

Teste de Inibição do Desembainhamento Larvar

Alessandro Pelegrine Minho¹
Rossana Leitzke Granada²
Robert Domingues³

INTRODUÇÃO

Durante as décadas de 1980 e 1990, observou-se o declínio da atividade de ovinocultura na região Sul do Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul (CALVETE; VILLWOCK, 2007). Recentemente, porém, essa atividade vem tomando um novo impulso nacional, particularmente em função da crescente demanda por carne ovina de qualidade. Esse novo nicho de mercado tem impulsionado a ovinocultura, levando à revitalização dessa atividade, tanto pelo aumento efetivo do rebanho quanto pelo incremento do número de propriedades rurais destinadas à atividade (COSTA, 2007).

A produção de ovinos, no entanto, tem sido insuficiente para suprir as demandas nacionais, uma vez que, em 2008, o Brasil importou 9% da carne ovina consumida, o que significa que a atividade tem ainda espaço para o crescimento (ANUALPEC,

2011). Além do potencial de mercado interno, o comércio internacional de produtos da ovinocaprinocultura atinge quase US\$ 11 bilhões por ano. O Brasil participa desse mercado principalmente como importador, apesar de possuir potencial para ser exportador, perdendo oportunidade real de desenvolver a sua cadeia produtiva e ocupar as imensas áreas de pasto subutilizadas do país (XEYLA, 2010).

Dentro do sistema de produção extensivo, um dos principais entraves encontrados na ovinocultura, limitando a criação dos animais ou a lucratividade da atividade, são as parasitoses, sendo os nematódeos gastrintestinais (NGI) os de maior relevância nas perdas econômicas. As perdas econômicas oriundas de doenças parasitárias são agravadas pelo estabelecimento do fenômeno de multirresistência dos parasitos às drogas anti-helmínticas. Devido a esse fenômeno, os NGI que anteriormente morriam

¹Médico Veterinário, D.Sc. em Ciências, Pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, alessandro.minho@embrapa.br.

²Química, B.Sc., Técnico da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, rossana.granada@embrapa.br.

³Biólogo, M.Sc. em Genética e Melhoramento, Analista da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, robert.domingues@embrapa.br.

em contato com o fármaco continuam a se reproduzir e a debilitar o animal, acarretando perdas por espoliação, anemia, perda de apetite, desempenho zootécnico inadequado, morte de cordeiros, gastos com compra de vermífugos em grande quantidade, serviços veterinários, aumento da demanda de mão de obra e excesso de manejo dos animais.

Os NGI de pequenos ruminantes são responsáveis por significativa redução na produtividade de ovinos e caprinos e aumento nos custos de produção, impactando e até inviabilizando a criação de ovinos em diversas regiões do mundo. Dentre os NGI destacam-se *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides* spp., *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum*. O helminto mais importante na criação de ovinos o Brasil é o *H. contortus*, por sua prevalência no campo, patogenicidade aos animais, potencial biótico (número de ovos eliminados por fêmea do parasito) e desenvolvimento acelerado de resistência aos produtos anti-helmínticos disponíveis no mercado.

Importância da bainha nos nematoides gastrintestinais

O ciclo evolutivo dos nematoides trichostrongilídeos (Família Trichostrongylidae) é semelhante e envolve uma fase de vida livre no ambiente, e outra parasitária no hospedeiro (ruminante). A fase de vida livre tem início com a eliminação dos ovos no ambiente juntamente com as fezes dos animais. No ambiente, a larva se desenvolve dentro do ovo e é liberada após a eclosão. A mórula (embrião dentro do ovo) se desenvolve até o estágio L₁. A larva L₁ eclode entre um e dois dias. A L₁ alimenta-se de bactérias e passa pela sua primeira muda (L₁ para L₂). Ambas L₁ e L₂ permanecem nas fezes e continuam sua ingestão de bactérias. Na segunda muda, a cutícula do segundo estágio é retida como uma bainha protetora ao redor da L₃, sendo eliminada apenas após ingestão da larva por um hospedeiro (Figura 1). No prazo de cinco a sete dias, a L₃ pode migrar para fora da massa fecal e penetrar em gotículas de água existentes na pastagem. A infecção ocorre quando essas larvas são ingeridas por ruminantes. A fase de vida parasitária tem início com a ingestão da L₃, a qual se desenvolve até L₄ e L₅ (adulto imaturo). Essa fase completa-se com a presença do parasito adulto no trato digestório do hospedeiro. A reprodução desses parasitas dá-se de

forma sexuada com eliminação de ovos nas fezes do hospedeiro e início de novo ciclo.

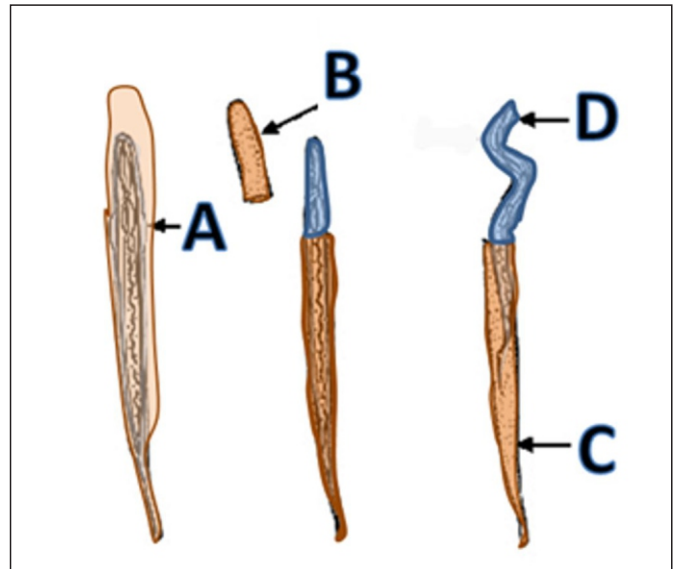


Figura 1. Esquema demonstrando a ativação de enzimas, incluindo a leucina aminopeptidase, as quais são liberadas para o ducto excretor da larva e passam para o espaço entre as duas cutículas. A ação enzimática enfraquece a cutícula (A). A quebra da cutícula na extremidade anterior da larva permite que esta região se destaque como uma tampa (B). A larva infectante ou L₃ (C) se contorce, deixando a bainha (D) para trás, tornando-se infectante no trato digestório do animal. Adaptado de Johnstone (1998).

Para um melhor entendimento da importância do teste de desembainhamento larvar, a fase de vida livre dos parasitos deve ser analisada mais detalhadamente, assim como o início do estabelecimento da infecção pelos NGI no hospedeiro, em especial, o *H. contortus*. A bainha de origem glicoproteica (camada cuticular mantida na transição de L₂ para a fase L₃) protege a L₃ de condições ambientais adversas (calor e dessecação); entretanto, também impede sua alimentação, limitando seu período de sobrevivência à quantidade de energia armazenada durante os primeiros dias de vida. Após a ingestão da L₃, um estímulo do hospedeiro é necessário para que se reinicie o desenvolvimento do parasito. Esse estímulo provoca a secreção de enzimas (incluindo a leucina aminopeptidase) entre as duas cutículas, o que dá início ao processo de desembainhamento larvar no rúmen do hospedeiro.

O desembainhamento é a fase inicial da infecção parasitária, sem o qual o *H. contortus* torna-se

incapaz de se estabelecer e se multiplicar no hospedeiro. Essa é uma das razões pela qual existe a especificidade entre espécies animais, impedindo que os NGI de ovinos parasitem os equinos. Dentre diversos fatores, o microclima do rúmen (pH e temperatura) e as concentrações de dióxido de carbono diluído ativam as células neurosecretoras das L₃, desencadeando a liberação de enzimas e o início do processo de desembainhamento. Componentes presentes no abomaso, como o bicarbonato (sistema tampão de ácido carbônico), também são descritos como importantes nesse processo (PETRONIJEVIC; ROGERS, 1983; SOMMERVILLE, 1957). O desembainhamento, geralmente, ocorre na parte do trato digestivo imediatamente anterior ao habitat do parasito adulto. Para as espécies que residem no abomaso, como *H. contortus*, o desembainhamento ocorre rapidamente após as L₃ adentrarem no rúmen. Estima-se que a maioria das larvas perde a bainha após 60 minutos. Para *H. contortus* e *T. axei*, Sommerville (1957) estima uma taxa de 50% de desembainhamento após 34 e 24 minutos, respectivamente. A persistência da larva no rúmen não aumenta sua sobrevivência, podendo ser um fator de queda no estabelecimento da infecção.

Resistência parasitária aos anti-helmínticos

O controle parasitário dos nematódeos gastrintestinais é baseado em tratamentos repetidos do animal com drogas anti-helmínticas (AMARANTE et al., 1997). Segundo Torres-Acosta e Hoste (2008), para o controle de NGI dois pontos primordiais devem ser abordados: (i) nos hospedeiros, a melhoria da resistência, da resiliência e da redução da carga parasitária; (ii) no ambiente, a redução da contaminação das pastagens por L₃.

A prática de tratamentos repetidos favorece o surgimento de populações de helmintos resistentes às drogas existentes (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). Segundo Sangster e Gill (1999), a resistência aos anti-helmínticos é o declínio da eficiência de uma droga contra uma população de parasitos anteriormente suscetível àquele tratamento. A resistência contra todos os grupos de fármacos utilizados é uma realidade mundial (MOLENTO; PRICHARD, 1999), sendo um importante problema, principalmente em ovinos e caprinos (GOPAL et al., 1999).

O primeiro relato de resistência a anti-helmínticos para controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos foi descrito na década de 1960, após avaliação de tratamentos com tiabendazole (DRUDGE et al., 1964). Esse problema disseminou-se pelo mundo inteiro e perpetua-se até os dias atuais. Em pesquisa realizada por Bartley et al. (2003), em 90 propriedades da Escócia, os autores detectaram que 64% das propriedades apresentaram resistência ao tiabendazole. No Quênia, Waruiru (1997) avaliou a eficácia do closantel, albendazole e levamisole em ovinos e relatou a presença da resistência múltipla de *H. contortus* a todas as drogas testadas.

No Brasil, após o primeiro relato de resistência aos anti-helmínticos em ovinos no Rio Grande do Sul (SANTOS; GONÇALVES, 1967), não faltaram relatos de isolados resistentes aos fármacos. Echevarria et al. (1989), examinando rebanhos no município de Bagé-RS, encontraram rebanhos com helmintos resistentes aos benzimidazóis, ao tetramisole e rebanhos com resistência múltipla. Estudo realizado no Rio Grande do Sul por Cezar et al. (2010), demonstrou que nos testes de eficácia anti-helmíntica não ocorreu a redução na contagem de OPG, concluindo então a presença da resistência a levamisole, moxidectina, albendazole, ivermectina, nitroxil, disofenol, triclofon, closantel e combinação de ivermectina + levamisole + albendazole no estado do Rio Grande do Sul.

Na busca de alternativas para um efetivo controle dos NGI em pequenos ruminantes, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de avaliar plantas com compostos bioativos que possam ser empregados no manejo integrado de parasitoses, aumentando a produção animal e mitigando os efeitos deletérios dos resíduos químicos nos produtos de origem animal e no ambiente. Como os taninos condensados (TC) são os principais compostos vegetais envolvidos na ação direta aos estádios iniciais dos NGI (MINHO et al., 2008a, 2008b), o teste de inibição do desembainhamento larvar é uma ferramenta para seleção de fontes vegetais com potencial anti-helmíntico.

A ação *in vitro* dos TC sobre o desembainhamento de L₃ de *H. contortus* e *T. colubriformis* tratadas com quatro extratos de plantas taniníferas (Castanha - *Castanea sativa*, Pinheiro - *Pinus sylvestris*, Érica -

Erica erigena e Giesta - *Sarothamnus scoparius*), foi avaliada por Bahuaud et al. (2006). Nesse experimento, foi descrito que os TC, também chamados de proantocianidinas, foram os principais responsáveis pela inibição do desembainhamento das L₃, visto que ocorreu redução significativa na taxa de desembainhamento de larvas de *H. contortus* frente às plantas *C. sativa*, *P. sylvestris* e *E. erigena*.

Brunet e Hoste (2006) relatam que dentro da classe dos TC existem vários compostos químicos, sendo alguns mais potentes que outros. Esses mesmos autores comprovaram que as prodelphinidinas são mais potentes que as procianidinas no desembainhamento de larvas de terceiro estágio. Portanto, a caracterização química das moléculas de taninos é fundamental na avaliação de eficácia dos extratos vegetais e seleção de fontes vegetais com potencial anti-helmíntico.

Taninos

Os taninos compreendem um grande grupo de compostos químicos encontrados, principalmente, em frutos verdes e plantas da família Fabaceae. Descritos como metabólitos secundários de várias espécies de plantas, os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Esses compostos fenólicos são classificados conforme sua estrutura molecular em taninos hidrolisáveis ou taninos condensados (TC), sendo os condensados também conhecidos como proantocianidinas. Os TC são os taninos mais comumente encontrados em plantas forrageiras, árvores e arbustos (BARRY; McNABB, 1999).

Os TC apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuem a capacidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides. Esses tipos de compostos são os responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (BRUNETON, 1991).

De acordo com Niezen et al. (1995), o uso de plantas ricas em taninos condensados (TC) pode ser indicado como uma alternativa no controle de helmintos em ovinos, reduzindo o uso de produtos químicos, assim como os custos de produção.

Portanto, além do melhoramento do rebanho, a utilização de fontes de TC na dieta dos animais diminui a pressão de seleção sobre os NGI.

Aplicação do teste *in vitro* de inibição do desembainhamento larvar (IDL)

As pesquisas com extratos vegetais para o controle parasitário aumentaram significativamente nas últimas décadas. Este fato ocorreu, principalmente, devido à escassez de produtos comerciais eficazes disponíveis no mercado mundial. O fenômeno da multirresistência dos NGI aos princípios ativos químicos é uma realidade nas propriedades no Brasil e em todos os países produtores de ovinos. No Brasil, a fitoterapia ainda é uma área experimental recente, sendo que a diversidade de plantas existentes no país indica um campo amplo para pesquisa de compostos bioativos *in natura*, semi-sínteses e sínteses de produtos com ação anti-helmíntica.

O desenvolvimento e a aplicação de metodologias adequadas e padronizadas nos experimentos são fundamentais para a obtenção de resultados confiáveis e capazes de serem repetidos por outros laboratórios. Um extrato vegetal com potencial antiparasitário pode ser descartado ou selecionado corretamente para os testes de eficácia *in vivo* dependendo da metodologia utilizada. A triagem *in vitro* (*screening*) realizada com testes laboratoriais é rápida e barata, em comparação aos testes *in vivo*. Entretanto, os resultados devem ser analisados com cuidado, pois não substituem os testes de eficácia *in vivo*, sendo que os extratos vegetais devem ter seu efeito tóxico avaliado antes da realização dos testes com animais de produção.

O objetivo principal deste trabalho foi padronizar a metodologia de avaliação da ação dos extratos vegetais sobre a inibição do desembainhamento larvar de NGI de ruminantes. Para isto, também foi avaliada a solução teste utilizada no desembainhamento das L₃. A adequação na solução visou uma melhoria na avaliação das diversas concentrações testadas e cálculo preciso da CI₅₀ (concentração inibitória capaz de impedir o desembainhamento de 50% das larvas avaliadas), assim como averiguar a repetibilidade dos ensaios experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do extrato a ser testado

Prepara-se a solução padrão do extrato a ser testado (solução mãe na concentração desejada). A partir da solução mãe, são realizadas diluições seriadas na base dois (2) para obtenção das demais concentrações a serem utilizadas no teste. Cada concentração de extrato é avaliada em duplicata ou em quadruplicata (quatro repetições), dependendo da finalidade da pesquisa (*screening* ou avaliação de eficácia).

Para o início dos testes, são preparadas soluções com concentrações padronizadas, utilizando-se a metodologia de diluições seriadas (diluição 1:1, mesma quantidade de extrato e de água destilada). Dessa maneira, a concentração inicial será reduzida pela metade, e assim por diante, até a última diluição (exemplo: 100, 50, 25, 12,5 mg/mL⁻¹). Recomenda-se preparar 25mL de solução padrão. Retira-se 21mL desta e transfere-se para tubo falcon de 50mL, contendo 21mL de água destilada, totalizando 42mL da primeira concentração de extrato. Agita-se em agitador tipo vortex, retira-se 21mL, procede-se à diluição seguinte, e assim sucessivamente até que todos os extratos estejam preparados. Após o término das diluições, 21mL de cada concentração do extrato são repartidos em duas porções de 10mL e transferidos para dois tubos falcon de 15mL. Dessa forma, o extrato será feito em duplicata para cada concentração.

Quantificação das larvas

Para a realização do teste, são utilizadas larvas de terceiro estágio (L₃) recuperadas de coproculturas de animais doadores infectados com nematoides gastrintestinais. Deve-se realizar a contagem das larvas em cinco alíquotas de 50μL, calculando-se a média das cinco leituras. Esse cálculo é realizado utilizando-se uma regra de três simples, baseada na contagem inicial de larvas por μL na solução recuperada da coprocultura. Sempre após centrifugar (concentrar) ou adicionar água destilada (diluir) na solução, quantifica-se novamente as larvas, visto que esta deve estar padronizada em 1500L₃ a cada 1500μL (1500L₃/1500μL). Essa solução contendo as L₃ deve ser padronizada, pois este é o volume final utilizado no teste (1500μL em cada poço). Quando o número de L₃ for menor que 1500 L₃/1500μL, deve-

se centrifugar a solução larvar a 3000rpm durante 3 minutos para concentrá-la. Quando estiver concentrada, mais de 1500L₃/1500μL, a solução deve ser diluída para obtenção da concentração ideal.

Preparo do teste

Utilizando-se tubos falcon (capacidade 15mL), adicionar 1500μL da solução larvar padronizada em 10mL do extrato na concentração do extrato a ser testada (pipetar inicialmente os 10mL). O procedimento é o mesmo para todas as concentrações. Em todas as análises é incluído um controle negativo, contendo apenas os 1500μL da solução larvar e 10mL de água destilada. Por inversão faz-se a homogeneização dos tubos, colocando-os em estufa climatizada a 22°C, durante 3h.

Transcorridas as 3 horas de incubação, centrifuga-se os tubos a 3000rpm, durante dois minutos, retira-se o sobrenadante, adiciona-se PBS (tampão fosfato-salino, pH 7,2) até completar o tubo falcon e centrifuga-se novamente. Esta etapa da lavagem é realizada para retirar todo o extrato que ainda possa estar em contato com as larvas. Repete-se a etapa de lavagem/centrifugação por três vezes. Ao final da última centrifugação, retira-se o sobrenadante deixando no tubo somente os 1500μL que contém as larvas.

Preparo da solução de desembainhamento

Com auxílio de um béquero e agitador magnético, dissolve 16,5g de cloreto de sódio P.A. em uma solução de hipoclorito de sódio 2%, q.s.p 100mL. Retire 1mL dessa solução inicial e dilua em PBS pH 7,2 na proporção 1:300.

Preparo da placa de 24 poços

A placa de 24 poços (Figura 2) possui quatro fileiras (identificadas de A até D) e seis colunas (identificadas de um a seis). As fileiras devem ser relacionadas às concentrações dos extratos a serem testados, enquanto as colunas apresentam o tempo de reação entre as larvas e a solução de hipoclorito (uma coluna para cada dez minutos de contato da L₃ com a solução de desembainhamento). Para o preparo da placa, retira-se, de cada tubo falcon, 100μL de solução de larvas, previamente homogeneizada, adicionando este mesmo volume nos seis poços da mesma fileira. Assim, haverá seis

poços (uma linha completa) contendo a mesma concentração do extrato. Faz-se o mesmo procedimento para todos os poços da placa. Após distribuir todas as amostras de larvas na placa, adiciona-se 1400 μ L da solução de hipoclorito de sódio em todos os poços o mais rápido possível, programando o timer tão logo seja adicionada a solução de hipoclorito no último poço. Após incubação de dez minutos, duas gotas de lugol são adicionadas a todos os poços da primeira coluna da placa. Essa fase de bloqueio da reação pela adição de lugol é repetida de dez em dez minutos até completarem-se 60 minutos de avaliação, sendo avaliada uma coluna de cada vez. Não se esquecer de realizar o teste em duplicata, ou seja, duas placas de 24 poços contendo as mesmas diluições avaliadas.

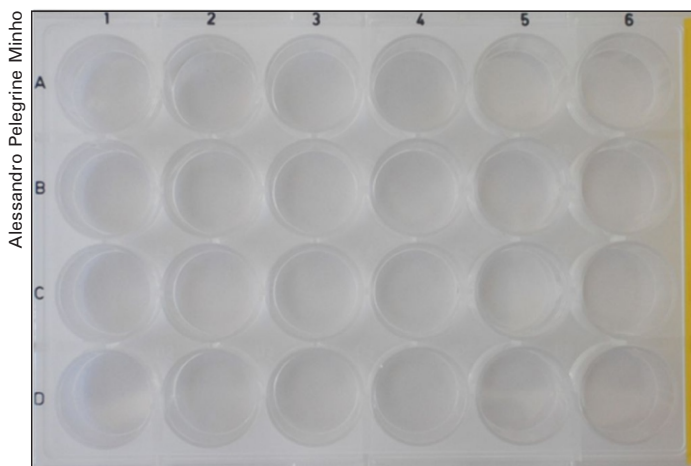


Figura 2. Foto da placa de 24 poços utilizada para realização do teste de inibição do desembainhamento larvar (IDL).

Ao término dos 60 minutos de incubação (dez minutos por coluna) procede-se à leitura da placa em microscópio invertido (aumento 10X), contando a quantidade de larvas com cutícula e sem cutícula, a fim de se estimar a porcentagem de inibição do desembainhamento larvar acarretado pelo composto bioativo vegetal (extrato). O cálculo da porcentagem (%) de desembainhamento é realizado segundo a equação a seguir:

$$\frac{\text{número de larvas (L}_3\text{) sem bainha}}{\text{número de L}_3\text{ sem bainha} + \text{número de L}_3\text{ com bainha}} \times 100$$

Cálculo da concentração inibitória a 50% (CI₅₀) do desembainhamento larvar

Em testes de efeito dose-resposta, como é o teste de desembainhamento larvar, o valor utilizado para comparação entre diferentes princípios ativos (drogas

ou extratos vegetais) é a CI₅₀. Para determinar a concentração do extrato que causa 50% do efeito máximo do teste, é necessária a determinação da equação dose-resposta para a droga, a partir da estimação do valor do declive (*slope*) da curva. Esse cálculo pode ser realizado em softwares específicos, como o GraphPad Prism® 5.01. (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e a padronização de testes *in vitro* com NGI são de suma importância para potencializar e aprimorar a avaliação adequada do efeito anti-helmíntico de produtos naturais ou seus compostos bioativos. Sua utilização é rápida, barata e pode ser realizada com pequenas quantidades da planta a ser avaliada. Entretanto, seus resultados devem ser avaliados com cautela, pois ainda não substituem os testes de eficácia *in vivo* (realizados com animais). Por outro lado, a seleção inicial (*screening*) das centenas ou milhares de potenciais fontes vegetais com efeito anti-helmíntico deve ser realizada por intermédio de testes *in vitro*, pois além de propiciarem as qualidades de economicidade e rapidez, diminuem a necessidade de realização de testes com animais de produção.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, A. F. T.; BAGNOLA JUNIOR, J.; AMARANTE, M. R. V.; BARBOSA, M. A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 89-104, Dec. 1997.
- ANUALPEC 2011. São Paulo: Instituto FNP, 2011. 378 p.
- BAHUAUD, D.; MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO, C.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. **Parasitology**, New York, v. 132, n. 4, p. 545-554, Apr. 2006.
- BARRY, T. N.; McNABB, W. C. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, n. 4, p. 263-272, Apr. 1999.
- BARTLEY, D. J.; JACKSON, E.; JOHNSTON, K.; COOP, R. L.; MITCHELL, G. B. B.; SALES, J.; JACKSON, F. A survey of anthelmintic resistant nematode parasites in Scottish sheep flocks.

Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.117, n. 1-2, p. 61-71, Nov. 2003.

BRUNETON, J.; BARTON, D.; FRESNO, A. V. del. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991. 594 p.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 20, p. 7481-7487, Oct. 2006.

CALVETE, R.; VILLWOCK, L. H. Perfil da ovinocultura de lã e carne do Rio Grande do Sul e seus desafios para o futuro. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 45., 2007, Londrina. **Conhecimentos para agricultura do futuro: anais**. Londrina: SOBER, 2007. 1 CD-ROM.

CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; RIBAS, H. O.; VOGEL, F. S. F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 157-160, Oct. 2010.

COSTA, N. G. **A cadeia produtiva de carne ovina no Brasil rumo às novas formas de organização da produção**. 2007. 182 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Programa de Pós-graduação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N.; ELAM, G. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 25, n. 108, p. 1512-1518, 1964.

ECHEVARRIA, F. A. M.; PINHEIRO, A. C.; CORRÊA, M. B. C. Controle estratégico da verminose ovina no Rio Grande do Sul. In: CURSO DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 2., 1988, Bagé. **Anais...** Bagé: CBPV, 1989. p.159-163.

GOPAL, R. M.; POMROY, W. E.; WEST, D. M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 781-786, May 1999.

JOHNSTONE, C. Exsheathment. In: JOHNSTONE, C. **Parasites and parasitic diseases of domestic animals**. Philadelphia: University of Pennsylvania, 1998. Disponível em: <http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Nematodes/nems_7.htm>. Acesso em: 13 mar. 2014.

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. S.; GENNARI, S. M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A. L. In vitro effect of condensed tannin extract from *Acacia (Acacia mearnsii)* on gastrointestinal nematodes of sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, p. 147-151, 2008a. Suplemento 1.

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S. M.; ABDALLA, A. L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1-3, p. 172-181, Nov. 2008b. Suplemento 1.

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

NIEZEN, J. H.; WAGHORN, T. S.; CHARLESTON, W. A. G.; WAGHORN, G. C. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. **Journal Agricultural Science**, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 281-289, Oct. 1995.

PETRONIJEVIC, T.; ROGERS, W. P. Gene activity and the development of early parasitic stages of nematodes. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 197-199, 1983.

SANGSTER, N. C. Anthelmintic resistance: past, present and future. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 115-124, Jan. 1999.

SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v. 9, p. 201-209, 1967.

SOMMERVILLE, R. I. The exsheathing mechanism of nematode infective larvae. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 6, n. 1, p. 18-30, Jan. 1957.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 77, n. 2-3, p. 159-173, July 2008.

WARUIRU, R. M. Efficacy of closantel, albendazole and levamisole on an ivermectin resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 65-71, Dec. 1997.

XEYLA, R. Estudo revela que Brasil pode avançar na exportação de ovinos: o estudo de mercado externo de produtos derivados da ovinocaprinocultura analisa o fluxo internacional da carne ovina e caprina e as oportunidades de negócios para o Brasil. **Agência Sebrae de Notícias**, Brasília, DF, 15 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?cod=10364794&canal=199>>. Acesso em: 15 maio 2013.

Comunicado Técnico, 87

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pecuária Sul
Endereço: BR 153, km 603, Caixa Postal 242,
 96401-970 - Bagé, RS
Fone: (53) 3240.4650
Fax: (53) 3240.4651
e-mail: www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

1ª edição on line

Comitê de Publicações

Presidente: *Claudia Cristina Gulias Gomes*
Secretária-Executiva: *Graciela Olivella Oliveira*
Membros: *Claudia Cristina Gulias Gomes, Daniel Portella Montardo, Estefanía Damboriarena, Graciela Olivella Oliveira, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Lisiane Bassols Brisolará, Marco Antônio Karam Lucas, Naylor Bastiani Perez, Renata Wolf Suñé, Roberto Cimirro Alves, Vinicius do Nascimento Lampert, Viviane de Bem e Canto.*

Expediente

Supervisão editorial: *Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul*
Revisão de texto: *Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul*
Editoração eletrônica: *Roberto Cimirro Alves*
Tratamento de ilustrações: *Roberto Cimirro Alves*