extratos testados para todas as partes da planta apresentaram toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina*, sugerindo a perspectiva na montagem de *screenings* de atividades biológicas.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amaz.*, v.41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 31, n. 1, p. 205-209, 2010.
- ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M. G. F; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz. J. Biol.*, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- CAMPOS, M. B.; COSTA, A. L. P.; BARBOSA, L. P. J. L.; BARBOSA, F. H. P. Análise qualitativa fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico da casca de

Bertholletia excelsa Humb. & Bomple (Lecytidaceae) frente a microrganismos gram-negativo. *Ci. Equat.*, v.1, n.2, p. 6-14, 2011.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 131, p. 326-342, 2010.

DUAVY, S. M. P.; SILVA, L. J.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G. Atividade biológica de extratos de folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm. Estudo *in vitro*. *Cad.Cult. Ci.*, v.11, n.1, p.12-19, 2012.

EBUEHI, O. A.; OKORIE, N. A. Phytochemical screening and quantification of flavonoids from leaf extract of *Jatropha curcas* Linn. *Nig Q J Hosp Med.*, v.19, n. 4, p. 200-5, 2009.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. *Rev. Virtual Quim.*, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

HIROTA, B. C. K.; MIYAZAKI, C. M. S.; MERCALI, C. A.; VERDAN, M. C.; KALEGARI, M.; GEMIN, C.; LORDELLO, A. L. L.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. C-glycosyl flavones and a comparative study of the antioxidant, hemolytic and toxic potential of *Jatropha multifida* leaves and bark. *Int. J. Phytomed.*, v.4, n. 1, p. 1-5, 2012.

LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, T. G.; SILVA, M. B. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Pl. Daninha*, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

MATOS, F. J. A. *Introdução a Fitoquímica Experimental*, 2ª Edição, UFC, Fortaleza, Brasil, 2000.

MEDEIROS, E. V.; VIANA, M. G.; ALBUQUERQUE, C. C.; VIANA, F. A.; SILVA, K. M. B. Extrato etanólico de *Senna alata* no controle de *Fusarium oxysporum*, causador da murcha-de-fusarium do meloeiro. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambi.*, v.16, n.11, p.1166–1170, 2012.

MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. *Molecules*, v. 15, p. 8534-8542, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E.; MCL. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Medic. Pl. Res.*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MUKHERJEE, A.; PATIL, S. D. Effects of Alkaloid Rich Extract of *Citrullus colocynthis* Fruits on *Artemia Salina* and Human Cancerous (MCF-7 AND HEPG-2) Cells. *J. PharmaSciTech.*, v.1, n.2, p.15-19, 2012.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYAB, D. W.; GATHUMBIC, P. K.; KABASAD, J. D.; KIAMAE, S. G. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Open Conf. Proceed. J.*, v.3, p.30-34, 2012.

PEREIRA, E. C.; LUCETTI, D. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRITO, E. M.; MONTEIRO, V. S.; PATROCÍNIO, M. C. A.; MOURA, R. R.; LEAL, L. K. A. M.; MACEDO, D. S.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; VASCONCELOS, S. M. M. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. *Neurosc. Lett.*, v. 454, n. 2, p. 139-142, 2009.

PEREIRA, R. J. P; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *J. Biotec. Biodivers.*, v.3, n. 4, p. 146-152, 2012.

POMPELLI, M. F.; OROZCO, A. J. J.; OLIVIERA, M. T.; RODRIGUES, B. R. M.; BARBOSA, M. O.; SANTOS, M. G.; OLIVEIRA, A. F. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. *Agronom. Colomb.*, v. 29, n. 2, p. 231-240, 2011.

RÊGO JÚNIOR, N. O.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; SILVA, L. C.; GUALBERTO, S. A.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, M. V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. *Brazil. J. Food Technol.*, v. 14, p.50-57, 2011.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SANTOS, E. A.; CARVALHO, C. M.; COSTA, A. L. S.; CONCEIÇÃO, A. S.; MOURA, F. B.; SANTANA, A. E. G. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, v. 2012, p.1-9, 2012.

SILVA, A. L. R.; SOUZA, C. R.; PINTO, C. C. C.; MENEZES, J. E. S. A.; GÓES, N. G. Abordagem Fitoquímica das Folhas, Flores e Casca do Caule de *Combretum Leprosum* Mart. *Quím. Bras.*, v. 3, p. 47-57, 2009.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Sci. Plena*, v. 6, n. 2, p.1-17, 2010.

VIANA, M. G.; ALBUQUERQUE, C. C.; MEDEIROS, E. V.; VIANA, F. A.; SILVA, K. M. B. Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monosparacus cannonballus*. *Ci. Agrotec.*, v.32, p.1387-1393,2008.

CAPÍTULO 2

Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano

(Manuscrito enviado ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano

Ana R.C. Ribeiro^{2*}, Fábio D. de Andrade², Maria do C. de Medeiros², Alricélia da S. Camboim³,
Francisco A. Pereira Júnior², Onaldo G. Rodrigues², Wilson W. Silva² e Ana C.R. Athayde²

ABSTRACT.- Ribeiro A.R.C., Andrade F.D., Medeiros M.C., Camboim A.S., Pereira Jr F.A., Rodrigues O.G., Silva W.W. & Athayde A.C.R. 2014. [Study of the anthelmintic activity of the ethanol extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) on *Haemonchus contortus* in sheep of the Paraíba semiarid, Brazil.] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Rodovia Patos-Teixeira Km Zero, Jatobá, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: a.raquel.ribeiro@hotmail.com

This study aimed to evaluate the anthelmintic effect of *Jatropha mollissima* through *in vitro* and *in vivo* experiments. Initially we investigated the concentration of extract with bioactive effect, through the toxicity evolution test of the ethanol extract of *J. mollissima* on the microcrustacean *Artemia salina*, obtaining CL50 concentration of 660.80 µg/ml, which was tested in fecal cultures containing infective larvae of *Haemonchus contortus* and in animals for the verification of OPG reduction. For *in vivo* test, the extract was dissolved in water to obtain concentrations of 660.80µg/ml and 1321.6µg/ml. Feces were collected weekly and blood was collected every fifteen days. As a result of *in vitro* test, the ethanol extract of the stem of *Jatropha mollissima* proved toxic on *A. salina*, with CL50 less than 1000 µg/ml and inhibited the eggs hatching and the development of larvae of *H. contortus*, presenting an efficiency of 70.77%. *In vivo* test revealed that the extract is also effective in sheep, with a significant reduction in the count of OPG after 28 days of experiment, 47 and 44% of reduction in the groups treated with the extract and only 13% with ivermectin. Even parasitized, the animals remained clinically healthy and without anemia. The ethanol extract of the stem of *Jatropha mollissima* may represent an alternative to the control of sheep worms, because it slows the parasitic resistance.

INDEX TERMS: Medicinal plants, secondary metabolites, gastrointestinal nematodes.

RESUMO - Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar o efeito anti-helmíntico de *Jatropha mollissima* por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente foi investigada a concentração de extrato com efeito bioativo, pelo teste de evolução da toxicidade do extrato etanólico de *J. mollissima* sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, obtendo uma CL50 de 660,80 µg/ml, que foi testada em coproculturas contendo larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e em animais para a verificação da redução do OPG. Para o teste *in vivo* o extrato foi dissolvido em água para se obter as concentrações 660,80µg/ml e 1321,6µg/ml, foram coletadas fezes semanalmente e sangue quinzenalmente. Como resultados dos testes *in vitro*, o extrato etanólico do caule de *Jatropha mollissima* mostrou-se tóxico sobre *A. salina*, com CL50 abaixo de 1000 µg/ml e inibiu a eclosão de ovos e o desenvolvimento de larvas de *H. contortus*, apresentando uma eficiência de 70,77%. O teste *in vivo* revelou que o extrato é também eficaz em ovinos, com redução significativa na contagem de OPG após 28 dias de experimento, 47 e 44% de redução nos grupos tratados com o extrato e apenas 13% com a ivermectina. Mesmo parasitados, os animais permaneceram clinicamente saudáveis e sem anemia. O extrato etanólico do caule de *Jatropha mollissima* pode representar uma alternativa ao controle da verminose ovina, pois retarda a resistência parasitária.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas medicinais, metabólitos secundários, nematódeos gastrintestinais.

² Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Rodovia Patos-Teixeira Km Zero, Jatobá, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mails: medvetfabio@hotmail.com, ducamedeiros@hotmail.com, avelar.junior@hotmail.com, onaldo@cstr.ufcg.edu.br, wouflan@hotmail.com, athayde@cstr@hotmail.com;

*Autor para correspondência: a.raquel.ribeiro@hotmail.com

³ Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Veterinário, UFCG, Rodovia Patos-Teixeira Km Zero, Jatobá, Patos, PB 58700-970. E-mail: alriceliamv@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes constitui importante fonte de renda para a região nordeste (Nascimento et al. 2013). No entanto, problemas nutricionais, de manejo e sanitários limitam a produção, gerando perdas econômicas e diminuição da rentabilidade dos rebanhos (Lima et al. 2010).

A maior parcela de prejuízos para o setor produtivo deve-se às helmintoses gastrintestinais (Vieira et al. 2014). Em ovinos, o parasita mais frequente é o *Haemonchus contortus*, causando perda de peso, anemia e até mesmo a morte de animais mais susceptíveis (Fortes et al. 2013). O controle geralmente é feito empregando-se anti-helmínticos sintéticos, os quais administrados de maneira inadequada podem selecionar linhagens de parasitas resistentes (Santos et al. 2012), além poluir o meio ambiente e aumentar significativamente os custos de produção (Kunsa & Abebe 2009).

Diante os aspectos negativos causados por moléculas de ação anti-helmíntica, estudos estão sendo desenvolvidos como alternativa de controle parasitário (Oliveira et al. 2011), nesta direção pesquisas em etnoveterinária tem mostrado o uso de inúmeras plantas medicinais na prevenção e controle de doenças dos animais e com comprovada atividade anti-helmíntica (Barrabí-Puerta & Arece-García 2013). Outro aspecto importante no uso de plantas é que além de possuírem compostos bioativos com propriedades medicinais, apresentam baixo custo (Sousa et al. 2013).

Plantas tidas como medicinais tem sido investigadas quanto às suas propriedades (Hassum et al. 2013), dentre elas a espécie *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill., popularmente conhecida como Pinhão-bravo, pertence à família Euphorbiaceae e é endêmica da Caatinga (Queiroz et al. 2013), diversos trabalhos tem demonstrado que esta espécie apresenta efeito antibacteriano (Rocha & Dantas 2009), hipotensor e estimulante dos músculos lisos do intestino e do útero (Leal & Agra 2005) e antioxidante (Melo et al. 2010).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito anti-helmíntico de *Jatropha mollissima* através de experimento *in vitro* e *in vivo* sobre o nematódeo *Haemonchus contortus* e seu efeito sobre o hematócrito de ovinos experimentalmente infectados em região de caatinga.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico

Os procedimentos de coleta e herborização do material vegetal foram realizados baseando-se nas metodologias de Cartaxo et al. (2010). A planta foi coletada na microrregião dos Inhamuns (Tauá-Ceará), (040°18'05,4" W; 06°01'03,6" S), identificada e depositada no Herbário Carirense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri-URCA, com exsiccata nº6675.

Obtenção do extrato orgânico

Para confecção do extrato etanólico, utilizou-se o caule de *J. mollissima*, sendo empregada a metodologia descrita por Matos (2000). Utilizou-se etanol 96% como solvente orgânico e após 96h de extração a frio, foram realizadas filtrações simples e os extratos mantidos à temperatura ambiente (30±2°C) para evaporação total do solvente e obtenção do extrato bruto.

Experimento *in vitro*

Toxicidade do extrato botânico de *Jatropha mollissima* sobre *Artemia salina*. Para análise da evolução da toxicidade do extrato, foi utilizada a metodologia descrita por Araújo et al. (2010), com o extrato do caule da *J. mollissima* dissolvido em solução de dimetil sulfoxido (DMSO) a 1% nas concentrações 100, 500 e 1000µg/mL.

Os valores obtidos com a média do número de náuplios mortos foram submetidos a análise estatística, em que a concentração letal foi estimada em 50% (CL50) do larvas através do método de Análise de Probit, de acordo com o teste de Spearman-Karber com intervalos de confiança de 95%, usando o software TRIMMED (versão 1.5).

Ação biológica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* sobre ovos e larvas de *Haemonchus contortus*. Para testar a ação ovicida e larvívica, foi realizado coprocultura utilizando a metodologia adaptada de Robert O'Sullivan (1950). Foi adicionado 2,5ml de extrato etanólico de *J. mollissima* na concentração de 660,80 µg/ml à culturas fecais mono específicas de *Haemonchus contortus*, contendo 6.500 ovos. Para o grupo controle o extrato foi substituído por água destilada, todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após sete dias, em temperatura ambiente, procedeu-se a recuperação e contagem das larvas de terceiro estágio (L3) em microscópio óptico.

Para avaliação da eficiência do extrato sobre ovos e larvas nos diversos tratamentos, foi utilizada a fórmula adaptada descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007):

$$\text{ET: } \frac{\text{L3 inicial} - \text{L3 do grupo tratado}}{\text{L3 inicial}}$$

Onde:

L3 inicial corresponde à estimativa do número de larvas em cada coprocultura

L3 do grupo tratado corresponde à quantidade de larvas recuperadas após 8 dias de incubação com os diferentes tratamentos.

Experimento *in vivo*

Local da Pesquisa. O experimento foi conduzido no Núcleo de Pesquisa para o Tropic Semiárido – NUPEÁRIDO, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da UFCG - Patos. Que está localizado no semiárido paraibano, com clima predominante seco e temperatura média anual de 30,6° (28,7° e máxima de 32,5°).

Período de adaptação. Trinta dias antes do início do experimento, os animais foram estabulados em baias individuais, com piso ripado suspensos, água e alimento foram oferecidos *ad libitum*, vermifugados com ivermectina 1% injetável e closantel 10% via oral até a negatização do OPG. Foi administrado, em três dias consecutivos, por via oral, três mil de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. Vinte um dias após a administração da última dosagem de larvas infectantes, foram realizadas contagens de ovos e os animais com OPG acima de 1000 foram selecionados para o experimento.

Delineamento experimental. Foram utilizados 20 ovinos sem padrão de raça definido (SPRD), com idade média de 12 meses, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e cinco repetições por tratamento (Quadro 1).

Análise parasitológica. Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 e encaminhadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDPAD), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), para contagem de ovos (Ueno & Gonçalves 1998) e coprocultura (Roberts & O'Sullivan 1950).

Hematócrito. Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular de cada animal nos dias 0, 14 e 28 do período experimental e acondicionadas em tubos a vácuo contendo EDTA (etilenodiamino-tetracético-di-sódico) como anticoagulante. Após coletadas, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, para verificação do Hematócrito (Ht) (Jain, 1993).

Análise estatística. Os valores de OPG foram analisados após a transformação logarítmica em $\log(x + 1)$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via e teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o software BIOESTAT 5.0 (AYRES et al., 2007). Para determinação da eficiência do extrato etanólico da *J. mollissima*, foi utilizado o teste de redução de ovos por grama de fezes (RCOF), descrita por Coles et al. (1992):

$$\text{RCOF} = [1 - (\text{OPGi} / \text{OPGf})] \times 100$$

Em que:

OPGf = média do número de ovos por grama de fezes no final do tratamento;

OPGi = média do número de ovos por grama de fezes no início do tratamento.

As análises hematológicas foram avaliadas pelo ANOVA seguido do teste Tukey. Os resultados foram processados no programa estatístico SAS (versão 9.1) e o nível de significância foi 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento *in vitro*

O teste de toxicidade revelou que o extrato de *Jatropha mollissima* é tóxico mesmo em baixas concentrações, apresentando CL50 igual a 660, 80µg/ml (Quadro 2). Resultado que comprova a ação bioativa desse extrato, de acordo com a classificação descrita por Mayer (1982), que considera tóxicos extratos que apresentam CL50 inferior a 1000µg/ml. Rajeh et al. (2012) verificaram o efeito tóxico do extrato do caule de *Euphorbia hirta*, também do gênero Euphorbiaceae, nas concentrações de 0,07 a 100mg/ml, obtendo como resultado, a CL50 1,589 mg/ml. Quando comparados com resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se a *J. mollissima* foi mais eficiente, provavelmente porque os valores dos princípios bioativos são maiores.

A concentração letal para 50% (CL50) é um parâmetro utilizado em testes para a detecção de substâncias bioativas e os resultados de seu estudo relacionam-se a efeito anti-helmíntico (Amarante et al. 2011). Dessa forma, no presente estudo utilizou-se como parâmetro inicial a CL50 dos náuplios de *Artemia salina*, sobre o nematódeo *Haemonchus contortus* de ovinos.

Na análise das culturas fecais, observa-se que nas coproculturas em que foi adicionado o extrato etanólico de *J. mollissima*, houve redução estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na eclodibilidade, quando comparada com a coprocultura controle (Quadro 3). Quanto à recuperação das larvas de terceiro estágio, as coproculturas que receberam o extrato, tiveram uma eficiência de 70,77% (1900) e no grupo controle a eficiência foi de apenas 10,4% (5.824), sugerindo que o caule do pinhão-bravo pode ter um efeito anti-helmíntico em animais.

Monteiro et al. (2011), obtiveram resultados semelhantes, ao testar o efeito *in vitro* do extrato etanólico de *Jatropha curcas*, e observaram redução de 99,8% na eclodibilidade com o extrato na concentração 50 mg/mL, enquanto que no presente estudo foi de 89,6% a uma concentração inferior (660,80 µg/ml). O maior percentual observado no trabalho citado, pode ter ocorrido devido ter sido utilizada uma maior contração do extrato ou ainda devido à variação na intensidade de metabólitos secundários (Sabandar et al. 2013).

Eficácia do experimento *in vivo*

Na avaliação do efeito do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* sobre os percentuais de redução da carga parasitária *in vivo*, observou-se redução de 47,1 e 43,7% na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) dos grupos tratados com o extrato nas concentrações 660,80 µg/ml e 1321,6 µg/ml, respectivamente, enquanto que no controle com ivermectina 1%, a redução foi de 40,6% (Quadro 4). O grupo de animais tratados com a concentração de 660,80 µg/ml apresentou melhores resultados.

Nos grupos dos animais tratados com o extrato e ivermectina, observou-se que os valores de OPG decresceram significativamente ($p > 0,05$) ao longo do experimento, o que não foi observado no controle negativo. O baixo percentual observado no grupo de animais tratados com ivermectina pode ter ocorrido devido à resistência parasitária (Almeida et al. 2010), onde o fármaco que é constantemente empregado, seleciona linhagens de helmintos resistentes. Segundo Barrère et al. (2013), a resistência representa um grande problema na criação de pequenos ruminantes em todo o mundo. No Nordeste brasileiro, Santos et al. (2014) também observaram este fenômeno em *H. contortus*. Nesse sentido, pesquisas têm buscado alternativas para o controle parasitário (Ribeiro et al. 2013).

Na literatura consultada, não há relatos de pesquisas semelhantes às do presente trabalho, com a espécie *J. mollissima*. Porém, estudos apontam a eficácia anti-helmíntica de plantas da mesma família. No Brasil, Carvalho et al. (2012), constataram a eficácia *in vitro* de *Hura crepitans* na inibição do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* em ovinos e Lone et al. (2012), *in vivo* com a *Euphorbia helioscopia*.

Quanto à avaliação do hematócrito (Ht) (Quadro 5), observou-se que os valores encontrados estão dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie, 27-45% (Byers & Kramer 2010), nos grupos submetidos aos tratamentos com *J. mollissima*, ivermectina e o controle. Costa et al. (2011), avaliando ovinos tratados com closantel e ivermectina, também não observaram variação significativa no hematócrito após a aplicação dos tratamentos. Kaplan (2004), afirma que a infecção por *H. contortus* causa anemia aos animais devido à ação espoliativa do parasita adulto, ingerindo até 250 mL de sangue por dia (Urquhart, 1996). Os animais do presente estudo, mesmo parasitados, não apresentaram anemia, segundo Molento et al. (2004), animais com OPG acima de 1000 não apresentam sinais clínicos de anemia.

Isto pode ter ocorrido provavelmente devido capacidade de recuperação do VG dos animais (Madureira et al., 2013). De acordo com Delfino et al. (2012) no início do parasitismo, órgãos eritropoiéticos como a medula óssea, dos ossos longos, são ativados e os valores sanguíneos retornam à sua normalidade.

Verificou-se queda no Ht em todos os grupos ao longo do experimento, embora estatisticamente não significativa. Estes achados são semelhantes ao encontrados por Kawano et al. (2001), que constatou diminuição gradual nos valores hematológicos de ovinos naturalmente infectados submetidos a tratamento com doramectina. Podendo ser explicado pela habituação dos animais ao manejo na coleta de material e diminuição da excitabilidade (Stear et al. 1995) ou pela espoliação sanguínea e hemorragia nos pontos de fixação dos vermes, à resposta hematopoiética lenta ao esgotamento das reservas de ferro e ao fator crescimento (Kawano et al. 2001).

CONCLUSÕES

- O extrato etanólico do caule de *Jatropha mollissima* na concentração de 660µg/mL é tóxico para náuplios de *Artemia salina*;
- A concentração de 660µg/mL do extrato etanólico do caule de *J. mollissima* é eficaz sobre ovos e larvas e adulto do nematódeo *Haemonchus contortus*;
- Os animais monoinfectados por *H. contortus* não apresentaram anemia;
- A planta estudada demonstra ter potencial fitoterápico para fins de controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos.

REFERÊNCIAS

- Almeida F.A., Garcia K.C.O.D., Torgerson P.R. & Amarante A.F.T. 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol. Int.* 59:622-625.
- Amarante C.B., Müller A.H., Póvoa M.M. & Dolabela M.F. 2011. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amaz.* 41:431-434.
- Araújo M.G.F., Cunha W.R. & Veneziani R.C.S. 2010. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. (Solanaceae). *Revta Ciênc. Farm. Básica Apl.* 31:205-209.
- Ayres M., Ayres Júnior M., Ayres D.L. & Santos A.A. 2007. BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.
- Barrabí-Puerta M. & Arece-García J. 2013. Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvário. *Revta Salud Anim.* 35:103-108.
- Barrère V., Keller K., Samson-Himmelstjerna G.V. & Prichard R.K. 2013. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. *Parasitol. Int.* 62: 464-470.
- Byers S.R. & Kramer J.W. 2010. Normal hematology of sheep and goats, 836-842. In: Weiss D.J. & Wardrop K.J. (Ed). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Braga R.R., Silva R.A. & Vieira L.S. 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet. Parasitol.* 148: 288-294.
- Cartaxo S.L., Souza M.M.A. & Albuquerque U.P. 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 131:326-342.
- Carvalho C.O., Chagas A.C.S., Cotinguiba F., Furlan M., Brito L.G.I, Chaves F.C.M., Stephan M.P., Bizzo H.R. & Amarante A.F.T. 2012. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Vet. Parasitol.* 183:260-268.
- 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 (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44:35-44.
- Costa K.M.F.M., Ahid S.M.M., Vieira L.S., Vale A.M. & Soto-Blanco B. 2011. Efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos infectados com nematódeos. *Pesq. Vet. Bras.* 31:1075-1082.
- Delfino L.J.B., Souza B.B., DA R.M.M. & Silva, W.W. 2012. Efeito do estresse calórico sobre o eritrograma de ruminantes. *Revta ACSA* 8:1-7.
- Fortes F.S., Kloster F.S., Schafer A.S., Bier D., Buzatti A., Yoshitani U.Y. & Molento M.B. 2013. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. *Pesq. Vet. Bras.* 33:183-187.
- Hassum I.C., Venturi C.R., Gosmann G. & Deiro A.M.G. 2013. Ação dos extratos de quatro plantas sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos. *Revta Cubana Plant. Med.* 18:278-287.
- Jain N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea and Febiger, Philadelphia. 417p.
- Kaplan R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20:477-481.
- Kawano E.L., Yamamura M.H. & Ribeiro E.L.A. 2001. Efeitos do tratamento com anti-helmíntico em cordeiros naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais sobre os parâmetros hematológicos, ganho de peso e qualidade da carcaça. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 29:113-121.

- Kunsa B. & Abebe G. 2009. Multi antielmintic resistance of goat farm in Hawassa (South Ethiopia). *Trop. Anim. Health Prod.* 41:655-662.
- Leal C.K.A. & Agra M.F. 2005. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). *Acta Farm. Bonaer.* 24:5-13.
- Lima W.C., Athayde A.C.R., Medeiros G.R., Lima D.A.S.D., Borburema J.B., Santos E.M., Vilela V.L.R. & Azevedo S.S. 2010. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 30:1003-1009.
- Lone B.A., Chishti M.Z., Bhat F.A., Tak H. & Bandha S.A. 2012. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of *Euphorbia helioscopia* L. *Vet. Parasitol.* 189:317-321.
- Madureira K.M., Gomes V., Barcelos B., Zani B.H., Shecaira C.L., Baccili C.C. & Benesi F.J. 2013. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de ovinos da raça Dorper. *Semina, Ciênc. Agrárias* 34:811-816.
- Matos F.J.A. 2000. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 141p.
- Melo J.G., Araújo T.A.S., Castro V.T.N.A., Cabral D.L.V., Rodrigues M.D., Nascimento S.C., Amorim E.L.C. & Albuquerque U.P. 2010. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules* 15: 8534-8542.
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnan J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E. & McLaughlin J. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plant Res.* 45:31-34.
- Molento M.B. 2004. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 13:82-87.
- Monteiro M.V.B., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Machado L.K.A., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Campello C.C., Ribeiro W.L.C. & Mesquita M.A. 2011. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 182:259-263.
- Nascimento M.C.O., Souza B.B., Silva F.V. & Melo T.S. 2013. Armazenamento de forragem para caprinos e ovinos no semiárido do nordeste. *Agropec. Cient. Semiárido* 9:20-27.
- Oliveira L.M.B., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Camurça-Vasconcelos A.L.F. & Macedo I.T.F. 2011. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Ciência Rural* 41:1967-1974.
- Queiroz M.F., Fernandes P.D., Dantas Neto J., Arriel N.H.C., Francisco J.L., Marinho F.J.L. & Leite S.F. 2013. Crescimento e fenologia de espécies de *Jatropha* durante a estação chuvosa. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* 17:405-411.
- Rajeh M.A., Kwan Y.P., Zakaria Z., Latha L.Y., Jothy S.L. & Sasidharan S. 2012. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L. extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacogn. Res.* 4:170-177.
- Ribeiro W.L.C., Macedo I.T.F., Santos J.M.L., Oliveira E.F., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Paula H.C.B. & Bevilaqua C.M.L. 2013. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 135:24-29.
- Roberts F.H.S. & O'Sullivan J.P. 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 1:99-102.
- Rocha F.A.G. & Dantas L.I.S. 2009. Atividade antimicrobiana in vitro do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. *Holos* 4:3-11.
- Sabandar C.W., Ahmat N., Jaafar F.M. & Sahidin I. 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha species* (Euphorbiaceae). *Rev. Phytochem.* 85:7-29.
- Santos F.C.C., Vogel F.S.F. & Monteiro S.G. 2012. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. *Revta Bras. Agroecol.* 7:139-144.
- Santos J.M.L., Monteiro J.P., Ribeiro W.L.C., Macedo I.T.F., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Vieira L.S. & Bevilaqua C.M.L. 2014. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 199:160-164.
- Sousa R.G., Falcão H.S., Barbosa Filho J.M., Melo Diniz M.F.F. & Batista L.M. 2013. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. *Revta Bras. Plant. Med.* 15:287-292.
- Stear M.J., Bairden K., Duncan J.L. & Murray M. 1995. A comparison of the responses to repeated experimental infections with *Haemonchus contortus* among Scottish Blackface lambs. *Vet. Parasitol.* 60:69-81.
- Ueno H. & Gonçalves P.C. 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4th ed. Japan International Cooperation Agency (JICA), Tokyo, Japan. 143p.
- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M. & Jennings F.W. 1998. Parasitologia Veterinária. 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 273p.

Vieira V.D., Feitosa T.F., Vilela V.L.R., Azevedo S.S., Almeida Neto J.L., Morais D.F., Ribeiro A.R.C. & Athayde A.C.R. 2014. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:355-361.

Quadro 1. Delineamento do experimento *in vivo* com ovinos SRD submetidos a tratamentos com *Jatropha mollissima* no semiárido paraibano

Grupo	Animais	Tratamento	Concentração	Dosagem	Aplicação	
					Via	Dia
G1	5	Ivermectina	1%	1ml/Kg/PV	Parenteral	Zero
G2	5	Água	0	10 ml	Oral	0, 7, 14, 21 e 28
G3	5	Extrato	660,80 µg/ml	10 ml	Oral	0, 7, 14, 21 e 28
G4	5	Extrato	1321,6 µg/ml	10 ml	Oral	0, 7, 14, 21 e 28

Quadro 2. Valores da CL50 calculados para o extrato do caule de *Jatropha mollissima* e intervalo de confiança de 95%

<i>Jatropha mollissima</i>	CL50 (µg/mL)	Intervalo de Confiança
Caule	660,80	598,57-729,51

CL50 = Concentração letal 50% dos náuplios de *Artemia salina*.

Quadro 3. Eficiência do extrato etanólico do caule de *Jatropha mollissima* sobre *Haemonchus contortus* de ovinos

Tratamento	Concentração (µg/ml)	Média de L3	Eclodibilidade (%)	Eficiência (%)
Extrato	660,80	1900±430	29,23	70,77
Controle	Água destilada	5824±410	89,6	10,4

Quadro 4. Média aritmética re-transformada [(log (x+1))], desvio padrão e percentual de redução do OPG de ovinos artificialmente infectados com *Haemonchus contortus*, submetidos a diversos tratamentos com extrato etanólico de *Jatropha mollissima*

Tratamentos	OPG Dia zero	OPG Dia 07	OPG Dia 14	OPG Dia 21	OPG Dia 28	RCOF (%)
G1	1500 ^a ±320	1433 ^a ±350	1180 ^a ±420	1280 ^a ±250	890 ^b ±410	40,6 ¹
G2	1460 ^a ±250	1550 ^a ±300	1900 ^a ±300	1620 ^a ±300	1350 ^a ±200	7,5 ²
G3	1400 ^a ±300	920 ^b ±240	860 ^b ±200	640 ^b ±360	740 ^b ±300	47,1 ¹
G4	1600 ^a ±280	1200 ^a ±300	1160 ^b ±300	1080 ^b ±260	900 ^b ±200	43,7 ¹

Valores seguidos por letras diferentes em linhas diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste Tukey para amostras independentes, valores seguidos de número diferentes nas colunas diferem estatisticamente ($p>0,05$). G1 = Controle positivo, Ivermectina 1%; G2 = Controle negativo, água. G3 = Pinhão 660,80 µg/ml; G4 = Pinhão 1321,6µg/ml.

Quadro 5. Valores percentuais médios do Hematócrito (Ht) de ovinos artificialmente infectados com *Haemonchus contortus* nos diversos tratamentos

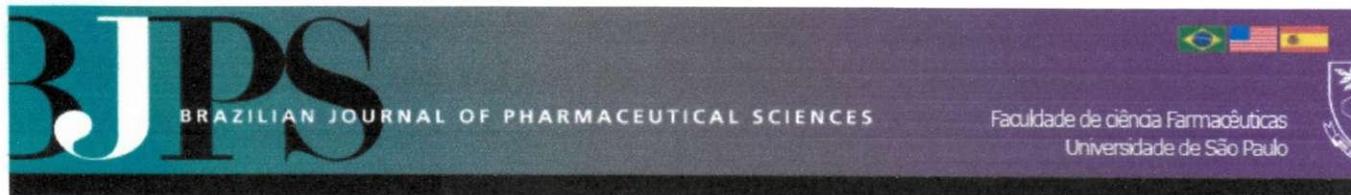
Dia	G1	G2	G3	G4
0	33,20±2,39 ^a	34,60±1,95 ^a	35,80±2,39 ^a	34,40±3,58 ^a
14	34,80 ±2,59 ^a	35,40±2,30 ^a	32,00±2,00 ^a	30,60±4,16 ^a
28	34,20±1,92 ^a	34,20±1,30 ^a	32,60±3,04 ^a	29,80±5,26 ^a

Valores seguidos por letras diferentes em linhas diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey para amostras independentes. G1 = Controle positivo, Ivermectina 1%; G2 = Controle negativo, água. G3 = Pinhão 660,80 µg/ml; G4 = Pinhão 1321,6µg/ml.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato etanólico de *Jatropha mollissima* apresenta diversos metabólitos secundários com potencial farmacológico. Sobre o microcústáceo *Artemia salina* o extrato mostrou-se tóxico, mesmo em baixas concentrações. Nos testes sobre ovos, larvas e adulto do nematódeo *Haemonchus contortus*, a concentração letal obtida no teste sobre *A. salina* foi eficaz, nenhum animal utilizado no experimento apresentou anemia. Portanto, a espécie *J. mollissima* representa promissora fonte de princípios ativos com ação medicinal.

ANEXOS



- [ivo](#)
- [ico](#)
- [ios de Avaliação](#)
- [Editorial](#)
- [ções aos Autores](#)
- [s de Indexação](#)
- [ações Técnicas](#)
- [turas](#)
- [onosco](#)
- [de artigos](#)
- [ssão de artigos](#)
-

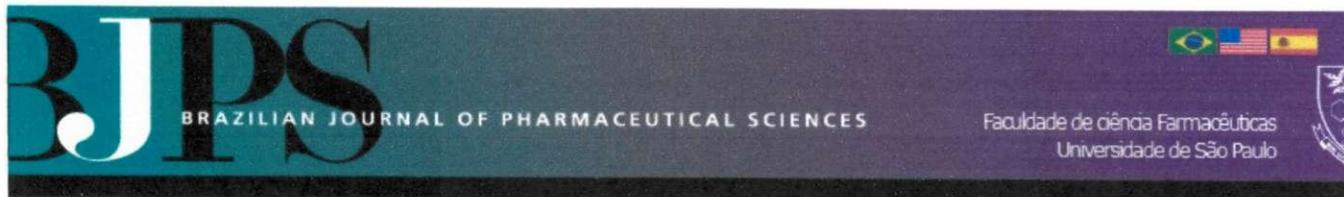
Submissão de artigos

Prezado autor,

Favor enviar o artigo para o email da revista: bjps@usp.br



Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Todos os direitos reservados.



ivo
rico
os de Avaliação
Editorial
ções aos Autores
s de Indexação
nações Técnicas
aturas
onosco
i de artigos
issão de artigos
r

Instruções aos Autores

Escopo e Política

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences tem por finalidade publicar os seguintes tipos de publicação: **Artigos originais** relacionados com as áreas de conhecimento das Ciências Farmacêuticas; **Trabalhos de atualização ou de revisão**, que serão incluídos quando solicitados a especialistas pela Editoria Científica ou Editoria Associada ou quando submetidos em forma de Abstract para avaliação quanto ao interesse. Ressalta-se a necessidade de se incluir visão crítica dos autores, inserindo os seus trabalhos no tema e avaliando-os em relação ao estado de arte no País; **Notas Prévias** relativas a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida. Nesse caso, o limite é de 2.000 palavras, excluindo-se, tabelas, figuras e referências. Podem-se incluir, no máximo, uma figura, uma tabela e 10 referências; **Resenhas** elaboradas por especialistas segundo sugestão da Editoria Científica ou Editoria Associada. **Suplementos temáticos** e aqueles relativos a eventos científicos podem ser publicados mediante aprovação prévia da Editoria Científica e/ou Editoria Associada.

Trabalhos relacionados a pesquisas com humanos ou animais devem, obrigatoriamente, incluir o parecer de aprovação dos respectivos Comitês de Ética.

Os manuscritos que não atendam às instruções não serão avaliados. Os trabalhos elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros devem ser apresentados em língua inglesa, ser originais e inéditos e destinar-se, exclusivamente, ao Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. Os manuscritos submetidos ao periódico que atenderem as "Instruções aos autores" são encaminhados para avaliação por revisores especialistas no tema abordado. Após a revisão, cujo caráter anônimo é mantido durante todo o processo, os manuscritos são enviados à Editoria Associada e ao Editor Científico, que decidirão sobre a publicação. Manuscritos recusados, passíveis de reformulação, poderão ser re-submetidos após reestruturação, como novo trabalho, iniciando outro processo de avaliação. Manuscritos condicionados à reestruturação serão reavaliados pelos revisores. Manuscritos enviados aos autores para revisão devem retornar à Editoria dentro de, no máximo, dois meses, caso contrário terão o processo encerrado. Todas as revisões dos manuscritos deverão ser acompanhadas de carta especificando as alterações efetuadas no documento original. Essas mudanças devem, também, ser indicadas diretamente no manuscrito. Manuscritos aceitos e publicados são de propriedade da Revista, ficando os direitos autorais a ela reservados. A declaração de responsabilidade e transferência dos direitos autorais será encaminhada juntamente com o manuscrito, devendo retornar no prazo estipulado.

Forma de apresentação de manuscritos:

• Estrutura

Cabeçalho: constituído por: Título do trabalho, que deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho; Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar na margem esquerda do texto e logo após a filiação.

Resumo: deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras.

Unitermos: devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica. Observar o limite máximo de 6(seis) unitermos.

Resumo em português: deve ser apresentado junto ao resumo em inglês e ser antecedido do título do artigo em português. O conteúdo deve e acompanhar o resumo em inglês.

Unitermos em português: devem acompanhar os unitermos em inglês e estar abaixo do Resumo.

Introdução: deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, nos quais tais revisões tenham sido apresentadas.

Material e Métodos: a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos e em animais devem, obrigatoriamente, fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

Resultados e Discussão: deverão ser apresentados de forma concisa e em ordem lógica. Tabelas ou figuras, quando possível, devem substituir o texto, na apresentação dos dados. Sempre que pertinente, fornecer as faixas, desvios padrão e indicar as significâncias das diferenças entre os valores numéricos obtidos. A discussão deve se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, relacionar sua significância em relação a trabalhos anteriores da área. Especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos devem ser evitadas. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

Conclusões: quando pertinentes, devem ser fundamentadas no texto.



documentos. devem constar de parágrafo a parte, antecedendo as referências bibliográficas, e ser atíveis com as exigências de cortesia e divulgação.

Referências bibliográficas: devem ser organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de as Técnicas - ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos itores. **A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Para iplos, consultar o site www.bcg.usp.br.**

1 Apresentação dos originais:

abalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço 1,5), utilizando o ama Word for Windows. Os trabalhos, acompanhados de carta de encaminhamento assinada por todos tores, devem ser enviados, apenas por via eletrônica.

1 Informações Adicionais:

Citação bibliográfica: As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) (es), com apenas a inicial em maiúsculo, seguidas do ano de publicação. No caso de haver mais de três es, citar o primeiro e acrescentar a expressão et al. Caso haja mais de uma citação com mesmos autores smo ano de publicação, diferencia-las com letras minúsculas junto ao ano.

Figuras: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias) n ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias n ser, também, apresentados em arquivos separados e digitalizadas em formato TIF ou JPG com ção de 300 dpi. **Cada fascículo da BJPS reproduzirá, na capa, figura escolhida de um dos ilhos.** As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em smos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas apenas ulo ou na legenda, respectivamente. Legendas e títulos devem acompanhá-las nos arquivos separados, i como no texto.

Enclatura: pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de is nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez e parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvh.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvh.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvh.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto PV.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores.

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvh.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvh.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez.** A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, reconhecendo, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Modelo

Deve ser seguido, em todos os pormenores, para a submissão de trabalhos à revista
Pesquisa Veterinária Brasileira

Trabalho

Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina¹

Pedro M.O. Pedroso², Caroline A. Pescador², Paulo M. Bandarra², Djeison L. Raymundo², Mauro R. Borba², Flademir Wouters³, Pedro S. Bezerra Júnior³ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Pedroso P.M.O., Pescador C.A., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Borba M.R., Wouters F., Bezerra Jr P.S. & Driemeier D. 2009. [Standardization of immunohistochemistry technique for detection of rabies virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples from central nervous system of cattle.] Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

For standardization of the rabies immunohistochemistry technique, five samples of central nervous system (CNS) of cattle naturally infected with rabies virus were examined. One polyclonal antibody and two monoclonal antibodies were used. The following reagents were evaluated for antigen retrieval: XIV protease, proteinase K and citrate buffer (pH 6.0) boiling at 100°C during 15 minutes in *bain-marie*. Detection of rabic antigen was possible with the three antibodies tested. The polyclonal antibody was superior to the monoclonal antibodies, demonstrating good results with the three antigen retrieval protocols. The highest intensity staining was obtained with the citrate buffer and heat. The immunohistochemistry technique demonstrated the presence of viral antigens in the cytoplasm of neurons, in form of aggregates or with round or oval shape. The antigens were found as single or multiples inclusion bodies in the neurons. Immunohistochemistry is a fast method that can be used in routine procedures in cases where rabies is suspected, especially when the brain is submitted to the laboratory as formalin-fixed fragments or when samples could not be immediately shipped. The technique is also useful for retrospective studies.

INDEX TERMS: Diseases of cattle, infectious diseases, diseases of the central nervous system, rabies, immunohistochemistry standardization.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil.

(Observe que os endereços dos autores devem ser completos, para que eles possam receber o "Exemplar do Autor" de seu trabalho publicado)

RESUMO.- Para a padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foram utilizadas cinco amostras de SNC de bovinos infectados naturalmente com o vírus da raiva usando-se um anticorpo policlonal e dois monoclonais. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: protease XIV, proteinase K e tampão citrato pH 6,0 mantido a 100°C por 15 minutos. A detecção de antígeno rábico nas amostras foi possível com os três anticorpos utilizados. O anticorpo policlonal foi superior aos anticorpos monoclonais, demonstrando bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, obtendo uma maior intensidade de marcação quando utilizado o tampão citrato e calor. A técnica de imuno-histoquímica demonstrou a presença do antígeno viral no citoplasma de neurônios na forma de agregados de grânulos ou de forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios. A imuno-histoquímica é um método rápido, podendo ser usada na rotina em casos onde inicialmente há suspeita de raiva, especialmente em casos onde fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, onde as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente e para a realização de estudos retrospectivos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de bovinos, doenças infecciosas, doenças do sistema nervoso, raiva, padronização de imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

A raiva é causada por um vírus RNA, envelopado (Swanepoel 2004), da ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (Consales & Bolzan 2007) e é altamente neurotrópico (George 1993, Woldehiwet 2002). Embora todos os mamíferos sejam susceptíveis, canídeos e morcegos são considerados como os vetores mais eficientes da enfermidade (Woldehiwet 2002).

No Brasil, *Desmodus rotundus* é a principal espécie de morcego hematófago que transmite a raiva para bovinos, porém outras espécies (*Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*) podem ocasionalmente transmitir, a doença (Fernandes & Riet-Correa 2007). A raiva bovina ocorre em todo o Brasil e tem importância na maioria dos Estados, tanto pelo caráter de zoonose como por causar perdas econômicas na pecuária. Anualmente as perdas de bovinos por raiva são estimadas em aproximadamente 850.000 cabeças, que equivalem aproximadamente a 17 milhões de dólares (Lima et al. 2005). Em bovinos no Brasil, predomina a forma paralítica, caracterizada por paresia e paralisia ascendentes (Langohr et al. 2003). As lesões histológicas de raiva são geralmente limitadas ao sistema nervoso central (Jubb & Huxtable 1993, Jones et al. 2000), glânglios e nervos cranianos e espinhais (Swanepoel 2004) e caracterizam-se por meningoencefalomielite não-purulentas (Fernandes & Riet-Correa 2007) com ganglioneurite mononuclear (Swanepoel 2004).

O suporte laboratorial é imprescindível para o diagnóstico da doença e a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) em tecidos refrigerados ou congelados o teste padrão utilizado devido a sua rapidez e acurácia (Zimmer et al. 1990). Outro teste utilizado é a inoculação intracerebral em camundongos que apesar de ser mais específica, tem a desvantagem de ser demorada quando comparada a IFD (Germano et al. 1977).

A comparação entre métodos histoquímicos, de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em camundongos tem revelado maior concordância entre imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos, embora ocorram esporadicamente resultados falsos negativos ora em uma, ora em outra técnica (Côrtes et al. 1979).

O objetivo da padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foi estabelecer um protocolo padrão de diagnóstico para fragmentos de sistema nervoso central que chegam previamente fixados em formol 10% ao Setor de Patologia Veterinária

da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Contribuindo assim para o diagnóstico de doenças do SNC de bovinos, como parte do programa DXSNC de vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) coordenada pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras encefalopatias (PNCRH) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sistema nervoso central (SNC) de 2 bovinos registrados no arquivo do programa DXSNC do MAPA do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) e três amostras enviadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA) de necropsias de casos de bovinos infectados naturalmente com raiva, os quais obtiveram resultados positivos nos testes de imunofluorescência direta (IFD) e na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC).

Uma amostra do tronco cerebral de cada bovino necropsiado foi fixada em formol 10%, processada rotineiramente para exame histopatológico, incluída em parafina, cortada a 5µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina (HE) (Prophet et al. 1992). Dados sobre os históricos, quadro clínico dos animais afetados foram obtidos com o veterinário requisitante ou pela própria equipe do SPV.

Para a padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foram feitos cortes histológicos de 5µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath), secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60°C por 3-4 horas. Após os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 15 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em água destilada três vezes por dois minutos. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: protease XIV (Sigma Chemical Company, Poole, UK), proteinase K (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e tampão Citrato (2,1g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%). As lâminas tratadas com protease XIV a 0,005% em PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,4) foram incubadas em câmara úmida por 15 minutos em temperatura ambiente. Os cortes tratados com proteinase K foram preparados com 40µl (uma gota) da solução diluída em 2ml 0,05M Tris-HCL pH 7,5 por 1 minuto em câmara úmida e temperatura ambiente. As lâminas tratadas com tampão citrato 10mM (pH 6,0), foram colocadas em jarras de coloração de polipropileno durante 15 minutos em banho-maria em panela de uso comercial de aço inox com dimensões de 24x20x20cm (altura x largura x comprimento) com capacidade para dois litros previamente aquecido atingindo uma temperatura de 100°C. Logo após as lâminas foram esfriadas por 5 minutos em temperatura ambiente.

Para a diminuição das ligações inespecíficas ("background"), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico®) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos. Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário. Foram utilizadas as diluições de 1:500 e 1:1000 em PBS para cada um dos anticorpos testados. Foram avaliados dois anticorpos monoclonais anti-raiva (GeneTex GTX21002 e Bidesign C86307M) e um anticorpo policlonal (anti-rabies polyclonal Chemicon #5199) recomendado para imunofluorescência direta adaptado de Rech (2007). Os cortes testados com os anticorpos monoclonais foram incubados em câmara úmida por 12-14 horas ("overnight") a 4°C e os testados com o anticorpo policlonal foram incubados em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada e tratados com anticorpo secundário biotinalado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 20 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Logo após foram lavados em água destilada e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA) por mais 20 minutos cada em câmara úmida e temperatura ambiente, sendo lavados novamente em água destilada e submetidos à revelação com o cromógeno vermelho (VECTOR®NovaRED) por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, posteriormente lavadas em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduações de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). Em seguida as lâminas foram avaliadas em microscópio

óptico e classificadas de acordo com a intensidade de marcação em 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (acentuado). Foi inserido em cada imuno-histoquímica um controle de SNC de bovino previamente negativo nas provas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos.

RESULTADOS

Os bovinos deste estudo apresentaram um quadro clínico caracterizado por incoordenação, paresia e paralisia dos membros posteriores, decúbito e morte. Todas as cinco amostras analisadas caracterizaram-se na histologia por meningoencefalomielite não-supurativa, com presença de manguitos perivasculares, microgliose e presença de corpúsculos de inclusão viral intracitoplasmáticos em neurônios. O teste de imunofluorescência direta para raiva e inoculação intracerebral em camundongos foi positivo em todos os casos analisados e serviu de padrão para avaliação do método imuno-histoquímico.

A detecção de antígeno rábico nas amostras analisadas foi possível com os três anticorpos utilizados. Em geral, os resultados usando o anticorpo policlonal foram superiores aos anticorpos monoclonais. O anticorpo policlonal (Chemicon #5199) demonstrou bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, porém teve maior intensidade de marcação quando utilizado calor com solução de tampão citrato, obtendo-se grau de marcação acentuado nos casos testados (Fig.1). Podem-se identificar marcação no pericário, axônios (Fig.2) e algumas vezes em dendritos dos neurônios. Recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K obtiveram intensidade de marcação semelhantes, prevalecendo uma marcação moderada em ambos tratamentos enzimáticos. No Quadro 1 estão representados os graus de intensidade de marcação imuno-histoquímica com o anticorpo policlonal nos cinco casos analisados no presente estudo.

A digestão com protease XIV e proteinase K apresentou baixa intensidade de marcação com os anticorpos monoclonais. O anticorpo GeneTex apresentou marcação leve nas recuperações antigênicas com protease XIV e proteinase K e o anticorpo Biodesign obteve melhor marcação quando utilizado proteinase K, ambos na diluição de 1:500. A intensidade de marcação com o anticorpo GeneTex (GTX 21002) e Biodesign (C86307M) estão representados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Na recuperação antigênica com calor e tampão citrato os dois anticorpos monoclonais apresentaram ausência de marcação. Todos os casos que foram positivos na técnica de imuno-histoquímica demonstraram a presença do antígeno viral no citoplasma de neurônios na forma de agregados de grânulos (Fig.3) também na forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios (Fig.4).

Na determinação da diluição do anticorpo policlonal anti-raiva, foram obtidos resultados positivos nas diluições de 1:500 e 1:1000. Perda na qualidade da identificação do antígeno de raiva foi visualizado quando os anticorpos foram diluídos a 1:1500. O bloqueio das reações inespecíficas mostrou-se bastante eficaz quando os cortes foram incubados com leite em pó desnatado (Molico®) 5% diluídos em água destilada durante 15 minutos.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de raiva nas cinco amostras analisadas foi baseado no quadro clínico e nas lesões histopatológicas, sendo confirmados pelo teste de imunofluorescência direta para raiva e inoculação intracerebral em camundongo. A imuno-histoquímica se mostrou satisfatória para o diagnóstico de raiva a partir de fragmentos de sistema nervoso central destes casos. As cinco amostras de SNC utilizadas na padronização da técnica de imuno-histoquímica foram fixadas em formol 10% por um período que variou de 24 horas a uma semana. Trabalhos prévios sugerem que a fixação prolongada prejudica a detecção de antígenos virais (Ramos-Vara 2005).

Foi possível observar que o anticorpo policlonal empregado apresentou marcação mais intensa que os anticorpos monoclonais. Este resultado difere do que já foi relatado por outros autores (Hamir & Moser 1994, Hamir et al. 1995). Os anticorpos policlonais em geral apresentam alta afinidade e ampla reatividade (Ramos-Vara 2005). A utilização de anticorpos policlonais possibilita que uma maior quantidade de epítomos seja marcada, uma vez que há uma grande variação na fonte de animais utilizados na produção de antígenos (Van Maanen et al. 2004). Estes são geralmente empregados nos testes de rotina de imunofluorescência direta pra raiva (Terra 2007).

A recuperação antigênica utilizando-se solução tampão citrato previamente aquecida em banho-maria a 100°C possibilitou intensa marcação com o anticorpo policlonal. Diversos métodos de recuperação antigênica usando calor têm sido utilizados em IHQ como autoclave (Bankfalvi et al. 1994), panela de pressão (Norton et al. 1994, Miller & Estran 1995), forno de microondas (Gown et al. 1993, Cattoretti & Suurmeijer 1995, Imam et al. 1995) e banho-maria (Kawai et al. 1994), com o objetivo de quebrar as ligações cruzadas e expor os epítomos para o reconhecimento do anticorpo primário (Puchtler & Meloan 1985, Anthony et al. 1989, Shi et al. 1997). No presente estudo só foi usado banho-maria com a utilização de panela doméstica com água aquecida a 100°C, apresentando excelente resultado. Machado et al. (2004) obteve bons resultados com a técnica de imuno-histoquímica para raiva utilizando tampão citrato com calor, porém usando forno de microondas seguido de digestão enzimática com tripsina 0,1%.

As lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath) atraem eletrostaticamente as seções de tecido incluídas em parafina, aderindo-os melhor a lâmina e assim demonstraram ser melhores que lâminas preparadas com gelatina. Os cortes nestas últimas com frequência se descolavam quando aquecidos para recuperação antigênica em microondas e banho-maria.

A imuno-histoquímica é um método rápido, podendo ser usado na rotina em casos onde inicialmente há suspeita de raiva (Machado et al. 2004), especialmente em casos onde fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, impossibilitando a realização da imunofluorescência direta ou a inoculação intracerebral em camundongos. Por vezes a detecção de antígenos do vírus da raiva por imuno-histoquímica tem sido relatada mesmo em tecido nervoso em processo de autólise (Arslan et al. 2004). Estudos feitos com materiais deteriorados comprovaram que o primeiro exame que resulta em falso negativo é a detecção dos corpúsculos de Negri, seguido pela inoculação em camundongos e, por último, a imunofluorescência direta (Fernandes & Riet-Correa 2007). A imuno-histoquímica permite o uso de tecidos fixados em formol, o que possibilita o envio das amostras ao laboratório quando condições de refrigeração e transporte são inadequadas (Hamir & Moser 1994). A imuno-histoquímica pode ser também usada, particularmente em estudos retrospectivos, quando tecidos frescos ou congelados não podem ser avaliados ou quando as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente. (Arslan et al. 2004).

Os resultados do presente trabalho demonstram que a técnica de imuno-histoquímica para raiva utilizando-se anticorpo primário policlonal Chemicon #5199 apresentou excelentes resultados quando tratados com calor e solução de tampão citrato na recuperação antigênica. A utilização deste anticorpo policlonal associado à recuperação antigênica com tampão citrato em banho-maria demonstrou também vantagem econômica visto que os materiais empregados foram de menor custo quando comparados com outros protocolos. Proporcionou também economia de tempo, pois com os dois anticorpos monoclonais e recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K necessitou-se deixar "overnight", aumentando o tempo para finalizar o diagnóstico. A imuno-histoquímica é uma ferramenta importante de diagnóstico de rotina laboratorial, especialmente quando o SNC é submetido fixado em formol 10%, impossibilitando a realização de provas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em

camundongos, além de, solucionar casos de meningoencefalite não-específica sem a presença de corpúsculos de inclusão.

Agradecimentos.- À Professora Mary Suzan Varaschin, Universidade Federal de Lavras, pelas amostras de SNC de bovinos com raiva. Às técnicas de Laboratório, Ângela Belmonte de Souza e Marília de Oliveira Belmonte, pela confecção do material de estudo. Aos colegas do Setor de Patologia Veterinária, UFRGS, pela valiosa ajuda deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Anthony S., Leong Y. & Gilham P.N. 1989. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathol.* 21:266-268.
- Arslan A., Saglam Y.S. & Temur A. 2004. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. *Vet. Rec.* 155:550-552.
- Bankfalvi A., Navabi H., Bier B., Böcker W., Jasani B. & Schmid K.W. 1994. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J. Pathol.* 174:223-228.
- Cattoretto G. & Suurmeijer A.J.H. 1995. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: A review. *Adv. Anat. Pathol.* 2:2-9.
- Consales C.A. & Bolzan V.L. 2007. Rabies review: Immunopathology, clinical aspects and treatment. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 13:5-38.
- Côrtes V.A., Paim G.V. & Oliveira M.C.G. 1979. Diagnóstico da raiva canina. *Revta Saúde Pública* 13:353-356.
- Fernandes C.G. & Riet-Correa F. 2007. Raiva, p.184-198. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Eqüídeos*. Vol.1. Pallotti, Santa Maria. 719p.
- George L.W. 1993. Moléstias do sistema nervoso, p.901-1039. In: Smith B.P. (Ed.), *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. Vol.2. Manole, São Paulo. 1738p.
- Germano P.M.L., Miguel O. & Chamelet E.L.B. 1977. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. *Revta Fac. Med. Vet. Univ. São Paulo* 14:133-141.
- Gown A.M., Wever N. & Battifora H. 1993. Microwave-based antigenic unmasking. *Appl. Immunohistochem.* 1:256-266.
- Hamir A.N. & Moser G. 1994. Immunoperoxidase test for rabies: Utility as a diagnostic test. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:148-152.
- Hamir A.N., Moser G., Fu Z.F., Dietzschold B. & Rupprecht C.E. 1995. Immunohistochemical test for rabies: Identification of a diagnostically superior monoclonal antibody. *Vet. Rec.* 136:295-296.
- Imam S.A., Young L., Chaiwun B. & Taylor C.R. 1995. Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. *Anticancer Res.* 15:1153-1158.
- Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. 2000. *Patologia Veterinária*. 6ª ed. Manole, São Paulo. 1415p.
- Jubb K.V.F. & Huxtable C.R. 1993. The nervous system, p.267-437. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. Vol.1. 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Kawai A., Serizawa A. & Tsutsumi Y. 1994. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol. Int.* 44:759-764.
- Langohr I.M., Irigoyen L.F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2003. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural* 33:25-131.
- Lima E.F., Riet-Correa F., Castro R.S., Gomes A.A.B. & Lima F.S. 2005. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25:250-264.

- Machado G.F., Silva L.H.Q. & Nunes C.M. 2004. Detecção de antígenos do vírus da raiva em encéfalos de cão mantido em formol durante longo período. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 99:89-92.
- Miller R.T. & Estran C. 1995. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker: Suggestions for optimal use. *Appl. Immunohistochem.* 3:190-193.
- Norton A.J., Jordan S. & Yeomans P. 1994. Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J. Pathol.* 173:371-379.
- Puchtler H. & Meloan S.N. 1985. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochem.* 82:201-204.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology.* American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p.
- Ramos-Vara J.A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42:405-426.
- Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 228p.
- Shi S., Cote R.J. & Taylor C.R. 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J. Histochem. Cytochem.* 45:327-343.
- Swanepoel R. 2004. Rabies, p.1123-1182. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock.* Vol. 2. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town. 795p.
- Terra S.A. 2007. Características das encefalites em autópsias - aspectos epidemiológicos e morfológicos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba. 106p.
- Van Maanen C., Wouda W., Schares G., Von Blumröder D., Conraths F.J., Norton R., Williams D.J.L., Esteban-Redondo I., Innes E.A., Mattsson J.G., Björkman C., Fernández-García A., Ortega-Mora L.M., Müller N., Sager H. & Hemphill A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.* 126:351-364.
- Woldehiwet Z. 2002. Rabies: Recent developments. *Res. Vet. Sci.* 73:17-25.
- Zimmer K., Wiegand D., Manz D., Frost J.W., Reinacher M. & Frese K. 1990. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *Zentralbl. Veterinärmed B* 37:392-400.

Exemplos adicionais para apresentação de Referências

Livro de um ou mais autores, os quais são também os Editores

Summers B.A., Cummings J.F. & De Lahunta A. 1995. *Veterinary Neuropathology.* Mosby, St Louis, p.95-188.

Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. 2000. Plantas hepatotóxicas, p.80-110. In: *Ibid.* (Eds), *Plantas Tóxicas do Brasil.* Editora Helianthus, Rio de Janeiro.

Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis.* 4th ed. Prentice Hall, New Jersey. 663p.

[Observe que os títulos de capítulos são escritos em letras minúsculas e os títulos de livros, com as primeiras letras maiúsculas. Sempre mencionar as páginas consultadas; mas, quando se refere a múltiplos grupos de páginas num livro, somente colocar o número total de páginas]

Quando os autores de capítulos do livro não são os Editores

George L.W. 2002. Listeriosis, p.946-949. In: Smith B.P. (Ed.), *Large Animal Internal Medicine.* 3rd ed. Mosby, St Louis.

López A. 2007. Respiratory system, p.463-542. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.

Maxie M.G. & Robinson W.S.F. 2007. Cardiovascular system, p.1-105. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.3. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Dissertação de Mestrado (ou Tese, em caso de Doutorado)

Oliveira T.M.F.S. 2004. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, em soros de cães do Município de Jaboticabal, área não-endêmica para a doença. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 45p.

Resumo em Congresso

Bianchi S.P., Correa R.K.R., Villa-Lobos W.O.R., Ferreira R.R. & Machado M.L.S. 2008. Atendimentos realizados no ano de 2007 no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. Anais 35^o Conbravet, Gramado, RS, p.50. (Resumo)

Citação indireta

Dost G. 1980. Salinomycinein neues Polyäther-antibiotikum als Wachstumförderer bei Schweinen. Landwirtsch. Forsch. Sonderheft 37, Kongressband, Braunschweig. (Apud Ganter et al. 1995)

Ganter M., Kieckhofer H. M. & Kucza A. 1995. Intoxicação aguda por salinomicina/tiamulin em suínos. Hora Vet. 15(85):12-16.

[Observe que o trabalho onde o autor recolheu a informação secundária (Ganter et al. 1995), deve ser citado, como acima, por completo na lista das Referências]

Comunicação pessoal

Peixoto P.V. 2009. Comunicação pessoal (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

[Observe que, quando Peixoto não for um dos autores do trabalho, ele deve ser citado no próprio texto, como: "... (Peixoto 2009)" e referenciado, como acima, na lista das Referências; mas quando Peixoto for um dos autores do trabalho, o nome dele deve-ser colocado somente no texto, como: "... (Peixoto, comunicação pessoal)".]

Legendas das Figuras

Fig.1. Marcação positiva acentuada vermelha em neurônios da medula espinhal. Recuperação antigênica com calor e tampão citrato. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.20x.

Fig.2. Marcação positiva vermelha em corpúsculos de inclusão viral no pericário (seta maior) e axônio (seta menor) de célula de Purkinje do cerebelo. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000.

Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.

Fig. 3. Marcação acentuada de antígeno viral na forma de agregado de grânulos vermelhos em neurônios na medula espinhal. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.

Fig.4. Identificação positiva de corpúsculo de inclusão viral única em neurônio fortemente marcado na medula espinhal. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imuno-histoquímica pelo método biotina-estreptavidina-peroxidase e contra-corada com hematoxilina, obj.40x.

Os Quadros

(O termo Quadro é usado, pois é mais abrangente do que o termo Tabela)

Quadro 1. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo policlonal (Chemicon #5199) usando três recuperações antigênicas

Caso no.	Recuperação antigênica					
	Protease XIV		Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	2 ^a	2	2	2	3	3
2	2	2	2	2	3	1 ^b
3	2	2	2	2	3 ^c	3
4	1	1	1	1	3	3
5	3	1	2	1	3	3
6 ^d	0 ^e	0	0	0	0	0

^a Marcação moderada, ^b marcação leve, ^c marcação acentuada, ^d controle negativo, ^e ausência de marcação.

(Note que os títulos dos Quadros não têm ponto no final, como aliás nenhum título)

Quadro 2. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal GeneTex (GTX 21002) usando três recuperações antigênicas

Caso	Recuperação antigênica					
	Protease XIV		Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	1 ^a	1	1	1	0 ^b	0
2	1	1	1	1	0	0
3	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	0	0
6 ^c	0	0	0	0	0	0

^a Marcação leve, ^b ausência de marcação, ^c controle negativo.

Quadro 3. Resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal Biodesign (C86307M) usando três recuperações antigênicas

Caso no.	Recuperação antigênica					
	Protease XIV		Proteinase K		Calor (Tampão Citrato)	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1 ^b	1	1	1	1	0 ^a	0
2	0	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6 ^c	0	0	0	0	0	0

^a Ausência de marcação, ^b marcação leve, ^c controle negativo.

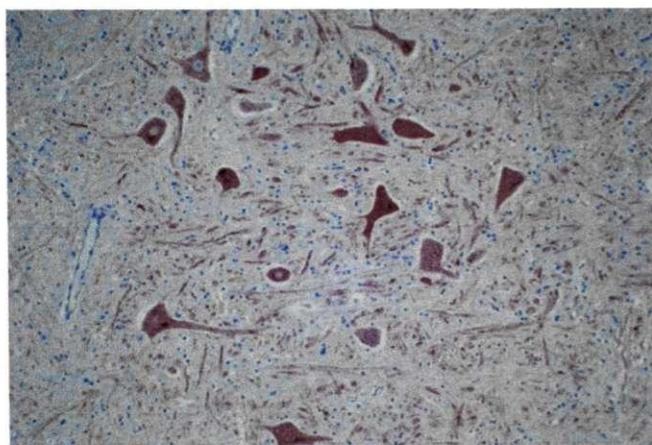


Figura 1

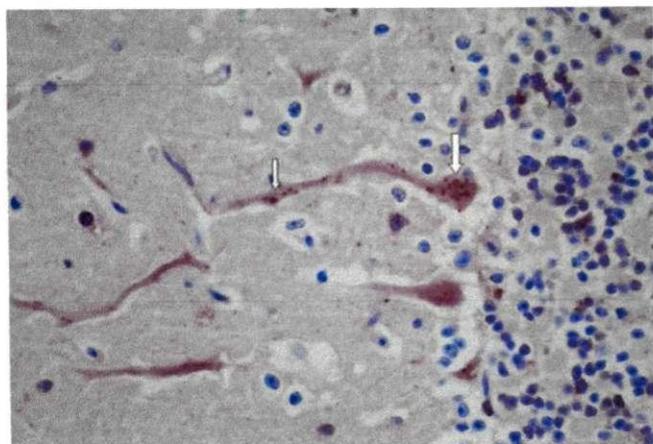


Figura 2

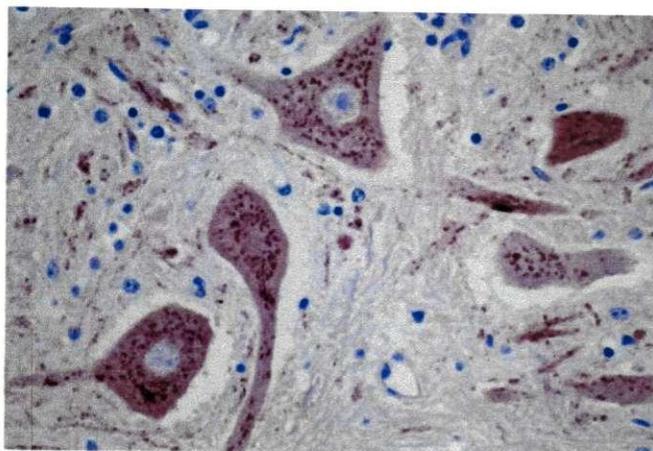


Figura 3

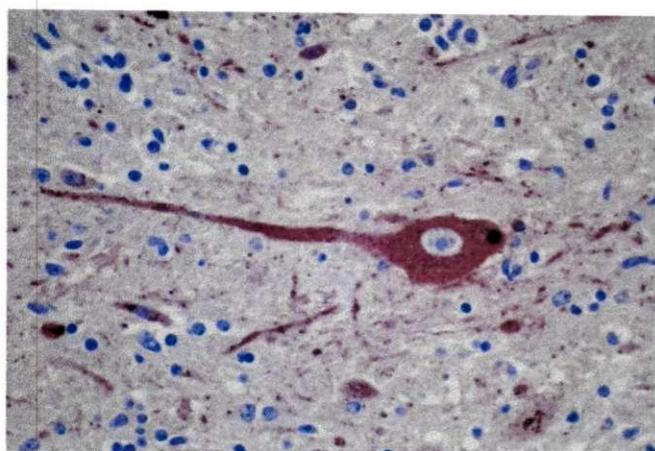


Figura 4

**BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL
SCIENCES**

RECIBO

Nº de Registro: 049/14

Acusamos o recebimento do trabalho para publicação no **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

Autores: RIBEIRO, A. R. C.; ANDRADE, F. D.; MEDEIROS, M. C.;
MORAIS, D. F.; SANTOS, A.; RODRIGUES, O. G.; MAGALHÃES, F. E.
A.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R.

Título do Artigo: "Phytochemical prospecting and toxicity determination of
Jatropha mollissima (Pohl) Baill against larvae of *Artemia salina* Leach"

São Paulo, 25 de Março de 2014.

Profa. Elizabeth Igne Ferreira
Editoria Científica

Jurgen Dobereiner (jurgen.dobereiner@pvb.com.br)

[Adicionar aos contatos](#)

25/03/2014

Para: 'Ana Raquel'

Prezada Dra. Ana Raquel,

]

O seu artigo foi registrado como **Trabalho 3704 LD**.

Atenciosamente,

Jürgen Döbereiner

Editor Pesq. Vet. Bras.

De: Ana Raquel [mailto:a.raquel.ribeiro@hotmail.com]

Enviada em: terça-feira, 25 de março de 2014 11:00

Para: jurgen.dobereiner@pvb.com.br

Assunto: manuscrito para publicação

Caro Editor,

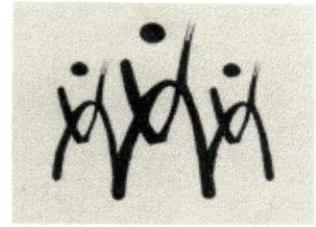
segue em anexo o artigo com os resultados da minha dissertação para possível publicação neste periódico.

Atenciosamente,

Ana Raquel Carneiro Ribeiro



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comissão de Ética no Uso de Animais
Av. Sta Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3057



A: Sr^a. Ana Célia R Athayde (Coordenadora)

Sr. Athayde;

Protocolo CEP nº 129-2013

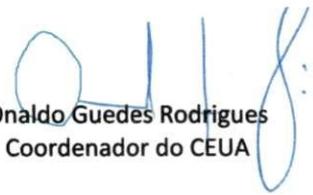
CERTIDÃO

ASSUNTO: *“Efeito in vitro e in vivo de Jatropha molissima (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sobre Haemonchus contortus de ovinos no semiárido paraibano.”*

Cientificamos a V.Sa. que seu projeto teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno desta comissão e foi aprovado por **Referendum**, em 19 de dezembro de 2013, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações no uso de animais para fins científicos e didáticos.

Secretaria da Comissão de Ética o Uso de Animais – CEUA da UFCG.

Patos, 19 de dezembro de 2013.


Onaldo Guedes Rodrigues
Coordenador do CEUA