

São Carlos, SP / Junho, 2025

## Inibição da eclosão dos ovos do nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus* pelos extratos concentrados do guandu (*Cajanus cajan* L.) obtidos a partir de plantas com distintos estágios de crescimento

Júlia Francesca da Silva<sup>(1)</sup>, Jeniffer Miho Yoshioka<sup>(1)</sup>, Ana Carolina de Souza Chagas<sup>(2)</sup> e João Oiano Neto<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP.

<sup>(2)</sup> Pesquisadores, Embrapa Pecuaría Sudeste, São Carlos, SP.

**Resumo** — A ovinocultura mundial apresenta gastos elevados com o tratamento dos parasitas intestinais, principalmente o nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus*, devido à alta produção de ovos pelas fêmeas e ao desenvolvimento da resistência em relação aos medicamentos disponíveis. O guandu, *Cajanus cajan* L. (Fabaceae), é uma planta leguminosa originária da Índia, porém está presente em países tropicais. Possui diversas aplicações no campo sendo utilizada como forrageira, adubo verde e na recuperação de pastagens degradadas. Popularmente, o guandu é utilizado no tratamento de aftas, tosses, infecções, etc. Existem relatos na literatura descrevendo a atividade antihelmíntica do guandu var. guatã G<sub>66</sub> contra nematoides do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antihelmíntica dos extratos concentrados do guandu var. mandarim genótipo G<sub>3</sub> na inibição da eclosão dos ovos de *H. contortus*. O genótipo G<sub>3</sub> foi cultivado em uma área da Embrapa Pecuaría Sudeste, as raízes e as folhas + ramos foram coletados durante 180 dias, em intervalos de 30 dias. Os ovos de *H. contortus* utilizados no ensaio *in vitro* foram obtidos diretamente das fezes de ovinos do rebanho da Embrapa Pecuaría Sudeste, infectados artificialmente com a cepa susceptível aos antihelmínticos Echevarria 1991. O extrato das raízes, coletadas com 120 dias de desenvolvimento, apresentou 100% de inibição da eclosão dos ovos a 100 mg/mL, porém todos os demais extratos não apresentaram atividade inibitória significativa. Não existe na literatura dados descrevendo a ação antihelmíntica do guandu var. mandarim sobre *H. contortus*. Este estudo amplia o conhecimento da atividade biológica desta espécie vegetal e abre portas para novas investigações.

**Termos para indexação:** *Haemonchus contortus*, *Cajanus cajan*, Guandu, Nematoide Gastrointestinal, Antihelmíntico, Fitoquímica.

### Embrapa Pecuaría Sudeste

Rod. Wasghinton Luiz, Km 234  
13560-970, São Carlos, SP  
www.embrapa.br/pecuaría-sudeste  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

#### Comitê Local de Publicações

Presidente

André Luiz Monteiro Novo

Secretário-executivo

Luiz Francisco Zafalon

Membros

Aisten Baldan, Gisele Rosso,

Maria Cristina Campanelli

Brito, Silvia Helena Picirillo

Sanchez

Revisão de texto

Gisele Rosso

Normalização bibliográfica

Aisten Baldan (CRB-1/2757)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Maria Cristina Campanelli Brito

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

## Inhibition of gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* eggs hatching by crude extracts of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) obtained from plants at different growth stages

**Abstract** — Sheep farming worldwide incurs high losses in treating intestinal parasites, especially due to the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. This parasite led to significant challenges due to high egg production rate by adult females and to rising resistance to available drugs. *Cajanus cajan* L. (Fabaceae), commonly known as pigeonpea, is a leguminous plant native from India, but it is also available other tropical countries. This plant has several agricultural applications, including use as forage, green fertilizer, and into regeneration of degraded pasturelands. Traditionally, pigeonpea is also used to treat ailments such as thrush, cough, and infections. Some reports have highlighted the anthelmintic activity of the pigeonpea variety guatã G<sub>66</sub> against soil nematodes. In this sense, the objective of this study was to evaluate the anthelmintic effect of crude extracts from the pigeonpea variety mandarim genotype G<sub>3</sub> on inhibiting *H. contortus* egg hatching. This genotype was cultivated at Embrapa Southeast Livestock, with roots, leaves, and branches collected each 30 days over a period of 180 days. The *H. contortus* eggs used in the *in vitro* assay were obtained directly from the feces of sheep artificially infected with the Echevarria 1991 susceptible strain. Extracts' solutions were prepared at a concentration of 100 mg/mL, and measurements were done in six replicates. Root extract obtained from plants after 120 days of growth, demonstrated 100% of egg hatching inhibition at 100 mg/mL, while all other extracts showed no significant activity. There are no prior scientific reports describing the anthelmintic activity of the pigeonpea var. mandarim against *H. contortus*. This study enhances our understanding of the biological activity of this plant species and paves the way for further investigations.

**Index terms:** *Haemonchus contortus*, *Cajanus cajan*, Pigeonpea, Gastrointestinal Nematode, Anthelmintic, Phytochemistry.

### Introdução

A ovinocultura mundial vem apresentando diversas perdas anualmente devido aos endoparasitas que, por sua vez, vem apresentando

cada vez mais resistência aos medicamentos convencionais. Os primeiros relatos de resistência a antihelmínticos utilizados contra nematoides gastrointestinais de ovinos, dentre os quais o principal é o nematoide hematófago *Haemonchus contortus*, foi nos anos 60 (Drudge et al., 1964). A ovinocultura continua enfrentando dificuldades para contornar tal situação.

No Brasil, estima-se um rebanho com mais de 21,8 milhões de ovinos, com maior destaque para as regiões Nordeste e Sul do país (IBGE, 2023). Tendo em vista a importação crescente de carne ovina, o mercado brasileiro tem se mostrado um grande consumidor do mesmo (Famasul, 2024).

Neste contexto, a busca por novos compostos antihelmínticos na natureza tem se mostrado promissora. A extensa atividade biológica de metabólitos secundários das plantas faz destes um recurso essencial na medicina popular, seja como medicamento, cosmético ou matéria-prima para a química fina (Fumagali et al., 2008).

Historicamente, grande parte das drogas utilizadas atualmente são originárias de produtos naturais. Segundo Harvey (1999), entre 60 e 80% dos antibacterianos e drogas anticancerígenas são derivados de produtos naturais.

A Fitoquímica busca estudar quimicamente compostos bioativos provenientes das plantas, isolando tais substâncias e identificando grupos de metabólitos secundários relevantes. O estudo é normalmente iniciado a partir das plantas de uso medicinal popular, por indicação quimiotaxonômica, ou estudos etnofarmacológicos, uma vez que a detecção de atividade de tais extratos torna-se mais seletiva do que em espécies vegetais escolhidas aleatoriamente (Bessa et al., 2013).

Apesar de tal método de pesquisa ter perdido espaço devido ao crescimento da abordagem molecular na descoberta de novas drogas, a diversidade e a complexidade estrutural dos produtos naturais faz deles uma fonte valiosa para identificação de novos compostos que podem ser utilizados de forma terapêutica (Harvey, 1999).

Ainda há uma grande lacuna referente ao conhecimento científico de compostos bioativos produzidos por plantas de uso medicinal popular. O isolamento contínuo de uma gama crescente de novos metabólitos secundários sugere que ainda há muito o que ser explorado dentro desta vasta biblioteca de micromoléculas da natureza (Paterson; Anderson, 2005).

### ***Haemonchus contortus***

Dentre as várias espécies do gênero *Haemonchus*, *Haemonchus contortus* é a espécie mais importante, prevalente e o parasita mais resistente de pequenos ruminantes. Essa espécie mostra-se dominante em termos de intensidade de infecção, possui alta taxa de estabelecimento de infecção e as fêmeas possuem elevada fertilidade (Melo, 2005). Apesar da alta mortalidade da população larval após sua liberação no meio ambiente, a produção massiva de 5 mil a 15 mil ovos por dia pelas fêmeas (Emery et al., 2016) garante o sucesso da infecção de novos ovinos.

*H. contortus* é considerado o principal responsável pelo rápido desenvolvimento de resistência em relação aos antihelmínticos utilizados atualmente (Sangster, 2001). O parasita adulto localiza-se especificamente no abomaso do animal e seu tamanho pode variar entre 1,1 cm e 2,7 cm de comprimento. Possui hábito hematófago e em casos de infecção severa os sinais clínicos apresentados pelos animais são anemia hemorrágica aguda e perda de peso progressiva (Melo, 2005).

Uma dieta pobre em proteínas resulta em sinais clínicos mais pronunciados, indicando que a doença pode ser intensificada dependendo da qualidade da alimentação do animal infectado (Allonby; Urquhart, 1975). De acordo com Santos et al. (2012), fatores ambientais como chuva, umidade relativa e alta temperatura favorecem a migração da larva L<sub>3</sub> (terceiro estágio infectante), de forma que a mesma consiga se locomover até um local com maior probabilidade de ser ingerida pelo futuro hospedeiro.

### **Anti-helmínticos**

O primeiro marco no desenvolvimento de um antihelmíntico data de 1938 com o descobrimento da fenotiazina. A partir de então, extensas pesquisas vêm sendo realizadas na busca de um composto “ideal” (Padilha, 1996).

Um antihelmíntico pode ser considerado “ideal” quando apresenta as seguintes características: possui baixo custo e amplo espectro de atividade, sem causar efeitos secundários indesejáveis aos animais em tratamento; facilidade de manipulação e administração; não apresentar resíduos nos subprodutos animais ou que sejam de baixo período residual, sendo eliminados em pouco tempo após o tratamento.

É importante ressaltar que o medicamento deve ser tóxico apenas para o parasita e não deve apresentar risco ao animal em tratamento (Padilha, 1996).

O tiabendazol foi o primeiro antihelmíntico benzimidazólico de amplo espectro comercializado. O manejo inadequado e descontrolado do medicamento resultou em perda de eficácia do tratamento e surgimento de gerações mais resistentes do parasita.

A partir do primeiro relato de resistência à droga em meados dos anos 60, várias pesquisas desenvolveram uma série de benzimidazóis (BZD) e pró-benzimidazóis (pró-BZD) para ser utilizada como antihelmínticos. São eles: albendazol, febendazol, mebendazol, oxfendazol, oxibendazol, febantel, tiofanato, netobimim, entre outros (Melo, 2005).

Os benzimidazóis são um grupo de fármacos distribuídos no mundo todo e possui ação ovicida, larvicida e adulticida, ou seja, são ativos em todos os estágios de desenvolvimento do nematoide. É uma classe de compostos bicíclicos que possui em sua estrutura um anel benzeno e um anel imidazol.

Acredita-se que tais drogas possuem um mecanismo de ação que inibe a formação de microtúbulos nos nematoides. Tal estrutura proteica possui papel crucial para manutenção da vida do parasita, sendo essencial para absorção de nutrientes, transporte celular e secreção celular (Jasmer et al., 2000).

Em um levantamento feito no Estado do Ceará, a maioria dos produtores entrevistados (66,7%) respondeu ter usado formulações à base de levamisol na última vermifugação aplicada no rebanho, e o restante à base de benzimidazóis (Padilha, 1996).

O levamisol é um composto do grupo dos imidotiazóis de amplo espectro, agindo sobre os estágios adultos dos nematoides. A absorção do levamisol ocorre através da cutícula do parasita e afeta sua coordenação neuromuscular (Padilha, 1996).

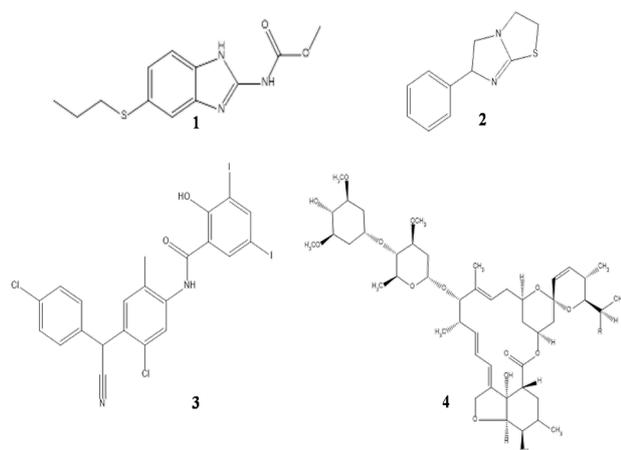
O fármaco é eliminado pelo animal principalmente pela urina, deixando baixos resíduos no tecido. Recomenda-se aguardar dois dias após a aplicação oral ou sete dias após tratamento parenteral para comercialização da carne e do leite. Porém, em alguns países esse medicamento não é aprovado para uso em bovinos leiteiros (Prichard, 1986).

Além dos benzimidazóis e imidotiazóis, existem ainda dois grupos de fármacos disponíveis para utilização no combate a nematoides de animais domésticos: salicilanilidas e avermectinas (Padilha, 1996).

As avermectinas são o grupo de antihelmínticos obtidos a partir da fermentação da bactéria *Streptomyces avermitilis*, isolada pela primeira

vez de uma amostra de solo em 1979 (Gerenutti; Spinosa, 1997). É um grupo de compostos formado por lactonas macrocíclicas que apresentam amplo espectro de atividade antihelmíntica e inseticida (Campbell et al., 1983). Apesar de terem sido introduzidos como antihelmíntico em meados da década de 80, nos anos 90 já era possível encontrar diversos relatos científicos de resistência de *H. contortus* frente ao medicamento (Gill et al., 1991).

A estrutura química de alguns compostos com ação antihelmíntica está representada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura química de alguns antihelmínticos comumente utilizados: (1) albendazol - da classe dos benzimidazóis; (2) levamisol - da classe dos imidotiazóis; (3) closantel - da classe das salicilanilidas e (4) abamectina - da classe das avermectinas.

### Fenômeno da resistência aos antihelmínticos

No Brasil, desde o primeiro estudo de resistência aos antihelmínticos pelos nematoides gastrintestinais de ovinos, no final dos anos 60 (Santos; Gonçalves, 1967), a resistência a todos os fármacos comercialmente utilizados tem sido relatada em quase todas as regiões brasileiras (Bassetto et al., 2024).

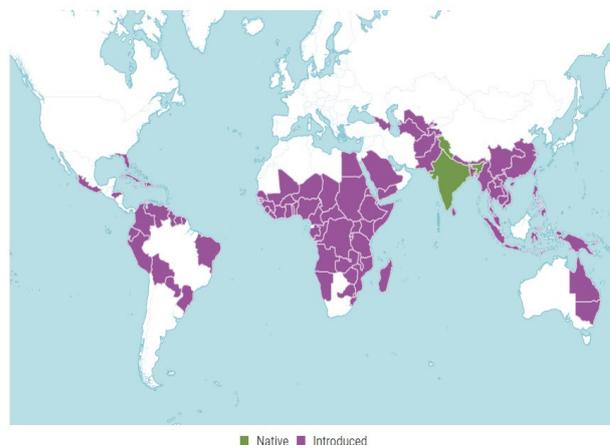
O desenvolvimento da resistência ocorre devido ao uso incorreto do agente antiparasitário e apresenta três componentes principais: estabelecimento, desenvolvimento e dispersão. O estabelecimento é influenciado pelo tamanho

e diversidade da população, sendo que, quanto maiores estes fatores, maior a probabilidade da existência de indivíduos com gene resistente que possa contribuir para o desenvolvimento da resistência. A dispersão é dada pelo fluxo gênico, em que o parasita resistente passa adiante seus genes que lhe conferem tais características (Melo, 2005).

Ramalho et al. (2008) estudaram a resistência de três parasitas frente a três medicamentos: levamisol (imidotiazol), closantel (salicilanilida) e moxidectina (milbemicina). Dentre os parasitas testados (*H. contortus*, *Strongyloides* spp. e *Trichostrongylus* spp.), *H. contortus* mostrou ser o mais resistente, apresentando resistência superior a 90% para todos os compostos avaliados.

### Guandu – *Cajanus cajan* L.

O guandu, *Cajanus cajan* L. - Fabaceae, é uma leguminosa arbustiva, anual ou semiperene, de clima tropical e semitropical (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição do guandu pelo mundo. Fonte: Royal Botanic Gardens KEW. Disponível em: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:1152177-2>.

Atinge uma altura média de três a quatro metros e apresenta diversos genótipos com características distintas como a coloração das flores (Figura 3).



Fotos: João Olano Neto

**Figura 3.** Aspectos físicos de alguns genótipos do guandu cultivados na Embrapa Pecuária Sudeste. Planta com flores (a) e sementes (b) do genótipo G9 e planta com flores do genótipo G<sub>1</sub> (c).

Sua utilização é bastante diversificada, como alimento para o gado, na recuperação de pastagens degradadas e como adubo verde devido à sua grande produção de massa verde e capacidade fixadora de nitrogênio (Carvalho et al., 2004; Pereira, 1985). Na dieta humana é considerado uma fonte ideal de proteínas e vitamina B, especialmente para a população vegetariana (Liu et al., 2010a).

Uma gama de aplicações de uso popular medicinal foi retratada em diversos países (Tabela 1). Na Índia, o guandu é utilizado no tratamento da diabetes (Kalfas, 1987); na China, as folhas são mastigadas para tratamento da afta e a decocção das folhas é utilizada para tratar traumatismos, infecções por queimaduras, escaras, tosse e diarreia (Liu et al., 2010b); na América do Sul, utilizada para estabilizar o período menstrual (Duke, Vasquez, 1994) e na África, para tratamento de hepatite e sarampo (Abbiw, 1990).

Segundo estudos feitos no Brasil por Braga et al., (2007), extratos metanólicos das folhas e sementes do guandu mostraram-se potencialmente ativos na inibição do crescimento de duas espécies de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*) e apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Outros estudos demonstraram efeitos dos extratos do guandu no controle de nematoides do solo. Gardiano et al. (2011) mostraram que extratos aquosos do guandu foram eficientes em controlar o crescimento da população do nematoide *Rotylenchulus reniformis*. Estudos ainda devem ser feitos em relação à composição do extrato, buscando identificar quais são os compostos responsáveis por tais atividades.

### Metabólitos Secundários

Ao contrário dos metabólitos primários que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da planta em geral, os metabólitos secundários são classes de compostos minoritários produzidos por um vegetal. Possuem papel importante na adaptação da planta ao seu ambiente, contribuindo para uma boa interação com o ecossistema em que se encontra.

Os metabólitos secundários, de maneira geral, possuem frequência inferior a 1% de carbono total (Harborne, 1993). A Tabela 2 descreve resumidamente as principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas e sementes do guandu.

**Tabela 1.** Atividades medicinais dos extratos do guandu sobre diversas doenças descritas na literatura.

Aplicação	Atividade	Referência
Atividade antiplasmodial	Estilbenos, longistilina A e C e ácido betulínico isolados das folhas apresentaram atividade <i>in vitro</i> contra a cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> .	Duker-Eshun et al. (2004)
Doença de Alzheimer	Frações ricas em estilbenos mostraram melhora significativa dos déficits cognitivos e da apoptose dos neurônios. Sugerem agir contra a doença de Alzheimer por meio do aumento da atividade da colina acetiltransferase e mecanismo antioxidativo.	Ruan et al. (2009)
Efeito Hipocolesterolêmico	Estudo com os estilbenos apresentou efeito hipocolesterolêmico possivelmente pelo aumento dos níveis de expressão hepática de receptores de LDL e colesterol da 7- $\alpha$ -hidroxilase e da síntese de ácidos biliares.	Luo et al. (2008)
Antimicrobiana e Antifúngica	Extratos das folhas e sementes inibiram amplamente o crescimento de <i>C. albicans</i> .	Ezeifeke et al. (2004); Okigbo; Omodamiro (2007)
Dano hepático induzido por uso excessivo de álcool	Testes em ratos mostraram que os extratos aquosos e metanólico das folhas podem prevenir o dano ao fígado induzido pelo álcool.	Kundu et al. (2008)
Anticancerígena	Cajanol, isoflavona isolada das raízes, inibiram o crescimento das células de câncer da mama linhagem MCF-7.	Luo et al. (2010)
Antimalárica	Cajachalcona, obtida a partir de extrato metanólico das folhas, apresentou alto potencial para o desenvolvimento de agentes antimaláricos.	Ajaiyeoba et al. (2013)
Antifertilidade	O extrato metanólico de brotos das sementes produziu atividade antifertilidade em camundongos fêmea. A ação contraceptiva não é permanente e as atividades ovarianas retornam alguns dias após a retirada do extrato.	Bandyopadhyay et al. (2010)
Antiúlcera e anti-inflamatória	Extratos das folhas produzidos com diferentes solventes mostraram propriedades antiúlcera e atividade anti-inflamatória em camundongos.	Jaliwala et al. (2014)

**Tabela 2.** Metabólitos secundários dos extratos metanólicos das folhas e sementes do *Cajanus cajan* L.

Tecido vegetal	Rendimento (% m/m)	Classes de metabólitos secundários							
		Al	Tr	St	Ta	Sa	Cu	Fl	An
Folhas	14,72	+	-	+	+	+	+	+	+
Sementes	20,00	+	+	-	+	+	-	+	-

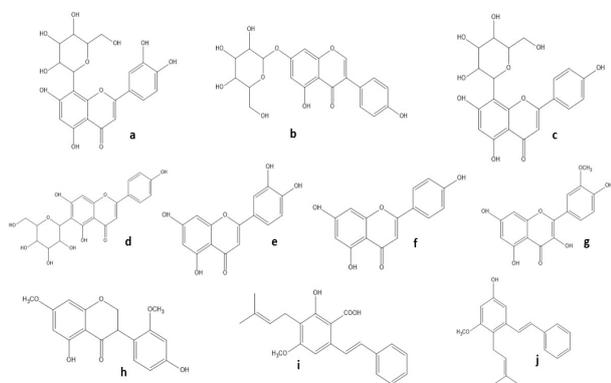
Extratos foram preparados a partir de 50g do material seco e moído.

Abreviações: Al - alcaloides; Tr - triterpenoides; St - esteróis; Ta - taninos; Sa - saponinas; Cu - cumarinas; Fl - flavonoides; An - antraquinonas. (+) presença e (-) ausência.

Adaptado de Braga et al. (2007).

Durante uma investigação química das folhas do guandu, Liu et al., (2010b) observaram que os compostos fenólicos são os principais grupos de compostos responsáveis pela atividade do extrato. Dentro deste grupo estão os flavonoides, isoflavonoides e estilbenos.

Neste mesmo estudo, dez compostos fenólicos ativos, dentre eles, seis flavonoides (apigenina, luteolina, isorhamnetina, vitexina, isovitexina e orientina), dois isoflavonoides (cajanol e genistina) e dois estilbenos (ácido cajanistilbênico e longistilina C) foram identificados utilizando-se cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) (Figura 4).



**Figura 4.** Estrutura química dos compostos presentes nos extratos das folhas do guandu: orientina (a), genistina (b), vitexina (c), isovitexina (d), luteolina (e), apigenina (f), isorhamnetina (g), cajanol (h), ácido cajanistilbênico (i) e longistilina C (j).

## Metodologia

Durante estudos realizados na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos/SP, foram preparados extratos das raízes e folhas + ramos do guandu var. mandarim genótipo  $G_3$ , cultivado em área experimental, coletados em intervalos de 30 dias durante um período de 180 dias, os quais foram submetidos ao teste *in vitro* de inibição da eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*.

A água deionizada utilizada na preparação dos extratos foi produzida no laboratório utilizando um sistema de osmose reversa. A acetona e o metanol (grau PA/ACS, Synth®) foram, inicialmente, agitados com carvão ativo por 24 horas, filtrados em papel de

filtro e destilados em evaporador rotativo antes do uso.

Os equipamentos utilizados durante o trabalho foram:

- Deionizador por osmose reversa marca Vexer® modelo VOL 00207
- Banho-maria de aquecimento Fisatom® 550
- Banho ultrassom Quimis® Q335D2
- Agitador magnético Marconi® MA 085
- Agitador vórtex Warmnest® VX – 28
- Evaporador rotativo Fisatom® 802
- Bomba de vácuo Marconi® MA 2057
- Liquidificador de uso doméstico
- Balança analítica Shimadzu® AUY 220
- Pipetas automáticas Eppendorf® Research plus (100-1000 $\mu$ L), Eppendorf® Research (500-5000 $\mu$ L) e Axygen® autoclavable (1-5mL).

## Amostras e preparo dos extratos concentrados

Os tecidos vegetais do guandu var. mandarim genótipo  $G_3$  foram coletados em períodos distintos de crescimento, com intervalos de coleta de 30 dias contados a partir do plantio, totalizando um período de 183 dias.

A partir da 4<sup>o</sup> coleta (120 dias de crescimento), o guandu apresentava flores e vagens verdes. Os extratos foram preparados a partir do material vegetal fresco, sendo separados em: (1) raízes e (2) folhas + ramos (Figura 5).

A cada intervalo de 30 dias, diversos indivíduos foram coletados aleatoriamente no campo e as raízes foram reunidas em um único pool de tecido vegetal submetido à extração com solvente. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras de folhas + ramos.

Os extratos foram gradualmente produzidos e armazenados em freezer até o momento da realização do teste *in vitro*. Somente após a obtenção de todos os extratos (seis das raízes e seis das folhas + ramos), as soluções desses extratos foram preparadas e submetidas ao ensaio biológico, constituindo assim um único lote de amostras. Desta forma, todas as soluções foram avaliadas utilizando-se ovos de *H. contortus* obtidos em uma mesma coleta, assim como os mesmos controles negativo e positivo.

### Amostras e preparo dos extratos concentrados

Os tecidos vegetais do guandu var. mandarim genótipo G<sub>3</sub> foram coletados em períodos distintos de crescimento, com intervalos de coleta de 30 dias contados a partir do plantio, totalizando um período de 183 dias.

A partir da 4<sup>o</sup> coleta (120 dias de crescimento), o guandu apresentava flores e vagens verdes. Os extratos foram preparados a partir do material vegetal fresco, sendo separados em: (1) raízes e (2) folhas + ramos (FIGURA 5).

A cada intervalo de 30 dias, diversos indivíduos foram coletados aleatoriamente no campo e as raízes foram reunidas em um único pool de tecido vegetal submetido à extração com solvente. O mesmo

procedimento foi adotado para as amostras de folhas + ramos.

Os extratos foram gradualmente produzidos e armazenados em freezer até o momento da realização do teste *in vitro*. Somente após a obtenção de todos os extratos (seis das raízes e seis das folhas + ramos), as soluções desses extratos foram preparadas e submetidas ao ensaio biológico, constituindo assim um único lote de amostras. Desta forma, todas as soluções foram avaliadas utilizando-se ovos de *H. contortus* obtidos em uma mesma coleta, assim como os mesmos controles negativo e positivo.

Fotos: João Cláudio Neto



**Figura 5.** Plantas de guandu var. mandarim genótipo G<sub>3</sub> em diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento das raízes, ramos e folhas: (a) indivíduos com 34 dias de cultivo, (b) 60 dias de cultivo e (c) detalhe das raízes com 34 dias de cultivo.

O material foi lavado em água corrente para remoção de sujeiras e partes de tecidos que apresentassem algum tipo de dano físico. As raízes foram cortadas e separadas do restante. O material foi seco com papel toalha, pesado e moído em liquidificador doméstico com uma fração de água deionizada.

Após a moagem, o material foi transferido para um frasco de vidro, adicionou-se acetona e metanol ao meio e manteve-se sob agitação por aproximadamente 48 horas. Após o período de agitação, a mistura foi filtrada a vácuo em um funil

de placa sinterizada (vidro poroso) e o solvente orgânico foi evaporado utilizando-se um evaporador rotativo.

A água remanescente no extrato foi evaporada com o uso de corrente de ar frio. Ao final de cada período de secagem, pequenos volumes de etanol eram adicionados ao extrato para impedir a contaminação por fungos e os extratos armazenados em refrigerador.

Ao final, foram obtidos 12 extratos, sendo seis das raízes e seis das folhas + ramos. Dados completos da preparação de cada extrato estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Dados de massa de material e volume de solventes utilizados no preparo dos extratos para cada estágio de crescimento do gandu var. mandarim genótipo G<sub>3</sub>.

Coleta	Preparo dos extratos	Raízes	Folhas + ramos
1ª Coleta (34 dias) Nº indivíduos: 100	Amostra (g)	26	236
	Água (mL)	200	400
	Acetona (mL)	200	300
	Metanol (mL)	200	300
	Proporção (v/v/v)	1:1:1	1,3:1:1
2ª Coleta (60 dias) Nº indivíduos: 86	Amostra (g)	156	588
	Água (mL)	500	1000
	Acetona (mL)	500	1000
	Metanol (mL)	500	1000
	Proporção (v/v/v)	1:1:1	1:1:1
3ª Coleta (90 dias) Nº indivíduos: 39	Amostra (g)	182	512
	Água (mL)	585	750
	Acetona (mL)	585	750
	Metanol (mL)	585	750
	Proporção (v/v/v)	1:1:1	1:1:1
4ª Coleta (120 dias) Nº indivíduos: 37	Amostra (g)	248	420
	Água (mL)	1000	1000
	Acetona (mL)	500	500
	Metanol (mL)	500	500
	Proporção (v/v/v)	2:1:1	2:1:1
5ª Coleta (156 dias) Nº indivíduos: 37	Amostra (g)	431	446
	Água (mL)	1000	1000
	Acetona (mL)	500	500
	Metanol (mL)	500	500
	Proporção (v/v/v)	2:1:1	2:1:1
6ª Coleta (183 dias) Nº indivíduos: 31	Amostra (g)	308	314
	Água (mL)	1000	1000
	Acetona (mL)	500	500
	Metanol (mL)	500	500
	Proporção (v/v/v)	2:1:1	2:1:1

### Teste de eclodibilidade dos ovos (EHT – Egg Hatch Test)

No teste da eclodibilidade dos ovos (EHT), os ovos dos nematoides gastrintestinais foram coletados diretamente da ampola retal dos animais, que possuíam um valor superior de 2 mil ovos por grama de fezes (OPG).

As fezes foram homogeneizadas em água e filtradas. Os ovos foram retidos em peneiras de 25µm, lavados com água destilada e centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o material remanescente ressuscitado em solução salina.

Após centrifugação, os ovos coletados foram colocados para sedimentação. Foi realizada então a contagem dos ovos em cinco alíquotas de 50 µL e preparadas amostras com aproximadamente 100 ovos/250 µL (Chagas, 2008).

Cada extrato preparado foi inicialmente ressuscitado em 10 mL de água deionizada com o auxílio de um agitador vórtex e ultrassom, em seguida levado à geladeira para resfriar. O extrato frio foi despigmentado com 10mL de éter etílico gelado sob agitação em vórtex por 30s.

Em seguida, a mistura foi mantida em repouso na geladeira até a separação das fases. A fração éter etílico foi removida com uma pipeta Pasteur e descartada. O processo foi repetido até que a fase orgânica não apresentasse mais a coloração característica dos pigmentos.

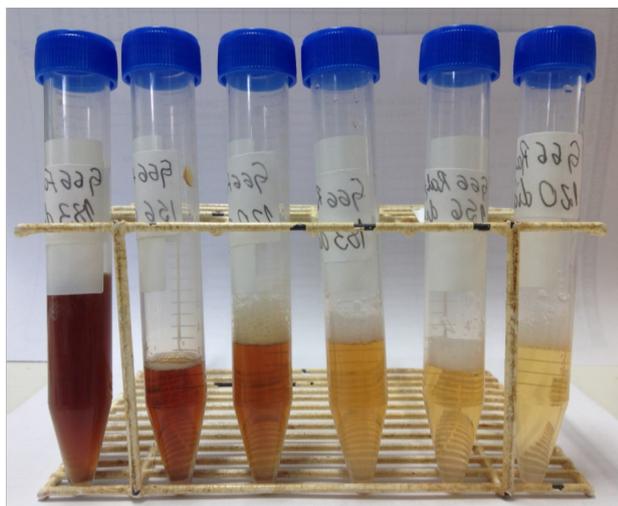
Após a despigmentação, a solução foi evaporada por completo em corrente de ar frio para pesagem do extrato despigmentado e preparo da solução para análise.

A etapa de despigmentação foi necessária para remover os pigmentos, principalmente a clorofila

presente nas folhas + ramos, permitindo uma melhor visualização no microscópio durante a contagem dos ovos e larvas do nematoide.

Foram preparadas soluções de 100 mg/mL dos extratos utilizando como solvente para diluição uma mistura de água deionizada e dimetilsulfóxido 5% (Figura 6).

Foto: João Oliano Neto



**Figura 6.** Diluições preparadas a partir dos extratos despigmentados das folhas + ramos para realização do ensaio biológico *in vitro*.

O teste de eclodibilidade dos ovos do *H. contortus* foi realizado seguindo metodologia de Coles et al. (1992) adaptado por Chagas (2008). Foi utilizada a cepa Echevarria 91, susceptível ao levamisol e albendazol (Echevarria et al., 1991), mantida em hospedeiros ovinos monitorados semanalmente quanto à infecção mono-específica.

Em placa de 24 poços foram adicionados 250 µL de água deionizada contendo aproximadamente 100 ovos e 250 µL da solução teste. Neste processo, a concentração inicial de cada amostra foi diluída pela metade, resultando em uma concentração final de 50mg/mL.

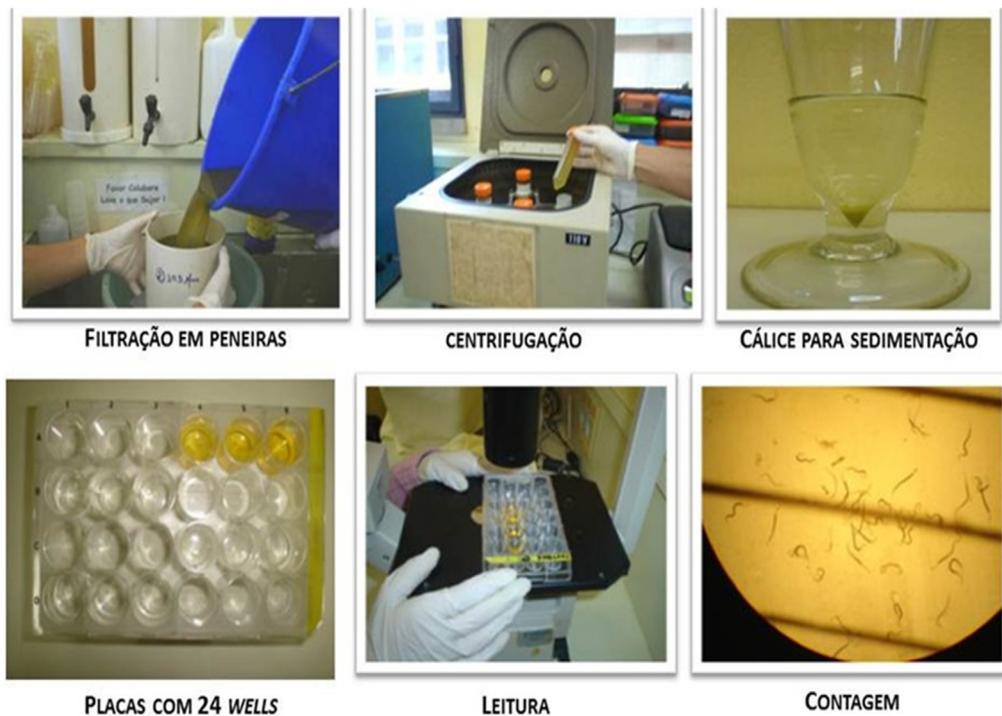
As placas foram mantidas em estufa (27°C ± 80% UR) por 24 horas. Ao final desse período, foi feita a contagem do número de larvas e ovos não eclodidos presentes em cada poço (Figura 7).

No bioensaio, a mistura de solventes utilizada para solubilizar os extratos (95:5 H<sub>2</sub>O:DMSO v/v) foi considerada como controle positivo e 100% de água deionizada como controle negativo. Todas as concentrações dos extratos e controles foram avaliadas em seis repetições (n=6).

A inibição da eclodibilidade foi expressa como média simples das repetições e calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ ovos não eclodidos}}{\text{N}^\circ \text{ ovos não eclodidos} + \text{N}^\circ \text{ de larvas}} \times 100$$

Fotos: Ana Carolina de Souza Chagas



**Figura 7.** Etapas da realização do ensaio de eclodibilidade dos ovos de *Haemonchus contortus* (Egg Hatch Test – EHT).

## Resultados e Discussão

O rendimento médio dos extratos preparados durante o período de seis meses foi de 6,48% para as folhas + ramos e 5,33% para as raízes, respectivamente. Os rendimentos dos extratos, durante o período do estudo, variaram entre 3,5 a 6,9% para as raízes e 5,7 a 8,8% para as folhas + ramos (Tabela 4). Em ambos os casos, o rendimento percentual dos extratos, em relação à massa úmida das amostras, esteve dentro da faixa normalmente observada para amostras vegetais.

Todos os extratos avaliados foram solubilizados em uma mistura de H<sub>2</sub>O: DMSO 95:5 v/v, sendo que essa mistura foi utilizada como controle positivo do ensaio e 100% de água constituiu o controle negativo.

Os testes realizados com os controles negativo e positivo apresentaram a mesma inibição de 0,46%, indicando que a mistura de solventes utilizada na solubilização dos extratos (H<sub>2</sub>O: DMSO 95:5 v/v)

não apresentou efeito inibitório relevante da eclosão dos ovos de *H. contortus* (Tabela 5).

Extratos vegetais são matrizes complexas em termos da composição de metabólitos secundários. A natureza das classes de compostos presentes em um extrato varia entre famílias botânicas distintas, entre gêneros pertencentes a uma mesma família e entre espécies de um mesmo gênero vegetal.

Desta forma, cada extrato demandará uma mistura específica de solventes para sua solubilização exigindo que, toda vez que um extrato vegetal for submetido a um ensaio biológico *in vitro*, também seja avaliado no organismo alvo o efeito do solvente ou mistura de solventes (controle positivo) utilizado na solubilização do mesmo.

Durante todo o período de crescimento vegetal analisado, isto é, dos 34 aos 183 dias, as folhas + ramos não apresentaram uma inibição relevante da eclosão dos ovos, variando entre 0,15% e 0,77% (Tabela 5), sendo muito próxima da inibição observada para ambos os controles.

**Tabela 4.** Rendimento de cada extrato (massa seca) levando em consideração a massa de amostra *in natura*.

Período após plantio	Matriz	Massa amostra <i>in natura</i> (g)	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
34 DIAS	Raízes	26,0	1,8	6,9
	Folhas + Ramos	236,0	13,5	5,7
60 DIAS	Raízes	156,0	9,0	5,8
	Folhas + Ramos	588,0	35,2	6,0
90 DIAS	Raízes	182,0	10,1	5,5
	Folhas + Ramos	512,0	32,4	6,3
120 DIAS	Raízes	348,0	19,2	5,5
	Folhas + Ramos	420,0	36,8	8,8
156 DIAS	Raízes	431,0	15,0	3,5
	Folhas + Ramos	446,0	28,1	6,3
183 DIAS	Raízes	308,0	14,8	4,8
	Folhas + Ramos	314,0	18,3	5,8

**Tabela 5.** Inibição (%) da eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* pelos extratos das folhas + ramos e raízes do gandu var. mandarim genótipo G<sub>3</sub> coletados em períodos distintos de crescimento pós plantio.

Período pós plantio (dias)	Folhas + Ramos	Média ± DP#	Raízes	Média ± DP#
34	0,00	0,77 ± 0,70	15,84	16,57 ± 1,29
	0,91		18,00	
	0,88		14,56	
	0,00		17,27	
	0,96		16,16	
	1,85		17,59	
60	0,00	0,19 ± 0,39	18,87	20,40 ± 1,20
	0,00		21,62	
	0,00		21,57	
	0,95		19,05	
	0,00		20,69	
	0,00		20,59	
90	0,00	0,45 ± 0,75	0,00	0,30 ± 0,73
	0,00		0,00	
	0,00		1,80	
	0,92		0,00	
	1,79		0,00	
	0,00		0,00	
120	0,00	0,30 ± 0,46	100,00	100,00 ± 0,00
	0,88		100,00	
	0,91		100,00	
	0,00		100,00	
	0,00		100,00	
	0,00		100,00	
156	0,00	0,32 ± 0,49	0,00	0,30 ± 0,46
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
	0,00		0,93	
	0,95		0,00	
	0,95		0,85	
183	0,88	0,15 ± 0,36	1,85	0,61 ± 0,75
	0,00		0,00	
	0,00		0,90	
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
	0,00		0,93	
H <sub>2</sub> O:DMSO 95:5 (v/v) (controle positivo)	<b>Replicatas</b>		<b>Média ± DP#</b>	
		0,93		0,46 ± 0,50
		0,91		
		0,90		
		0,00		
		0,00		
	0,00			
100% H <sub>2</sub> O (controle negativo)	<b>Replicatas</b>		<b>Média ± DP#</b>	
		0,91		0,46 ± 0,50
		0,93		
		0,93		
		0,00		
		0,00		
	0,00			

\*A concentração final dos extratos avaliada no ensaio in vitro foi de 50mg/mL.

#Média das replicatas ± desvio padrão (n=6).

Nos primeiros dois meses de crescimento, os extratos das raízes apresentaram uma pequena inibição da eclosão, variando de 16,57% no primeiro mês e 20,40% no segundo, respectivamente.

Porém, essa é uma taxa de inibição da eclosão baixa tendo em vista a elevada taxa de oviposição das fêmeas de *H. contortus*, não sendo promissora para controle da população parasitária *in vivo*.

Além disso, uma taxa de inibição tão baixa não justifica a execução do estudo fitoquímico buscando identificar os compostos presentes nesses extratos. As separações cromatográficas, envolvidas no isolamento dos diversos compostos presentes em um extrato complexo, são processos que consomem muito tempo e, juntamente com as técnicas de identificação espectroscópicas (p.ex: RMN, EM), são financeiramente dispendiosos.

Adicionalmente, metabólitos secundários tendem a ser produzidos em baixíssimas concentrações, isto é, na ordem de miligramas, de forma que somente um extrato concentrado com uma atividade *in vitro* muito expressiva torna-se um candidato viável para a prospecção fitoquímica.

Em geral, as raízes apresentaram baixa atividade durante o período estudado, com exceção do extrato obtido com 120 dias de crescimento vegetal, cuja inibição da eclosão dos ovos foi de 100% (Tabela 5).

Esta inibição de 100% da oviposição observada para o extrato das raízes, coincidiu com o período de floração do guandu no campo e formação inicial das vagens.

Isso “pode sugerir” que o período de floração e formação inicial das vagens venha acompanhado de alguma alteração fisiológico-metabólica da planta, levando à produção de algum(s) metabólito(s) secundário(s) nas raízes capaz(es) de promover a atividade antihelmíntica *in vitro* observada.

A inibição observada pode ser o resultado da produção sazonal de algum metabólito secundário como uma resposta da planta ligada a algum tipo de fator abiótico, como estresse hídrico, variação na incidência de luz solar, etc., ou mesmo biótico, como a alteração da rizosfera na qual as raízes se encontram.

Como as plantas testadas foram cultivadas no campo, o controle de fatores bióticos e abióticos, que podem gerar uma resposta metabólica sazonal, é difícil de ser realizado.

Uma alternativa para certificar-se de que a atividade do extrato das raízes com 120 dias de cultivo não é resultado de alterações metabólicas

induzidas por fatores estressores externos, mas sim uma resposta fisiológica natural da planta em função do seu estágio de desenvolvimento, seria repetir este experimento em casa de vegetação sob condições controladas de umidade, incidência de luz, ausência de insetos herbívoros.

Segundo Luo et. al. (2010), o cajanol é uma isoflavona encontrada nas raízes do guandu e possui atividade antiplasmodial, antifúngica e anticancerígena. Entretanto, não é possível afirmar que esta isoflavona seja o composto responsável pela atividade observada, uma vez que foi testada em micro-organismos sem qualquer semelhança com o nematoide *H. contortus*.

Somente o fracionamento biomonitorado da fração ativa permitirá o isolamento e caracterização espectroscópica do(s) composto(s) responsável(is) pela atividade biológica *in vitro*.

## Conclusões

- 1) A inibição da eclosão dos ovos de *H. contortus* observada *in vitro* para o extrato das raízes do guandu com 120 dias de crescimento indica que esse extrato pode apresentar em sua composição metabólitos secundários que venham a apresentar atividade antihelmíntica *in vivo*.
- 2) A busca por novos compostos na natureza com algum tipo de atividade biológica mostra-se promissora, tendo em vista que grande parte dos antiparasitários utilizados atualmente são de origem vegetal ou foram sintetizados a partir de compostos modelos (lead compounds) de origem natural.
- 3) Sendo assim, metabólitos secundários obtidos de plantas podem servir como modelos para a síntese de análogos farmacologicamente ativos, ou serem utilizados como antihelmínticos como compostos puros ou estarem presentes em extratos vegetais semipurificados.
- 4) Desta forma, a busca por novos métodos de controle de parasitas, que prejudicam de forma substancial o desenvolvimento da pecuária em larga escala, requer uma abordagem multidisciplinar, envolvendo distintas áreas do conhecimento científico.

## Referências

- ABBIW D. K. **Useful plants of Ghana: west africa uses of wild and cultivated plants**. London: Intermediate Technology Publications, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.3362/9781780443737>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- AJAIYEBOBA, E. O.; OGBOLE, O. O.; ABIODUN, O. O.; ASHIDI, J. S., HOUGHTON, P. J.; WRIGHT C. W. Cajachalcone: An antimalarial compound from *Cajanus cajan* leaf extract. **Journal of Parasitology Research**, v. 2013, article id 703781, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/703781>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- ALLONBY, E. W.; URQUHART, G. M. The epidemiology and pathogenic significance of haemonchosis in a merino flock in East Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 1, n. 2, p. 129-143, 1975. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(75\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0304-4017(75)90015-1). Acesso em: 27 maio 2025.
- BANDYOPADHYAY, S.; GUPTA, M.; MAJUMDAR, U. K. Anti-fertility activity of methanol extract of *Bassia latifolia* and *Cajanus cajan* in female albino mice ovaries. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 83-87, 2010. Disponível em: <https://ijpt.iuims.ac.ir/article-1-207-en.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- BASSETTO, C. C.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; LINS, J. G. G.; MARINHO-SILVA, N. M.; CHOCOBAR, M. L. E.; BELLO, H. J. S.; MENA, M. O.; NICIURA, S. C. M.; AMARANTE, A. F. T.; CHAGAS, A. C. S. Revisiting anthelmintic resistance in sheep flocks from São Paulo State, Brazil. **International Journal for Parasitology: drugs and drug resistance**, v. 24, n. 100527, p. 1-8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2024.100527>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- BESSA, N. G. F. de; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>. Acesso em: 27 maio 2025.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. de O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.006>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- CAMPBELL, W. C.; FISHER, M. H.; STAPLEY, E. O.; ALBERS-SCHÖNBERG, G.; JACOB, T. A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. **Science**, v. 221, n. 4613, p. 823-828, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.6308762>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- CARVALHO, M. A. C. de; ATHAYDE, M. L. F.; SORATTO, R. P.; ALVES, M. C.; ARF, O. Soja em sucessão a adubos verdes no sistema de plantio direto e convencional em solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1141-1148, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004001100013>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- CHAGAS, A. C. de S. Metodologias “in vitro” para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15.; SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCUSUL, 2., 2008, Curitiba. **Palestras...** Curitiba: CBPV, 2008. p. 8-12. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48559/1/AACMetodologiasinvitro.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U). Acesso em: 10 jun. 2025.
- DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYANT, Z. N.; ELAM, G.; Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, n. 108, p. 1512-1518, 1964.
- DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- DUKER-ESHUN, G.; JAROSZEWSKI, J. W.; ASOMANING, W. A.; OPPONG-BOACHIE, F.; CHRISTENSEN, S. B. Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 128-130, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.1375>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- ECHEVARRIA, F. M. A.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 39, n. 3-4, p. 279-284, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90044-V](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90044-V). Acesso em: 10 jun. 2025.

- EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; LE JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 12, p. 755-769, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>. Acesso em: 27 maio 2025.
- EZEIFEKA, G. O.; ORJI, M. U.; MBATA, T. I. & PATRICK, A. O. Antimicrobial activities of *Cajanus cajan*, *Garcinia kola* and *Xylopia aeethiopica* on pathogenic microorganisms. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 41-43, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/biotech.2004.41.43>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO MATO GROSSO DO SUL (FAMASUL.). **Boletim Casa Rural**: ovinocultura: economia e mercado. [Campo Grande, MS], n. 8, 2024. Disponível em: [https://portal.sistemafamasul.com.br/sites/default/files/boletimcasapdf/BOLETIM\\_OVINOCULTURA\\_ED8\\_AGOSTO24.pdf](https://portal.sistemafamasul.com.br/sites/default/files/boletimcasapdf/BOLETIM_OVINOCULTURA_ED8_AGOSTO24.pdf). Acesso em: 27 maio 2025.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400022>. Acesso em: 27 maio 2025.
- GARDIANO, C. G.; MURAMOTO, S. P.; KRZYZANOWISKI, A. A.; ALMEIDA, W. P. de; SAAB, O. J. G. A. Efeito de extratos aquosos vegetais sobre a multiplicação de *Rotylenchulus reiniformis*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 553-556, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p5532011>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. de S. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, v. 10, n. 2, p. 7-27, 1997. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/22121>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- GILL, J. H.; REDWIN, J. M.; VAN WYK, J. A.; LACEY, E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 21, n. 7, p. 771-776, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90144-V](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90144-V). Acesso em: 6 jun. 2025.
- HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 4. ed. London San Diego: Academic Press, 1993.
- HARVEY, A. L. Medicines from nature: Are natural products still relevant to drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 5, p. 196-198, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01346-2](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01346-2). Acesso em: 27 maio 2025.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso: 27 maio 2025.
- JALIWALA, Y. A.; MOHANTI, P. K.; JAIN, N. K. Antiulcer and anti-inflammatory activity of *Cajanus cajan* Linn. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 5, n. 4, p. 313-316, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.7897/2230-8407.050466>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- JASMER, D. P.; YAO, C.; REHMAN, A.; JOHNSON, S. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 81-90, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00169-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00169-3). Acesso em: 03 jun. 2025.
- KALFAS, S. Comparison of different methods for detection of urease activity in oral *Actinomyces* species. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 4, p. 190-192, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1987.tb00306.x>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- KUNDU, R.; DASGUPTA, S.; BISWAS, A.; BHATTACHARYA, A.; PAL, B. C.; BANDYOPADHYAY, D.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S. *Cajanus cajan* Linn. (Leguminosae) prevents alcohol-induced rat liver damage and augments cytoprotective function. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 440-447, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.010>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- LIU, W.; KONG, Y.; ZU, Y.; FU, Y.; LUO, M.; ZHANG, L.; LI, J. Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeonpea leaves and its medicinal product using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 28, p. 4723-4731, 2010b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.020>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- LIU, W.; ZU, Y.-G; FU, Y.-J; KONG, Y.; MA, W.; YANG, M.; LI, J.; WU, N. Variation in contents of phenolic compounds during growth and post-harvest storage of pigeonpea seedlings. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 732-739, 2010a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.023>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- LUO, M.; LIU, X.; ZU, Y.; FU, Y.; ZHANG, S.; YAO, L. & EFFERTH, T. *Cajanol*, a novel anticancer agent from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] roots, induces apoptosis in human breast cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 1, p. 151-160, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.009>. Acesso em: 9 jun. 2025.

- LUO, Q.-F.; SUN, L.; SI, J.-Y.; CHEN, D.-H. Hypocholesterolemic effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on diet-induced hypercholesterolemia in mice. **Phytomedicine**, v. 15, n. 11, p. 932-939, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.03.002>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- MELO, A. C. F. L. **Caracterização do nematóide de ovino *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis no Estado do Ceará, Brasil**. 2005. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) –Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.
- OKIGBO, R. N.; OMODAMIRO, O. D. Antimicrobial effect of leaf extracts of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) on some human pathogens. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 12, n. 1-2, p. 117-127, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1300/J044v12n01\\_11](https://doi.org/10.1300/J044v12n01_11). Acesso em: 9 jun. 2025.
- PADILHA, T. (ed.). **Controle dos nematódes gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996.
- PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 451-453, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1116364>. Acesso em: 27 maio 2025.
- PEREIRA, J. **O feijão guandu: uma opção para a agropecuária brasileira**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1985. (EMBRAPA-CPAC. Circular Técnica, 20). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/549433/1/cirtec20.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- PRICHARD, R. K. Anthelmintics for cattle. *The Veterinary Clinics of North America*. **Food Animal Practice**, v. 2, n. 2, p. 489-501, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31259-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31259-7). Acesso em: 6 jun. 2025.
- RAMALHO, L.; PAVOSKI, C.; BOSO, A. L. R.; LOURENÇO, F. J.; SIMONELLI, S. M.; BIM, F. L. Resistência do *Haemonchus contortus* e outros parasitas gastrointestinais ao levamisol closantel, emoxidectina em um rebanho no Nordeste do Paraná. In: MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CESUMAR, 4., 2008, Maringá, PR. **Anais...** Maringá, PR: Cesumar, 2008. Não paginado.
- RUAN, C.-J.; SI, J. Y.; ZHANG, L.; CHEN, D. H.; DU, G.-H.; SU, L. Protective effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on A $\beta$ 25-35-induced cognitive deficits in mice. **Neuroscience Letters**, v. 467, n. 2, p. 159-163, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.029>. Acesso em: 9 jun. 2025.
- SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 1-3, p. 89-109, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00425-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00425-3). Acesso em: 27 maio 2025.
- SANTOS, M. C.; SILVA, B. F.; AMARANTE, A. F. T. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 277-284, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.056>. Acesso em: 27 maio 2025.
- SANTOS, V. T. dos; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpes de *Haemonchus contortus* resistentes ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201-211, 1967.