

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Ageratum conyzoides*
L., PERTENCENTE À FAMÍLIA ASTERACEAE, EM CÉLULAS
INFECTADAS COM *Ehrlichia canis***

São Luís
2018

ANA KAROLINE SOUSA MENDES SIMAS

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Ageratum conyzoides*
L., PERTENCENTE À FAMÍLIA ASTERACEAE, EM CÉLULAS
INFECTADAS COM *Ehrlichia canis***

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação, Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

São Luis – MA
2018

Simas, Ana Karoline Sousa Mendes.

Avaliação do extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L., pertencente à família Asteraceae, em células infectadas com *Ehrlichia canis* / Ana Karoline Sousa Mendes Simas. – São Luís, 2018.

57f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo.

1. Erliquiose. 2. Extrato. 3. Análise fitoquímica. I. Título.

CDU 616-074:637.7

ANA KAROLINE SOUSA MENDES SIMAS

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Ageratum conyzoides*
L., PERTENCENTE À FAMÍLIA ASTERACEAE, EM CÉLULAS
INFECTADAS COM *Ehrlichia canis***

APROVADA EM __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo – UEMA
Orientador

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva - UEMA
1º Membro

Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves
2º Membro

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Zilda Brito, meu irmão George Amilcar, minha irmã Aline Brito e meu cunhado José Abas pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis durante essa jornada e toda a minha vida, tudo o que sou hoje é fruto da contribuição de cada um. À minha sogra Maurilene Simas e meu sogro Jairo Simas pelo grande apoio e incentivo para que buscasse sempre o melhor. Ao meu cunhado Gustavo Simas pela amizade e carinho.

Ao meu marido Fabiano Simas, pelo seu amor, carinho e paciência nos momentos em que eu estava estressada, triste ou decepcionada com algo durante o mestrado. À minha filha Alice Simas, por ser a razão da minha vida e por me fazer saber o verdadeiro significado da palavra amor.

À minha turma de mestrado MLK, que sem dúvidas foi a melhor de todas, por todo apoio, incentivos e brincadeiras, especialmente à minha amiga Jayanna Maia, pela amizade desde a graduação e que só veio a fortalecer ainda mais durante o mestrado.

À coordenação do curso de Mestrado em Ciência Animal, na pessoa da Prof. Dr. Alana Lislea, que apesar das dificuldades que a maioria das universidades têm enfrentado, sabe contornar essas situações e lutar para a cada dia melhorar ainda mais o nível do mestrado, tanto com a inserção de novos professores, auxílios financeiros para a realização das pesquisas e também pela cobrança constante, exigindo sempre o melhor de cada aluno e professor. A secretária do mestrado, Francisca, pela atenção e disponibilidade em nos ajudar a resolver os problemas.

À FAPEMA, pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo que me acolheu de braços abertos no grupo de pesquisa e no laboratório de Imunodiagnóstico Veterinário e acreditou na minha capacidade para realizar este trabalho, pelos conselhos e apoio.

Ao grupo de pesquisa em Imunodiagnóstico que a cada dia vem se consolidando na universidade e principalmente os amigos que são como irmãos, Cristian Aquino e Carla Rebouças que sempre estão dispostos a ajudar.

RESUMO

SIMAS, A. K. S. M. **AVALIAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Ageratum conyzoides* L., PERTENCENTE À FAMÍLIA ASTERACEAE, EM CÉLULAS INFECTADAS COM *Ehrlichia canis*.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2018.

Ehrlichia canis é um patógeno de grande importância na América Latina, com alta prevalência no Brasil, o tratamento da doença é feito apenas com um antibiótico do grupo das tetraciclina, a doxiciclina, pois não há alternativas eficazes. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar a ação do extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L. (família Asteraceae) em células DH82 infectadas com *Ehrlichia canis*. O método utilizado para a preparação do extrato foi de percolação e realizado análise cromatográfica por meio do HPLC para identificação dos metabólitos secundários presentes no extrato. O rendimento do extrato foi de 9,08%. A análise fitoquímica demonstrou a presença de três classes de compostos: ácidos fenólicos, flavonoides (agliconas e glicosídeos) e terpenos. A concentração capaz de reduzir significativamente a taxa de células infectadas com *E. canis* foi a de 500 µg/mL. Portanto, extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L. pode ser uma matriz de compostos promissora no combate à erliquiose canina.

Palavras chave: Erliquiose, extrato, análise fitoquímica.

ABSTRACT

SIMAS, A. K. S. M. **EVALUATION OF GROSS METHANOL EXTRACT OF *Ageratum conyzoides* L., CHARACTERIZED TO THE FAMILY ASTERACEAE, IN CELLS INFECTED WITH *Ehrlichia canis*.** 2018. Dissertation (Master in Animal Science) - State University of Maranhão, São Luis, 2018.

Ehrlichia canis is a pathogen of great importance in Latin America, with high prevalence in Brazil, the treatment of the disease is done only with an antibiotic of the tetracycline group, doxycycline, because there are no effective alternatives. The aim of this work was to verify the action of the crude methanolic extract of *Ageratum conyzoides* L. (family Asteraceae) on DH82 cells infected with *Ehrlichia canis*. The method used for the preparation of the extract was percolation and chromatographic analysis was performed by means of HPLC to identify the secondary metabolites present in the extract. The yield of the extract was 9.08%. Phytochemical analysis showed the presence of three classes of compounds: phenolic acids, flavonoids (aglycones and glycosides) and terpenes. The concentration which significantly reduced the rate of *E. canis* infected cells was 500 µg/ml. Therefore, raw methanolic extract of *A. conyzoides* L. may be a promising matrix of compounds in the fight against canine ehrlichiosis

Key words: Ehrlichiosis, extract, phytochemical analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1. Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas medicinais.....	20
Figura 1. <i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae).....	23
Figura 2. Partes aéreas da <i>Ageratum conyzoides</i> L. dispostas sobre a bancada para secagem a temperatura ambiente.....	34
Figura 3. Etapas de rotoevaporação, congelamento e liofilização do extrato metanólico bruto de <i>Ageratum conyzoides</i> L.....	36
Figura 4. Placa de 24 poços contendo meio de cultivo com células DH82 infectadas com <i>E. canis</i> e as diferentes concentrações do extrato metanólico bruto de <i>Ageratum conyzoides</i> L.....	38
Tabela 2 – Protocolo de medicamentos, contendo as concentrações do extrato metanólico bruto de <i>A. conyzoides</i> L., o número de repetições e o tempo de avaliação.....	39
Figura 5. Cromatograma ($\lambda=254$ nm) do extrato metanólico bruto de <i>Ageratum conyzoides</i> L. obtido em CLAE.....	42
Figura 6 – Taxa de infecção de células DH82 infectadas com <i>E. canis</i> após 18 e 36 horas, respectivamente, de tratamento com diferentes concentrações do extrato metanólico bruto de <i>A. conyzoides</i> L.....	44

Figura 7 – A: Fotomicrografia de células DH82 provenientes de monocamada inoculada com o isolado de Cuiabá, MT, apresentando mórulas (seta vermelha) de *Ehrlichia canis*, B: Fotomicrografia de Células DH82 provenientes de monocamada inoculada com o isolado de Cuiabá, MT, tratadas com o extrato de *Ageratum conyzoides* apresentando projeções citoplasmáticas (seta preta) e vacúolos indicando atividade fagocítica (seta branca); N: núcleo. Panótico rápido (Laborclin®); 100X.....46

Figura 8 – Taxa de inibição do microrganismo em diferentes concentrações do extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L.....47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

EMC – Erliquiose Monocítica Canina

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

ml - Mililitros

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPM – Rotação por Minuto

SUS – Sistema Único de Saúde

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

UFMT – Universidade Federal do Mato Grosso

µg - Microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Plantas Medicinais	16
2.2 Atividade Antimicrobiana e Metabólitos Secundários das Plantas Medicinais	18
2.3 Substâncias tóxicas das plantas	21
2.4 Família Asteraceae	21
2.5 <i>Ageratum conyzoides</i> L.	22
2.5.1 Características gerais	22
2.5.2 Características botânicas.....	22
2.5.3 Etnofarmacologia.....	24
2.5.4 Atividade farmacológica.....	24
2.6 Uso de Plantas Medicinais na Medicina Veterinária.....	26
2.7 Erliquiose Monocítica Canina (EMC).....	29
2.7.1 Etiologia.....	29
2.7.2 Ciclo biológico e transmissão.....	29
2.7.3 Epidemiologia.....	30
2.7.5 Sinais clínicos	31
2.7.6 Diagnóstico.....	32
2.7.7 Tratamento.....	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Coleta do material botânico e identificação da espécie	34
4.2 Preparação do extrato	34
4.3 Obtenção do Extrato Metanólico Bruto.....	35

4.4	Rendimento do extrato.....	36
4.5	Análise cromatográfica (CLAE ou HPLC)	36
4.6	Infecção <i>in vitro</i>	37
4.6.1	Micro-organismo	37
4.6.3	Cultivo celular	37
4.6.4	Doxiciclina.....	37
4.6.6	Protocolo dos Medicamentos.....	38
4.7	Análise Estatística.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Rendimento do extrato.....	40
5.2	Análise Fitoquímica.....	41
5.3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de <i>Ageratum conyzoides</i> L.	44
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Registros das mais antigas civilizações demonstram o uso de vegetais tanto como alimento quanto medicamento. Diversas formas de apresentação desses vegetais (chás, sucos, cataplasmas) têm sido utilizadas para o tratamento de enfermidades (ALMEIDA, 1993; GONÇALVES, 2010). Ainda em comunidades mais isoladas, em muitos grupos étnicos e em regiões mais pobres, as plantas medicinais possuem função de destaque por ser o único recurso terapêutico, apesar de seus constituintes químicos não serem totalmente conhecidos (MACIEL, 2002; BERTINI, 2005).

Mesmo com a maior diversidade vegetal do mundo, o Brasil ainda está um pouco atrasado nas pesquisas sobre produtos naturais, pois apenas 8% do total de espécies no país já foram estudadas (GONÇALVES, 2015).

Há alguns séculos as propriedades antimicrobianas de extratos de plantas e óleos essenciais têm sido reconhecidas de forma empírica. Porém em países com flora diversificada já existem vários estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas (JANSSEN et al., 1987; HOLETZ et al. 2002; ARAÚJO, 2010).

Entretanto a avaliação da atividade biológica de uma planta envolve aspectos relacionados à atividade farmacológica e toxicológica das substâncias isoladas, de frações obtidas ou de extratos totais da droga vegetal. Esse conhecimento da atividade biológica da planta é fator fundamental para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico (TOLEDO et al., 2003).

Com o surgimento de bactérias altamente resistentes, a pesquisa por extratos de plantas que exerçam alguma ação antimicrobiana oportuniza a elaboração de novos agentes contra infecções de difícil tratamento (ELOFF, 1998).

No mundo, o consumo exacerbado de antibióticos têm como resultado o desenvolvimento da resistência de algumas populações bacterianas, ocasionando problemas de saúde pública. A grande preocupação dos pesquisadores gira em torno do perigo ao retorno de uma era anterior aos antibióticos, pois apesar das pesquisas farmacêuticas terem avançado em grande escala ainda não foi descoberto nenhuma nova classe de antibióticos. Entretanto, quando se fala na eficácia de plantas medicinais, não existe um nível de inibição microbiana considerado padrão, sendo que alguns autores afirmam que esta eficácia seja comprovada apenas quando os resultados se igualam aos dos antibióticos já conhecidos (DUARTE, 2006; GONÇALVES, 2010).

As plantas apresentam-se como ótimas fontes de substâncias fitoquímicas com grande atividade biológica, além disso, são totalmente biodegradáveis e renováveis (TANIGUCHI & KUBO, 1993).

Ao longo dos anos houve aumento da utilização de plantas medicinais, principalmente pelo surgimento de terapias alternativas e naturais que na maioria das vezes são mais acessíveis a grande parcela da população que não possui recurso financeiro para tratamento de enfermidades. Entretanto pouco se sabe sobre os constituintes químicos das plantas que exercem algum efeito terapêutico.

Na Medicina Veterinária têm-se observado grandes avanços em relação à utilização dessas plantas, sobretudo em doenças que se manifestam nos animais de companhia. *Ehrlichia canis* é um patógeno de grande importância na América Latina, com alta prevalência da doença no Brasil e o tratamento de eleição é realizado apenas com um antibiótico do grupo das tetraciclina, a doxiciclina, e não há alternativas eficazes para o tratamento desta doença. Ademais, alguns animais não respondem positivamente ao tratamento com a doxiciclina, permanecendo infectados por um longo período e sem conseguir eliminar o micro-organismo.

A grande maioria dos animais acabam desenvolvendo a fase crônica da doença justamente por não conseguir debelar o patógeno ou ainda devido à questão da resistência microbiana desenvolvida pelo uso indiscriminado da doxiciclina.

Dessa forma, é de extrema importância o estudo de plantas medicinais no combate às doenças, sendo objeto do trabalho a espécie vegetal *Ageratum conyzoides* L. (família Asteraceae) que possui grande atividade antimicrobiana já descrita na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O uso de plantas com poder curativo é tão remoto quanto o surgimento da espécie humana. As civilizações mais antigas já observavam que algumas plantas possuíam princípios ativos capazes de combater enfermidades (BADKE et al., 2011). Apesar dos avanços na medicina moderna, grande parte da população dos países em desenvolvimento utiliza a medicina tradicional nos seus cuidados básicos de saúde, especificamente as plantas e suas preparações. Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) expressou sua posição, por meio de comunicados e resoluções, em relação a necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário (BRASIL, 2006 - 2012).

A utilização de plantas medicinais no Brasil já era bem difundida pelos indígenas antes da chegada dos portugueses. Com o passar do tempo os colonizadores incorporaram em sua farmacopeia a medicina indígena, utilizando produtos da biodiversidade brasileira. Uma grande parcela dos medicamentos atuais é derivada de plantas medicinais devido à aplicação de tecnologias aliada ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012).

Inúmeras plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional chinesa ou índia vem sendo inseridas no cotidiano dos povos ocidentais, sendo sua comercialização sustentada em propagandas radicalistas em que a “cura” é alcançada simplesmente por se tratar de algo vindo da natureza. Contudo, as propriedades farmacológicas anunciadas não possuem uma validade por não terem passado por investigações sérias ou por ensaios pré-clínicos e clínicos (VEIGA Jr et al., 2005).

Dessa forma, a falta de investigações e pesquisas científicas mais apuradas que identifiquem as propriedades antibióticas das plantas é uma realidade que compromete seu uso no tratamento de doenças (DUARTE, 2006).

A busca por compostos terapêuticos alternativos obtidos por meio de plantas medicinais é uma necessidade, principalmente para aquele grupo de indivíduos imunocomprometidos. Os estudos realizados surgem então, por conta da demanda dispensada para a elaboração de medicamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, sendo observado, portanto, a grande importância das plantas no cotidiano

humano, pelo espaço que vêm ganhando em casas especializadas e farmácias (BERTINI et al., 2005).

Nesse contexto, a fitoterapia busca normalizar as funções fisiológicas através do poder da natureza, reconectando homem com o ambiente para promover um equilíbrio (FRANÇA et al., 2008).

De acordo com a RDC nº17 de 24 de fevereiro de 2000, entende-se por fitoterápico o medicamento *“obtido por processos tecnologicamente adequados, empregados e exclusivamente matérias primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.”*. Além disso, estes produtos podem conter excipientes (BRASIL, 2000).

Fitofármacos também são originados de matéria prima vegetal, porém são exclusivamente substâncias com alguma atividade farmacológica, podendo ter aplicação terapêutica, como exemplo a pilocarpina que é extraída do jaborandi e é utilizada no tratamento de glaucoma (SIMÕES, 2004).

Os investimentos na preparação de farmacopeias com a descrição sobre a ação das plantas ou partes delas no preparo de fitoterápicos, é de extrema importância, uma vez que deve ser aliado o conhecimento científico já existente sobre as espécies vegetais e a família a que pertencem, ao desenvolvimento de técnicas adequadas de preparações dos compostos fitoterápicos (TOLEDO et al., 2003).

A partir dos avanços nas pesquisas houve a necessidade de regulamentar e informar o adequado uso de plantas medicinais pela população. Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, de 10 de março de 2010 padronizou alegações terapêuticas indicando a forma de uso, quantidade a ser ingerida e as restrições no uso de acordo com as informações tradicionais existentes. Desse modo as plantas medicinais passaram a ser consideradas drogas vegetais e são regulamentadas na ANVISA (BRASIL, 2012).

A Lei 5.991/1973 regulamenta o comércio de plantas medicinais, no qual dispõe sobre a venda devendo ser feita apenas em farmácias e ervanarias, porém não determina os critérios de qualidade e eficácia da planta. Portanto, não podem ser vendidas como medicamento (BRASIL, 1973; BRASIL, 2012).

A qualidade de produtos fitoterápicos ainda apresenta uma lacuna, pois pouco se sabe em quais áreas essas plantas são cultivadas e o manejo empregado, além dos

aspectos físico-químicos e microbiológicos dos produtos tanto intermediários quanto finais. Essa questão da qualidade está intimamente relacionada com os aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e de pureza do material vegetal (TOLEDO et al., 2003).

No Brasil existem dois instrumentos norteadores para o desenvolvimento de programas com plantas medicinais: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), com diretrizes e linhas de ação para “Plantas Medicinais e Fitoterapia no SUS”, e a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, com abrangência da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos. Ambas tiveram como base as recomendações da OMS, a demanda da população brasileira, as diretrizes que regem o programa SUS e a potencialidade que o país possui para o melhoramento e desenvolvimento do setor de medicina tradicional/alternativa (BRASIL, 2012).

2.2 Atividade Antimicrobiana e Metabólitos Secundários das Plantas Medicinais

No Brasil muitas plantas de biomas como o Cerrado e Mata Atlântica são utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas e bacterianas e também para doenças tropicais como a leishmaniose, que possui altos índices de casos tanto em animais quanto em humanos no país. Porém relatos de pesquisas demonstrando a eficácia na utilização dessas plantas ainda são bastante restritos e geralmente apresentados em eventos regionais, o que dificulta a disseminação dos resultados das pesquisas (DUARTE, 2006).

Ushimaru et al. (2007) demonstraram que as propriedades antimicrobianas das plantas não estão relacionadas com o peso seco do extrato e sim com a associação química dos princípios ativos.

Ao longo dos anos as plantas desenvolveram suas próprias defesas químicas contra patógenos e herbívoros, razão pela qual há essa imensa complexidade na sua constituição química, sintetizando substâncias que vão agir em alvos específicos de seus predadores (FERREIRA & PINTO, 2010).

Existem dois grupos de compostos produzidos pelas plantas, o primeiro denomina-se de metabólitos primários, que são substâncias essenciais à vida de todos os

vegetais, são eles os carboidratos, aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos. O segundo grupo são os metabólitos secundários, responsáveis pela defesa química contra o estresse do ambiente, pela atração de polinizadores e pela preservação da integridade das plantas, são eles: compostos fenólicos, terpenoides, óleos essenciais, alcaloides. Esses compostos são os responsáveis pelos efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas (Di STASI, 1995; LÓPEZ, 2006, GONÇALVES, 2010).

A distribuição dos metabólitos secundários é resultado de um balanço entre produção e eliminação por todo o crescimento da planta. A ação desse variado número de componentes ativos é um grande desafio para a indústria, pois seus extratos ou princípios ativos podem apresentar efeitos sinérgicos. Portanto, é necessário um estudo detalhado da atividade biológica de extratos e óleos essenciais (LÓPEZ, 2006).

A maior parte dos princípios ativos das plantas não é totalmente conhecida, porém, ainda pode apresentar atividade antimicrobiana sem que tenha efeito tóxico para quem a utiliza. Os metabólitos secundários servem para modular o metabolismo da planta e também possuem ação de alcançar alvos terapêuticos nas enfermidades humanas e animais (GONÇALVES, 2010; FERREIRA & PINTO, 2010). Diferentes grupos de metabólitos existem e alguns estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características de alguns grupos de princípios ativos e propriedades medicinais e/ou tóxicas em plantas medicinais

PINCÍPIO ATIVO	PROPRIEDADES MEDICINAIS E/OU TÓXICAS
Alcaloides	Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésico. Alguns cancerígenos e outros antitumorais.
Mucilagens	Cicatrizante, anti-inflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmódico
Flavonoides	Anti-inflamatório, antiesclerótico, fortalece os vasos capilares, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, colerético e antimicrobiano
Taninos	Adstringente e antimicrobianos.
Terpenos	Antisséptico, anti-inflamatório, antipirético,

Adaptada de Lorenzi & Matos (2002).

Vários são os fatores que interferem na produção de metabólitos secundários, desde as variações decorrentes do desenvolvimento foliar ou surgimento de novos órgãos na planta, podendo resultar em uma menor concentração de metabólitos. Alguns fatores agem relacionados entre si na influência dessa produção, como por exemplo, a sazonalidade e o índice pluviométrico. Ademais existem fatores que são intrínsecos a planta (genéticos) e extrínsecos, como variações de solo, água e luminosidade (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

2.3 Substâncias tóxicas das plantas

A descoberta de plantas medicinais advém dos estudos botânicos e farmacológicos, os quais mostram os princípios ativos e seus efeitos terapêuticos. Entretanto, em grande parte das plantas existem substâncias tóxicas que podem representar um risco tanto para pessoas quanto para animais. Esse fator limitante no uso das plantas medicinais está intimamente relacionado com a utilização, o modo de preparo e o tempo de tratamento. Assim, é de suma importância o estudo toxicológico para determinar as possíveis interações com outros medicamentos, as doses terapêuticas e tóxicas (SANTOS & ALMEIDA, 2016).

A relação dose/efeito/resposta é de extrema importância na avaliação da atividade biológica causadas por extratos vegetais, principalmente quando se refere à utilização desses extratos na saúde humana. Apesar de existirem métodos quantitativos para medir a toxicidade dos extratos, na maioria das vezes esses não são tão conclusivos (SANTOS & ALMEIDA, 2016).

2.4 Família Asteraceae

A família Asteraceae ou Compositae apresenta-se disseminada por todos os continentes, excetuando-se a Antártica, sendo mais facilmente encontrada nas regiões temperadas, em áreas de climas tropicais e subtropicais. No Brasil, possui grande representatividade, porém os trabalhos publicados acerca dessa família não trazem chaves diagnósticas e descrições, tornando-a ainda mais complexa quando da sua classificação (ROQUE & BAUTISTA, 2008).

Plantas da família Asteraceae são ervas anuais e têm como característica caule cilíndrico, folhas em roseta, inflorescência em capítulo, geralmente terrestres, são raras as aquáticas, capítulo formado de flores sésses (ROQUE & BAUTISTA, 2008).

Possui aproximadamente 1.600 gêneros, sendo que no país são reconhecidos apenas 300 destes gêneros e 2000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005; GONÇALVES, 2010). Não são muito utilizadas na alimentação, tendo como funções mais importantes a medicinal e ornamental, possuem ainda atividade toxicológica e alergênica (GONÇALVES, 2010).

Almeida et al. (2005) encontraram no Cerrado espécies da família Asteraceae jamais registradas nos estudos publicados e afirmam que há uma grande dificuldade nessa identificação, pois é uma família de taxonomia difícil.

Um estudo realizado em uma comunidade da região semiárida do Piauí demonstrou que a família Asteraceae apresenta grande importância socioeconômica e de sobrevivência, evidenciado pelo uso das plantas, por parte dos moradores, para o tratamento de sintomas relacionados ao sistema digestório e respiratório (SILVA et al., 2014). Essas plantas apresentam várias classes de metabólitos secundários, como sesquiterpenos, monoterpenos, alcaloides e flavanoides. Possui ação medicinal no tratamento de afecções dermatológicas e digestivas e têm comprovada ação analgésica e antiinflamatória (GONÇALVES, 2010).

2.5 *Ageratum conyzoides* L.

2.5.1 Características gerais

A. conyzoides L. é uma planta herbácea anual, com distribuição em áreas subtropicais e tropicais, cresce bem em qualquer solo, sendo considerada daninha, com odor peculiar semelhante ao de cabra, tendo nome popular de “catinga de bode”, pode também ser conhecida como: mentrasto, erva-de-são-joão, picão-roxo, erva-de-santa-lúcia. A espécie possui uma grande variação morfológica e parece altamente adaptável a diferentes condições ecológicas. (OKUNADE, 2002).

2.5.2 Características botânicas

Apesar de o gênero *Ageratum* conter aproximadamente 30 espécies, somente algumas delas têm sido investigadas fitoquimicamente, destacando-se a espécie *Ageratum conyzoides* L., pois apresenta vários efeitos terapêuticos, entre eles o de laxante, antipirético e cicatrizante (OKUNADE, 2002; NOGUEIRA, 2009).

A. conyzoides L. apresenta caule ereto de coloração verde ou castanha com pelos brancos, folhas pecioladas, simples ovaladas com margem ondulada. Folhas são

opostas, longo-pecioladas, ovoides e ásperas, com até 7,5 cm de comprimento. A planta possui aproximadamente um metro de altura. Inflorescência do tipo capítulo, eixo principal da inflorescência bastante desenvolvido. Cada capítulo é rodeado por brácteas verdes e contém numerosas flores, cujo cálice é substituído por pelos e a corola apresenta-se tubulosa, de coloração arroxeada ou lilás. Sua propagação ocorre por meio de sementes. É um importante recurso alimentar para abelhas e as partes da planta são utilizadas na medicina popular e também possui ação repelente (MOREIRA & BRAGANÇA, 2011; ALMEIDA, 2015).

Segundo Malheiros (2012), *A. conyzoides* L. apresenta características morfológicas que podem confundi-la com outra espécie do gênero, a *Ageratum fastigiatum*, porém deve-se observar a diferença morfológica na folha de *A. conyzoides* L., pois esta se apresenta de forma oposta cruzada, oval a deltoide, divergindo da folha de *A. fastigiatum* que tem formato lanceolado.



Figura 1 – Exemplar de *Ageratum conyzoides* L., da família Asteraceae colhida em junho de 2017 no campus central da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

Fonte: Próprio autor

2.5.3 Etnofarmacologia

Em regiões da África, a *A. conyzoides* L. é utilizada no tratamento de doenças mentais e infecciosas, apresenta relatos de uso também em pacientes com pneumonia, doenças da pele e feridas, bem como para diarreias. Possui ainda ação antiasmática, antiespasmódico. No Brasil, têm sido muito utilizada em forma de chá, como anti-inflamatório e analgésico. Também possui relato de atividade nematocida (OKUNADE, 2002).

Em levantamento etnobotânico realizado por Barboza da Silva et al. (2012) em uma comunidade quilombola na Bahia, foi constatado que diversas espécies de plantas medicinais encontram-se presentes no uso cotidiano de tratamento de enfermidades por parte dos moradores da região, dando destaque para espécies pertencentes a família Asteraceae, especificamente a *A. conyzoides* L., relatada para uso contra dores no corpo, gripe e problemas oftalmológicos, preparada a partir de suas partes aéreas, raiz, folha e inflorescências em forma de infusão, decocção e usadas em bochechos, chás ou gargarejo.

Na região do Jalapão no Tocantins têm sido utilizada na forma de infusão, preparada a partir das partes aéreas, para tratar febre, gripes, dores no estômago, doenças cardíacas e hepáticas, indicada pela comunidade como potente analgésico (COELHO et al., 2005).

2.5.4 Atividade farmacológica

A. conyzoides L. apresenta ação inseticida comprovada pelos estudos que isolaram e avaliaram os compostos nela presentes (MOREIRA et al., 2007). Na agricultura destaca-se seu uso pela propriedade inseticida, porém vários estudos foram realizados mostrando que a planta possui um forte potencial no controle de fungos, e também foi demonstrado uma nova atividade biológica no que se refere a capacidade de inibir a produção de aflatoxinas, contudo, o mecanismo ainda é desconhecido. Outra atividade verificada foi no controle de mosquitos *Anopheles* spp., *Aedes aegypti* e *Culex* spp., podendo servir para prevenir perdas em saúde pública causadas por doenças como a malária, dengue, filariose e leishmaniose (OKUNADE, 2002; SINGH et al., 2013).

Já foi demonstrado também potencial antimalárico do extrato aquoso das folhas de *A. conyzoides* L. atuando como adjuvante associada a cloroquina, podendo ser uma alternativa promissora no controle estratégico da malária, principalmente em países em desenvolvimento, que apresentam grandes barreiras para o acesso aos medicamentos. Entretanto, mais investigações devem ser realizadas para elucidar o verdadeiro mecanismo de ação da *A. conyzoides* L. (UKWE et al., 2010).

O extrato metanólico foliar de *A. conyzoides* L. tem sido utilizado no tratamento de dor crônica, ação curativa de feridas. Seu extrato aquoso também tem sido relatado para evitar a coagulação. O extrato metanólico apresenta atividade antimicrobiana (OKUNADE, 2002).

O óleo essencial também é alvo de investigações, principalmente pela sua ação em bactérias Gram-positivas Gram-negativas, além do seu poder de inibição do crescimento de fungos filamentosos e leveduras. Existe uma gama de atividades farmacológicas das classes de metabólitos secundários presentes nessa planta, entre elas, o stigmasterol, que apresenta atividade anti-inflamatória e os flavonoides com ação no sistema vascular central, antiviral e espasmolítica (OKUNADE, 2002; ESCOBAR, 2007).

Apesar de serem necessários mais estudos para estabelecer o uso e a eficácia de *A. conyzoides* L., o extrato etanólico e a solução aquosa possui intensa atividade anti-helmíntica, contudo o isolamento dos princípios ativos responsáveis por essa ação é de extrema importância (PONÉ et al., 2011).

Já foi verificado também que o extrato de todas as partes da planta *Ageratum conyzoides* L. foi capaz de reduzir a produção de oocistos em aves infectadas e que após 18 dias de tratamento todos os oocistos foram eliminados, o que demonstra a potencial atividade anticoccidial do extrato, podendo ser desenvolvido um produto fitoterápico a partir do extrato de *A. conyzoides* L. para o tratamento da coccidiose em aves. (MOURA et al., 2005).

Porém estudos em relação a toxicidade devem ser feitos, como o de Diallo e colaboradores (2014), no qual mostrou que o extrato hidroalcolico de *A. conyzoides* L. pode ser tóxico para o fígado humano, células renais e sanguíneas após longo período de administração, e que essa toxicidade pode estar relacionada com a presença de alcaloides, especialmente o alcaloide pirrolizidínico.

Em estudo realizado no Piauí por Arcanjo et al. (2012) avaliando a bioatividade de extratos etanólicos de sete plantas medicinais popularmente utilizadas pelo povo brasileiro, observaram que o extrato etanólico da *Ageratum conyzoides* L. induziu importante atividade biológica contra *Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo marinho utilizado para verificar compostos bioativos de extratos de plantas.

2.6 Uso de Plantas Medicinais na Medicina Veterinária

A busca por medicamentos fitoterápicos na medicina veterinária vem aumentando gradativamente pois os fármacos de um modo geral podem causar efeitos colaterais indesejáveis e são de um custo elevado. Entretanto, deve-se entender que os fitoterápicos também são medicamentos, portanto só podem ser utilizados com a prescrição do médico veterinário (MARINHO et al., 2007).

Ainda que esta busca tenha aumentado, a fitoterapia é um campo não muito explorado na medicina veterinária, principalmente porque as pessoas acreditam que o tratamento com uso de plantas medicinais se restringe a elaboração de chás a partir das folhas, muitas vezes utilizam partes das plantas que não possuem o princípio ativo ou em quantidades insuficientes ou exacerbadas, podendo causar efeitos adicionais indesejáveis ou nenhuma das ações terapêuticas esperadas (OZAKI & DUARTE, 2006).

Na literatura já é relatado a resistência de parasitas, principalmente de helmintos a medicamentos bastante utilizados no tratamento de parasitoses dos animais, por isso em muitas comunidades rurais é comum o uso de plantas medicinais com ação anti-helmíntica, anti-inflamatória e repelente (VIANNA et al., 2016).

Marinho et al. (2007) citam que 61 plantas medicinais com diversas indicações terapêuticas são usadas no tratamento de doenças de animais no município de Patos na Paraíba, sendo destaque a Babosa e o Cajueiro, e que as partes utilizadas para a preparação do fitoterápico variam de acordo com a planta utilizada, podendo ser administrada no animal por via oral ou tópica. Além disso, outro resultado importante é que 100% dos entrevistados na pesquisa aceitariam a prescrição de medicamentos fitoterápicos pelos médicos veterinários.

Em estudo realizado por Diaz e colaboradores (2010) avaliando a eficácia de extratos de plantas em casos de mastite bovina, verificaram que quatro dos 37 extratos utilizados foram capazes de inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*. Porém, os autores chamam atenção para a complexidade de compostos existentes nesses extratos, que podem agir de forma sinérgica, sendo responsáveis pela atividade biológica desejada e ainda reforçam a necessidade de identificação de cada composto.

Bahmani et al. (2015) enfatizam a eficácia das plantas como agentes seguros para o tratamento de leishmaniose, colocando em questão as desvantagens oferecidas pelos medicamentos disponíveis no mercado, como o alto custo e os efeitos colaterais produzidos. Porém é de suma importância a comprovação da segurança farmacológica desses extratos obtidos a partir de plantas medicinais.

Além da atividade do extrato de algumas plantas, têm-se verificado também a existência de atividade de óleos essenciais, como do óleo de *Carapa guianensis* (andiroba), que apresentou atividade acaricida *in vitro* sobre fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, no qual 100% das teleóginas morreram, sugerindo o grande potencial dessa planta como fitoterápico no controle de carrapatos que acometem bovinos (FARIAS et al., 2007).

Viegi et al. (2003) observaram que o maior número de plantas medicinais utilizadas em medicina veterinária pertenciam à família Asteraceae (11%), seguida por Lamiaceae (7,1%), Ranunculaceae (5,2%), Fabaceae, Apiaceae e Rosaceae (4,9% cada), Liliaceae (4,5%), Poaceae (4,1%) e Euphorbiaceae (3,4%). Sendo a maioria das espécies comuns, cultivadas ou plantas consideradas ervas daninhas, e dentre as partes utilizadas destacam-se as folhas, partes aéreas, raízes, plantas inteiras e frutas, com menor frequência são utilizados os ramos, cascas, bulbos, rizomas, tubérculos, sementes e flores. A forma mais comumente administrada eram decocções ou apenas o líquido em que as plantas eram mergulhadas, destinadas para o tratamento de distúrbios do trato digestivo, pele, doenças respiratórias, feridas e inflamações, para as mais variadas espécies animais, como coelhos, cães, cavalos, aves, porcos, entre outros.

As plantas medicinais são utilizadas em Medicina Veterinária em Montseny na Catalunha, com destaque para as pertencentes à família Asteraceae. Os medicamentos são preparados a partir das folhas, estruturas florais, frutos e inflorescências com a finalidade de tratar problemas intestinais e/ou dermatológicos de cavalos, ovelhas, porcos e gado (BONET & VALLÈS, 2007).

Além da ação repelente, anti-inflamatória e anti-helmíntica já relatada em vários estudos com plantas medicinais, têm-se observado também ação antifúngica, como apresentado em um levantamento, no qual 428 extratos vegetais apresentaram ação contra *Candida* spp., com maior representatividade a família Asteraceae. Contudo, nesses estudos a maioria dos isolados do micro-organismo era proveniente de casos clínicos humanos ou cepas padrões de laboratório, poucos eram isolados de animais, o que torna necessário intensificar os estudos nessa área. Tanto as frações quanto os extratos etanólicos, diclorometânicos, aquosos e metanólicos apresentaram alguma atividade. Entretanto há de se considerar que as diferenças em relação à atividade dos extratos envolvem aspectos como o método de avaliação, tipo de extrato, parte vegetal e procedência dos isolados fúngicos (GIORDANI et al., 2015).

De uma lista de plantas utilizadas por comunidades rurais, a maioria era destinada para a preparação de medicamentos para doenças de animais, sendo cerca de metade para uso em ruminantes, a *Passiflora foetida* L. foi relatada para prevenir doenças em aves, as doses dependiam da idade ou tamanho do animal. Logo, o conhecimento botânico é fundamental para a identificação correta das plantas, evitando erros de coleta e para que se tenha a finalidade terapêutica desejada. (KONÉ & ATINDEHOU, 2008).

Em estudo realizado com plantas no bioma da Caatinga, observou-se que grande parte dos extratos avaliados apresentaram atividade antimicrobiana frente a agentes patogênicos de animais, como a *Escherichia. coli* e *Corynebacterium* spp. No entanto não foram realizados análises fitoquímicas para verificar a possível classe de compostos ativos responsáveis por essa ação antimicrobiana. Outro ponto importante e que abre uma gama de possibilidades de pesquisa com plantas medicinais é o estudo da atividade *in vivo* (De Sá et al., 2011).

2.7 Erliquiose Monocítica Canina (EMC)

2.7.1 Etiologia

Conhecida como pancitopenia canina tropical, tifo canino ou febre hemorrágica canina, a Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença causada por bactérias estritamente intracelulares, Gram-negativas, pertencentes à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia* e espécie *Ehrlichia canis* (DUMLER et al., 2001; COSTA, 2011; SILVA, 2015).

Uma nova organização dos gêneros nas famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae foi proposta por Dumler et al. (2001), onde as tribos Ehrlichiae e Wolbachiae acabaram sendo transferidos para a família Anaplasmataceae, que compreende agora três gêneros *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Anaplasma*.

Com essa nova organização, cinco espécies de bactérias pertencem ao gênero *Ehrlichia*: *Ehrlichia canis*, *E. chaffensis*, *E. ewigii*, *E. muris* e *E. ruminantium*. Essas bactérias são parasitas obrigatórios de células hematopoiéticas, maduras ou imaturas, principalmente do sistema fagocítico mononuclear, como monócitos e macrófagos e também em neutrófilos para algumas espécies (DUMLER et al, 2001; AGUIAR, 2007).

E. canis possui forma de cocobacilos e se multiplicam por divisão binária, sendo de pequeno tamanho, medindo aproximadamente 0,2 a 0,4 µm de diâmetro (SILVA, 2001; SILVA, 2015).

2.7.2 Ciclo biológico e transmissão

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* está distribuído em todo o território nacional e é o principal vetor da erliquiose canina. No momento do repasto sanguíneo, o carrapato infectado transmite *E. canis*, o que favorece a manutenção da doença no país.. Além disso, a transmissão de *E. canis* também pode ocorrer por transfusões sanguíneas de um cão infectado para outro suscetível. No vetor só ocorre a transmissão transtadiária e não há transmissão transovariana, portanto o cão torna-se o principal reservatório da doença (AGUIAR, 2006).

No cão, *E. canis* invade predominantemente os leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos), onde se replicam por divisão binária. O micro-organismo se localiza no citoplasma celular e se reproduz no interior de fagossomos na forma de corpúsculos iniciais. Os corpúsculos iniciais são unidades do micro-organismo que se unem para formar a mórula (ALMOSNY & MASSARD, 2002; COSTA, 2011).

Todas as espécies de *Ehrlichia* apresentam a forma de mórula, que são estruturas intracitoplasmáticas, ovoides ou alongadas, envolta por uma membrana limitada por membrana trilaminar, contendo inúmeros corpúsculos elementares, estes medindo de 0,2 a 0,6 μm x 1,2 a 1,5 μm de diâmetro, já na fase de mórula medem aproximadamente 2,5 a 3 μm x 3 a 6 μm de diâmetro (ACETTA, 2008).

2.7.3 Epidemiologia

Melo et al. (2011) verificaram que 227 cães foram detectados com anticorpos anti-*Ehrlichia* spp., sendo 119 destes de áreas consideradas urbanas, mostrando que todos os bairros urbanos analisados no trabalho tinham cães reativos e que 84% das fazendas apresentaram também cães reativos. A variação dos títulos de anticorpos anti-*Ehrlichia* ficou entre 40 a 81.920 em animais da área urbana e entre 40 e 327,680 nos cães da área rural.

Apesar de ser uma doença com distribuição mundial, têm-se observado altos índices de prevalência em regiões tropicais e subtropicais, podendo ser influenciado pelo clima que favorece ou não a presença do vetor ou ainda pelo modo de vida dos animais (LITTLE, 2010). No Brasil, é uma doença diagnosticada com frequência nos hospitais e clínicas veterinárias, com prevalência que pode variar de 10 a 50% (DAGNONE et al., 2003; AGUIAR et al., 2007).

Recentemente estudos de detecção sorológica e/ou molecular reportaram a infecção de gatos com *E. canis*, como o de Braga et al. (2014), no qual 20 animais foram positivos para *Ehrlichia* spp. na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo a sequência idêntica à cepa de *E. canis* Uberlandia (GU586135) e *E. canis* Jake (CP000107), já nos testes sorológicos, 88 animais foram positivos resultando em uma soroprevalência de 41,5%. Em outro trabalho, Fontalvo et al. (2016)

encontraram uma soroprevalência de 35,6%. No Estado do Maranhão, Oliveira Braga e colaboradores (2012) verificaram que 11 gatos foram soropositivos para *E. canis* no teste de imunofluorescência indireta, confirmando a infecção em gatos nesse estado. Entretanto, o papel dos felinos no ciclo epidemiológico da erliquiose ainda é desconhecido.

2.7.5 Sinais clínicos

As manifestações clínicas da erliquiose canina podem ser divididas em três fases: aguda, subclínica e crônica. Apesar de existirem inúmeros estudos, muitas são as divergências encontradas no que diz respeito à sintomatologia dos animais e as alterações laboratoriais encontradas, o que sugere que possa haver cepas diferentes circulando no Brasil (ACETTA, 2008).

Em estudo feito por Aguiar (2013), verificou-se algumas alterações clínicas e laboratoriais em animais positivos para EMC, como por exemplo: trombocitopenia (100%), inapetência (86,66%), apatia (66,66%), mucosas hipocoradas (26,66%), leucocitose (23,33%), emaciação (23,33%), eosinofilia (23,33%), leucocitose (23,33%), linfocitopenia (20%), anemia normocítica normocrômica (16,66%), febre (16,66%), linfocitose (13,33%), melena (13,33%), conjuntivite (13,33%), vômitos (13,33%), anemia microcítica hipocrômica (10%), eosinopenia (10%), tosse (10%), diarreia (10%), hematoquezia (6,66%), otite (6,66%), neutropenia (3,33%), neutrofilia (3,33%), monocitose (3,33%).

Segundo Silva (2010), os sinais clínicos observados em cães 14 dias pós inoculação do agente etiológico da ehrlichiose canina foram: febre, petequias nas mucosas, linfadenomegalia, anorexia, esplenomegalia palpável, sendo compatíveis com EMC. As alterações clínicas observadas em 31 cães sororreagentes incluíram apatia, hepatomegalia, sinais dermatológicos, oftálmicos e nervosos, linfadenopatia, emagrecimento e petéquias. No estudo não houve associação significativa entre a sorologia e as variáveis como sexo, faixa etária, raça e acesso à rua.

2.7.6 Diagnóstico

O diagnóstico da EMC deve ser baseado na avaliação clínica do animal com sinais clínicos, verificação do histórico de carrapatos e trombocitopenia. A confirmação deve ser realizada por meio de sorologia, exame parasitológico, por biologia molecular ou cultivo celular, sendo este último geralmente direcionado para fins de pesquisa em laboratórios bem equipados. O diagnóstico correto pode ser estabelecido no uso conjunto de testes sorológicos e de biologia molecular com a identificação do patógeno por meio de esfregaços de sangue dos animais suspeitos (DAGNONE et al., 2003; LITTLE, 2010).

2.7.7 Tratamento

A doxiciclina se constitui na droga de eleição para o tratamento da EMC. Alguns outros protocolos são descritos na literatura com associação à doxiciclina, como o dipropionato de imidocarb. Em geral, as tetraciclinas são utilizadas no tratamento da doença. O tratamento é indicado por um período que varia entre 15 a 28 dias, na dose de 10 mg/kg de peso/dia (MANOEL, 2010).

O tratamento pode durar de três a quatro semanas nos casos agudos e até oito semanas nos casos crônicos. A doxiciclina deverá ser fornecida duas a três horas antes ou após a alimentação para que não ocorra alterações na absorção (SILVA, 2015).

De um modo geral, o mecanismo de ação das tetraciclinas está relacionado com a inibição da síntese proteica dos micro-organismos sensíveis, pois se liga à subunidade 30S do ribossomo do micro-organismo, o que impede que o RNA-transportador se ligue ao ribossomo. As tetraciclinas são riquetsiostáticos e não riquetsicidas. A doxiciclina tem um caráter muito mais lipofílico, alcançando maiores níveis de penetração tecidual, resultando em maior volume de distribuição, possui ainda a capacidade de ligação com as proteínas plasmáticas, prolongando sua meia-vida e consequentemente maior atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* (AMYX et al., 1971; PAIVA et al., 2007; PAPICH et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ação antimicrobiana do extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L., pertencente à Família Asteraceae, em células infectadas com *Ehrlichia canis*.

3.2 Específicos

- Identificar as classes dos compostos do extrato de *Ageratum conyzoides* L. pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-HPLC).
- Avaliar a taxa de infecção *in vitro* das células DH82 infectadas com *E. canis* após o tratamento com o extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L.
- Comparar os efeitos do extrato e do tratamento convencional com doxiciclina nas células DH82 infectadas com *E. canis*.
- Verificar alterações nas células DH82 frente à diferentes concentrações do extrato de *Ageratum conyzoides* L.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEMA sob o número 09/2016.

4.1 Coleta do material botânico e identificação da espécie

As mudas de *Ageratum conyzoides* L. foram coletadas no campus Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), localizada no município de São Luís e cultivadas no Herbário Ático Seabra do departamento de Farmácia da instituição.

O tratamento convencional de herborização utilizado na pesquisa foi o descrito por MORI et al. (1989). A exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário Mar da UFMA, com o número de tombo 9099, identificada pelo Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Junior.

Após seis meses de crescimento, amostras da planta foram coletadas durante os meses de junho a julho de 2017 para a preparação do extrato.

4.2 Preparação do extrato

A preparação do extrato foi realizada no Laboratório de Farmacognosia II da UFMA. As partes aéreas da espécie vegetal foram retiradas e colocadas para secar em temperatura ambiente por sete dias, trituradas em turbolizador e logo após pesadas (Figura 2).



Figura 2 - Partes aéreas da *Ageratum conyzoides* L. dispostas sobre a bancada para secagem a temperatura ambiente.

4.3 Obtenção do Extrato Metanólico Bruto

O solvente utilizado foi o metanol 80%, que foi escolhido devido à sua capacidade de extrair compostos de diversas polaridades, pois na planta são encontrados em abundância compostos de média a baixa polaridade.

Para preparação do extrato foram utilizados 552,46 gramas de partes aéreas secas e trituradas. O material foi seco à temperatura ambiente (25°C) por sete dias sem sofrer influência de temperaturas mais altas que poderiam vir a degradar algum composto importante para atividade biológica do estudo. Após a secagem das partes aéreas, foi mensurada a umidade que ainda estava presente na planta, sendo obtido um percentual de 10,3%, esse valor foi utilizado no cálculo para preparação da solução extratora.

O extrato foi preparado na proporção de 80:20 (metanol:água) por percolação durante 48 horas. A quantidade de solvente foi proporcional à quantidade de pó obtida, de modo que o material vegetal ficasse imerso no solvente. Após o final da percolação, o extrato foi filtrado em papel de filtro e o líquido resultante foi acondicionado em frasco de vidro, protegido da luz.

O extrato foi concentrado em evaporador rotativo (Biotech BT 350) sob pressão reduzida até *secura*, a fim de obter o extrato metanólico bruto. O líquido resultante foi distribuído em frascos de 40 mL e congelados. Em seguida o material foi liofilizado e armazenado para a análise fitoquímica da atividade biológica em estudo (Figura 3).

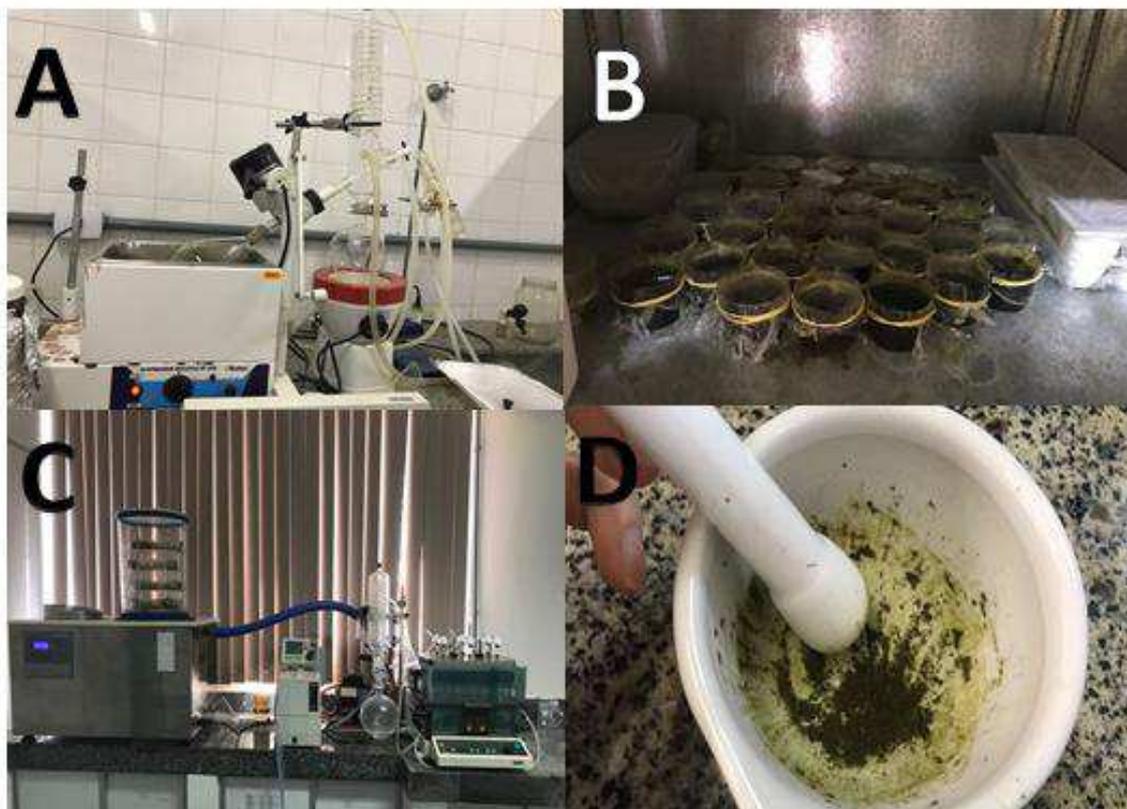


Figura 3 - A: Rotoevaporação. B: Congelamento. C: Liofilização do extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L. e D: Extrato após liofilização.

4.4 Rendimento do extrato

O cálculo do rendimento do extrato foi baseado em metodologia descrita por Rodrigues e colaboradores (2011) com adaptação. Onde:

$$Re = (P_{emb} / P_{pó}) \times 100$$

Sendo:

Re: rendimento do extrato (%)

P_{emb}: peso do extrato metanólico bruto após liofilização

P_{pó}; peso do pó utilizado na preparação do extrato

4.5 Análise cromatográfica (CLAE ou HPLC)

A análise cromatográfica foi realizada na Central Analítica no Campus Central da UFMA. Aproximadamente 50mg da amostra foi purificada em cartucho C18 para

posterior injeção em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o cartucho foi previamente acondicionado com 2,0 mL de metanol, seguido de 2,0 mL de água ultrapura. A amostra foi adicionada no cartucho (2,0 mL de cada extrato) e eluída com 1,0 mL de metanol 85% (v/v), ficando os interferentes presos no adsorvente. A fração coletada foi concentrada em evaporador rotatório.

4.6 Infecção *in vitro*

4.6.1 Micro-organismo

A cepa de *Ehrlichia canis* isolado Cuiabá utilizada foi obtida da coleção de riquetsias e erliquias do Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (FMVZ/UFMT). A mesma foi multiplicada em monocamadas de células DH82 (ATCC number: CRL-10389) e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Para o crescimento e manutenção celular foram utilizados o meio DEMEM (Dulbecco's, Modified Eagle's, Sigma Aldrich®) acrescido de 5% de soro fetal bovino (Nutricell®) renovado parcialmente a cada três a quatro dias.

4.6.3 Cultivo celular

Os macrófagos caninos (DH82) foram obtidos da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EUA) e cultivados em frascos de 25cm³ com meio DEMEM (Dulbecco's, Modified Eagle's, Sigma Aldrich®) acrescido de 5% de soro fetal bovino (Nutricell®) em uma incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂. A metodologia utilizada no cultivo seguiu as orientações de Aguiar (2006).

4.6.4 Doxíciclina

Foi utilizado o antibiótico doxíciclina (Doxi Suspensão®, CEPAV) na concentração de 1µg/mL, seguindo as diluições da bula do medicamento, tendo por base que no tratamento da erliquiose canina utiliza-se 10mg por quilo de peso vivo.

4.6.6 Protocolo dos Medicamentos

A taxa de infecção da garrafa contendo células DH82 foi acompanhada durante quatro dias até que se chegasse ao desejado. Para avaliação da taxa de infecção foi coletado com a ajuda de uma pipeta uma alíquota, colocada em um tubo de polipropileno e centrifugado a 5000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos. Após a centrifugação, foi coletado somente o *pellet* formado e descartado o sobrenadante. Posteriormente o *pellet* foi transferido para uma lâmina de vidro para microscopia e em seguida, corada com o protocolo de Panótico, para avaliar-se a taxa de infecção. A taxa de infecção foi de 70%, o que permitiu iniciar o protocolo com os medicamentos.

O protocolo foi realizado em placa de 24 poços (Figura 4) contendo diferentes concentrações de extrato, um controle positivo contendo doxiciclina ao meio de células infectadas, um controle negativo contendo Dimetilsulfóxido (DMSO) e outro contendo somente o cultivo de células DH82 (Tabela 2).

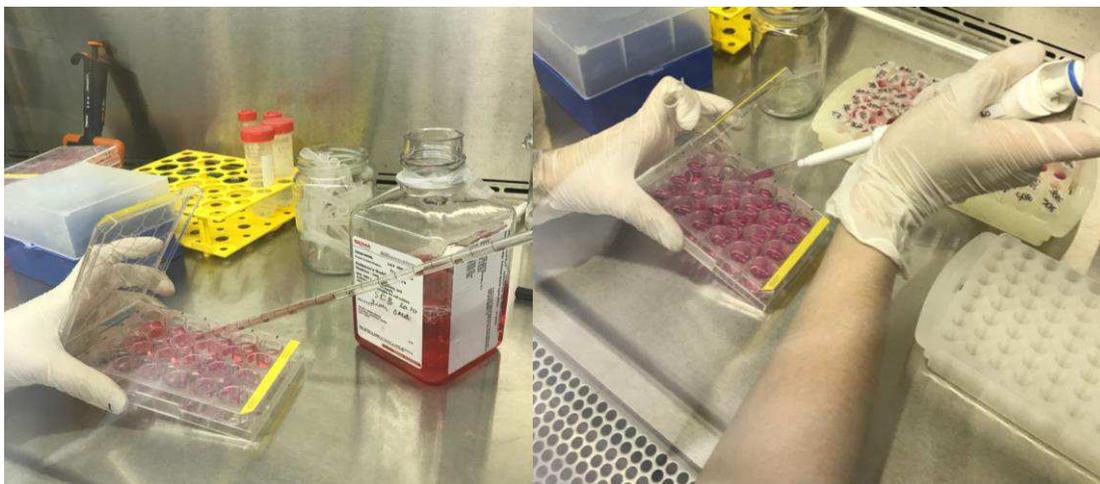


Figura 4 – Placa de 24 poços contendo meio de cultivo com células DH82 infectadas com *E. canis* e as diferentes concentrações do extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L.

As diferentes concentrações de extrato foram analisadas em triplicata e obtido a média da taxa de infecção em dois tempos, após 18 (tempo 1) e 36 (tempo 2) horas do início do tratamento.

Tabela 2 – Protocolo de medicamentos, contendo as concentrações do extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L., os controles positivo e negativo e o cultivo, número de repetições e o tempo de avaliação.

Concentração do EMB de <i>A. conyzoides</i> L.	Nº de repetições	Tempo do experimento	
		18h	36h
25 µg/mL	3	18h	36h
50 µg/mL	3	18h	36h
100 µg/mL	3	18h	36h
200 µg/mL	3	18h	36h
300 µg/mL	3	18h	36h
400 µg/mL	3	18h	36h
500 µg/mL	3	18h	36h
CP*	1	18h	36h
CN**	1	18h	36h
Cultivo***	1	18h	36h

EMB (Extrato Metanólico Bruto), *CP: controle positivo contendo 0,2 µl/mL de doxiciclina ao meio de células DH82 infectadas com *E. canis*. **CN: controle negativo contendo 50 µl/mL de DMSO ao meio de células DH82 infectadas com *E. canis*. ***Cultivo: somente meio de células DH82 infectadas com *E. canis*.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi feita com base na ANOVA, sendo confirmada a normalidade dos dados e em seguida aplicado o teste de Friedman com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do extrato

O rendimento do extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L. obtido foi de 9,08% em relação à quantidade de pó inicial utilizada.

Diferentes valores de rendimento foram alcançados por Gonçalves (2010) ao utilizar diversas partes de *Ageratum conyzoides* L. com o mesmo solvente, porém pelo método de maceração, entre eles 1,40%, 0,49%, 1,66% e 8,71%, para raiz, caule, folha e flor, respectivamente, sendo que o extrato obtido a partir das flores obteve o melhor rendimento.

Nweze e Obiwulu (2009) obtiveram um valor inferior de rendimento quando comparado ao nosso estudo, de 8,12%, este pode ser justificado devido a utilização do etanol como solvente e o método de extração a frio. Um rendimento aproximado foi obtido por Thakur et al. (2014), com 9,33%, que também utilizaram o metanol como solvente extrator. Assim Thakur, considerou este resultado como um dado relevante para a espécie.

Entretanto, Nyunai et al. (2009 e 2010) encontraram 29,9% de rendimento para a mesma espécie vegetal. Tais diferenças de rendimento podem estar relacionadas tanto ao método de preparação do extrato, bem como do solvente utilizado.

O cálculo do rendimento é de extrema importância tanto para o cultivo como para a colheita do material vegetal, uma vez que este dado pode influenciar na quantidade de planta necessária para se atingir determinada quantidade de extrato, promovendo então menores perdas na produção de plantas medicinais e de fitoterápicos (RODRIGUES et al., 2011).

Na preparação de extratos vegetais, são levados em consideração diversos fatores que podem interferir no rendimento, como a metodologia, o solvente e as características do material vegetal. Além disso, o solvente exerce função primordial no que diz respeito aos constituintes químicos de interesse na planta, podendo ou não arrastar a maior quantidade princípios ativos (FALKENBERG et al., 2000).

5.2 Análise Fitoquímica

A produção de metabólitos secundários nas plantas é resultado de um balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante toda a vida da planta e é influenciada por fatores genéticos e ambientais. A pressão seletiva e as modificações que ocorrem no ambiente podem ter influenciado no processo de evolução das plantas, para que começassem a produzir metabólitos secundários, uma vez que estes compostos são responsáveis por conferir integridade às plantas.

Uma planta pode conter centenas de metabólitos secundários e a identificação destes compostos está ligada ao método de extração, aos fatores ambientais, que determinam sua maior ou menor produção nas plantas. A atividade biológica de uma planta pode ser determinada tanto pelos compostos majoritários como também por aqueles que estão em menor concentração, pois, sabe-se que pode haver um sinergismo entre eles que será responsável pelo sucesso terapêutico.

A prospecção fitoquímica do extrato metanólico bruto revelou a presença de três classes principais de compostos, são eles: ácidos fenólicos, flavonoides (agliconas e glicosídeos) e terpenos, todos esses compõem um grande grupo que é denominado de compostos fenólicos, que atualmente vêm sendo investigado devido aos benefícios à saúde tanto humana quanto animal.

Vários fatores interferem na atividade biológica dos compostos fenólicos, desde sua absorção e metabolização bem como de sua estrutura química. Há uma grande diversidade estrutural nesse grupo o que confere certo grau de dificuldade nos estudos que envolvem sua biodisponibilidade e seus efeitos dentro do organismo (MIRA, 2008).

Autores como Larcher (2004) e Taiz e Zeiger, (2013) já relataram que os compostos fenólicos encontrados nos vegetais possuem estruturas variadas, derivados dos ácidos fenólicos como a cumarina, taninos e flavonoides e agem como antioxidantes, sequestrando radicais livres, quelantes de metais, agentes redutores ou desativadores do oxigênio singlete.

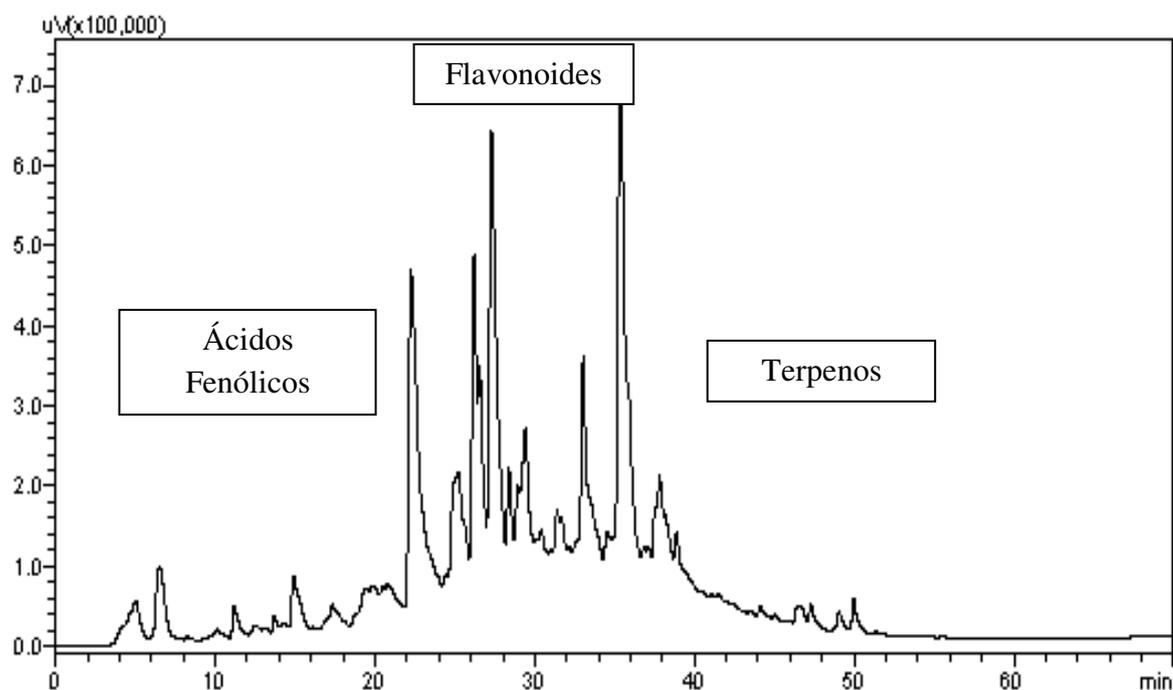


Figura 5 - Cromatograma ($\lambda=254$ nm) do extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L. obtido em CLAE.

Recentemente um trabalho realizado por Miranda et al., (2013), com as partes aéreas de *Ageratum conyzoides* L., não revelaram as classes de metabólitos como terpenos, esteroides e antraquinonas, isso pode ser explicado em função do solvente utilizado ter sido o etanol e o método de extração utilizado ter sido a maceração. Além de outros fatores que influenciam a presença de metabólitos secundários como clima e solo diferentes.

Existe um amplo espectro de atividades farmacológicas a partir das classes dos compostos identificados no presente estudo desta planta. Muitas atividades atribuídas a *A. conyzoides* já foram estudadas e algumas delas, como antiarrítmica, antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória, comprovadas cientificamente (OKUNADE, 2002).

Na análise fitoquímica foram identificados compostos fenólicos, existe uma gama de atividades biológicas da planta já relatada na literatura associados à presença desses compostos, que são excelentes antioxidantes. Segundo Soares (2002), esses compostos agem inibindo a oxidação de vários substratos, por meio de dois principais mecanismos: inibição da formação de radicais livres; eliminação de radicais, caracterizando duas etapas principais a de iniciação e a de propagação, respectivamente. Então os antioxidantes fenólicos agem nas duas etapas quer como sequestradores de radicais, quer como quelantes de metais.

Há pouco tempo Mesa – Vanegas et al. (2015) afirmaram que os antioxidantes encontrados nos extratos metanólico e acetato de etila de *A. conyzoides* L. podem ser de ação lenta e rápida e que é importante isolar e purificar os metabólitos, pois muitos apresentam atividade antioxidante promissora, como os flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos, sugerindo que fossem realizados estudos para verificar o mecanismo de ação desses antioxidantes.

Os flavonoides presentes nessa planta podem ser os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, ação já demonstrada em diversos estudos. Estes compostos possuem diversas ações, como antioxidantes, anti-inflamatória e anti-hemorrágica e, além disso, desempenham papel importante na sobrevivência da planta atuando em sua proteção contra agentes químicos e raios ultravioletas, por exemplo.

O efeito inibitório causado pelos flavonoides em muitos micro-organismos pode estar relacionado à interação destes compostos com a membrana celular dos agentes alvo, devido à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e com a parede celular (ROZATTO, 2012).

Os flavonoides presentes em *A. conyzoides* L. (extrato de éter de petróleo e acetato de etileno) foram considerados os responsáveis pela ação anticancerígena detectado em estudo com a planta, apresentando atividade inibitória em uma vasta gama de linhagens celulares de câncer (ADEBAYO et al., 2010)

Assim como a triagem fitoquímica realizada por Santos (2015) que encontrou sesquiterpenos e monoterpenos em extrato de *Ageratum conyzoides* L., em nosso estudo também foi verificado a presença desses compostos terpenoides, porém não foi possível fazer o isolamento para identificar que tipo de terpeno está presente.

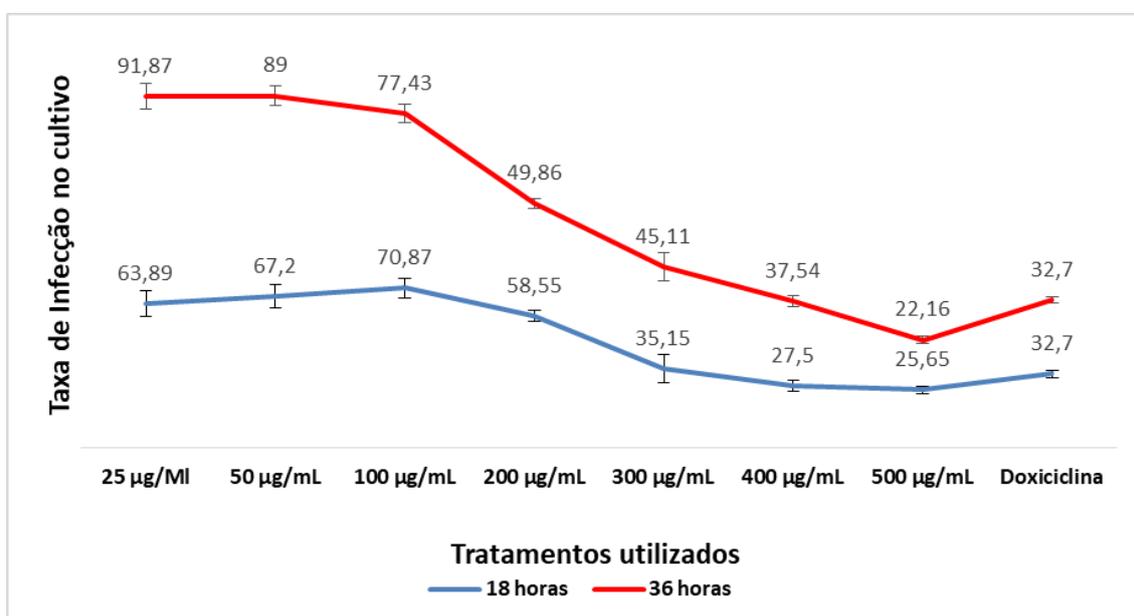
Os compostos encontrados na prospecção fitoquímica agem de maneiras variadas frente os micro-organismos, a exemplo os terpenos que como sugerido por Sartori (2005) podem romper a membrana celular.

O mecanismo antimicrobiano dos terpenos pode estar associado ao caráter lipofílico, havendo um acúmulo desses compostos na membrana dos micro-organismos alvo e perda de energia pelas células (DUARTE et al., 2006).

5.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* de *Ageratum conyzoides* L.

A atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L. em células DH82 infectadas com *E. canis* está representada na Figura 6. A avaliação foi feita com base na contagem de cinco campos visuais, contendo células infectadas (apresentando mórulas de *E. canis*) e células não infectadas, o que permitiu calcular a taxa de infecção após 18 horas e 36 horas de tratamento. Essa taxa foi calculada para cada concentração do extrato, permitindo avaliar a eficácia das diferentes concentrações do extrato sobre o cultivo de *E. canis*.

Figura 6 – Taxa de infecção de células DH82 infectadas com *E. canis* após 18 e 36 horas, respectivamente, de tratamento com diferentes concentrações do extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L e doxiciclina.



Para a concentração de 25 µg/mL do extrato no tempo 1 ainda era possível notar grande número de células infectadas sendo muito semelhante ao poço que continha apenas cultivo. As células apresentavam grande quantidade de mórulas e não era possível identificar nenhum efeito do extrato sobre as células nem sobre as mórulas de *Ehrlichia canis*. Mesmo após as 36 horas de tratamento não houve diferença significativa para essa concentração, permanecendo sem atividade nas células infectadas.

Quando se avaliou as outras concentrações no tempo 1 percebeu-se mudanças no comportamento celular e na taxa de infecção, a partir da concentração de 100 µg/mL, no qual as mórulas de *E. canis* apresentavam-se um pouco deformadas. Entretanto, era de se esperar que alguma atividade fosse realmente observada após as 36 horas de tratamento.

Então no tempo 2 (36 horas), verificou-se que as concentrações de 300 e 400 µg/mL apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capazes de reduzir a taxa de infecção, com diferenças significativas em relação às menores concentrações.

As médias e o desvio padrão demonstram que depois de decorrido 18 horas de tratamento as concentrações de 200, 300 e 400 µg/mL do extrato foram capazes de reduzir a taxa de células infectadas mesmo sendo um curto período de tempo avaliado. Grande parte dos trabalhos faz uma avaliação da eficácia de tratamentos testados *in vitro* em tempos de 24 e 48 horas, porém como o cultivo de *E. canis* exige condições muito peculiares e é altamente sensível a contaminação optou-se, então, por avaliar nos intervalos de tempo 18 horas e 36 horas de tratamento.

A partir da concentração de 300 µg/mL foi possível notar que foram formados muitos vacúolos nas células indicando atividade fagocítica do macrófago na presença do extrato, apesar de serem encontradas ainda muitas células infectadas, essa intensa atividade fagocítica como mostra a Figura 7 nos leva a considerar que o extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L. pode ser uma matriz de compostos promissora no combate à erliquiose.

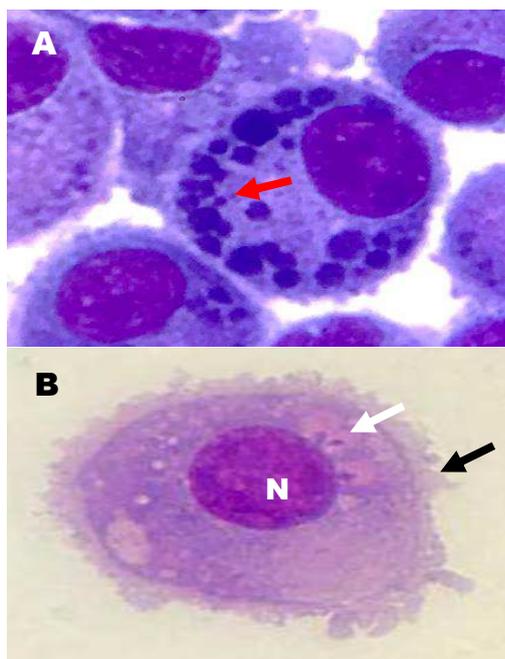


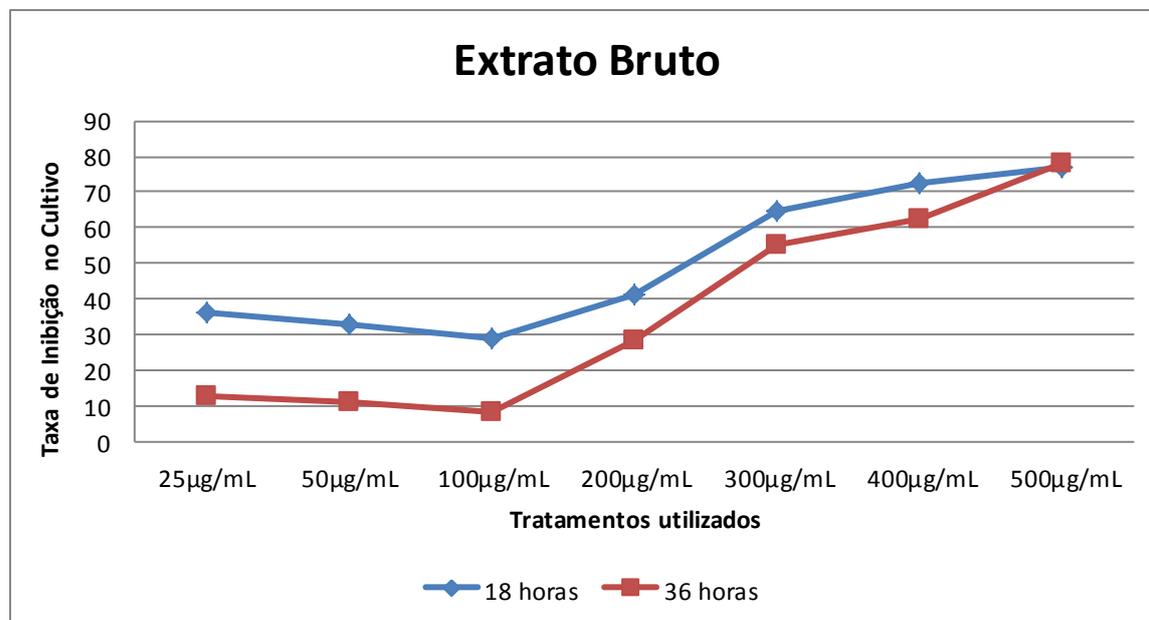
Figura 7 – A: Fotomicrografia de células DH82 provenientes de monocamada inoculada com o isolado de Cuiabá, MT, apresentando mórulas (seta vermelha) de *Ehrlichia canis*, B: Fotomicrografia de Células DH82 provenientes de monocamada inoculada com o isolado de Cuiabá, MT, tratadas com o extrato de *Ageratum conyzoides* apresentando projeções citoplasmáticas (seta preta) e vacúolos indicando atividade fagocítica (seta branca); N: núcleo. Panótico rápido (Laborclin®); 100X.

Alguns trabalhos como o de Ribeiro et al. (2001) mostram que o DMSO pode interferir no resultado, ocasionando inibição do crescimento bacteriano, caso seja usado como um solvente da droga vegetal.

Em nosso modelo *in vitro*, o controle negativo do cultivo de células DH82, tratado somente com DMSO não interferiu no percentual de inibição do micro-organismo, o que demonstra que o DMSO pode ser utilizado de forma eficaz como solubilizante do extrato testado.

A concentração de 500 µg/mL, tanto em 18 quanto em 36 horas, apresentou maior taxa de atividade antimicrobiana. Observa-se ainda, que a taxa de inibição do micro-organismo se eleva à medida que se aumenta a concentração do extrato, bem como o tempo de tratamento (Figura 8).

Figura 8 –Taxa de inibição do micro-organismo em diferentes concentrações do extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L.



Todavia, pode-se afirmar que a concentração que realmente foi eficaz no tratamento foi a de 500 µg/mL, no qual se apresentou quase semelhante ao cultivo tratado com doxiciclina.

A doxiciclina possui característica lipofílica, pois penetra mais facilmente nos tecidos que outras tetraciclinas conseguindo ligar-se com maior facilidade às proteínas plasmáticas.

De modo semelhante, a ação do extrato na cultura de células com *E. canis* também apresentou esse caráter lipofílico devido a presença dos compostos fenólicos como os terpenos, que agem de maneira similar à doxiciclina rompendo a membrana celular e ativando o mecanismo de degradação do micro-organismo.

6. CONCLUSÃO

- O rendimento encontrado do extrato foi um valor considerado importante.
- O extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L. apresentou pela análise fitoquímica compostos fenólicos, entre eles, ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos, o que sugere que a planta possui grande potencial para ser utilizada em estudos de atividade antibacteriana, principalmente aqueles que envolvam micro-organismos intracelulares.
- O extrato metanólico bruto de *Ageratum conyzoides* L. possui atividade anti erlíquia em cultura de células DH82.
- A concentração que apresentou atividade antimicrobiana mais eficaz foi de 500 µg/mL.
- O extrato metanólico bruto de *A. conyzoides* L. apresentou-se tão eficaz quanto à doxiciclina no tratamento *in vitro* de células infectadas com *E. canis*.

REFERÊNCIAS

ACETTA, E. M. T. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães (*Canis familiaris*, *Linnaeus, 1758*) trombocitopênicos da região dos Lagos do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ADEBAYO, A. H.; TAN, N. H.; AKINDAHUNSI, A. A.; ZENG, G. Z.; ZHANG, Y. M. Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Pharmacognosy magazine*, v.6, n.21, p.62-66, 2010.

AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erlichiose canina no Brasil**. São Paulo, SP. 2006. 95f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) Universidade de São Paulo, São Paulo.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, mai-jun, p.796-802, 2007.

AGUIAR, A. D'ANGELO. **Terapêutica da erlichiose canina: eficácia da alopatia e da Homeopatia**. 2013. 64f. Dissertação (Mestrado – Ciência Animal Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

ALMEIDA, E. R. **Plantas Medicinais Brasileiras**. São Paulo: Hemus. p. 341, 1993.

ALMEIDA, A.M.; FONSECA, C.R.; PRADO, P.I.; ALMEIDA-NETO, M.; DINIZ, S.; KUBOTA, U.; BRAUN, M.R.; RAIMUNO, R.L.G.; ANJOS, L.A.; MENDONÇA, T.G.; FUTADA, S.M. & LEWINSOHN, T.M. Diversidade e ocorrência de Asteraceae em cerrados de São Paulo. **Biota Neotropica**, v.5, n.2, p.1-17, 2005.

ALMEIDA, P. C. **EXTRAÇÃO DE CROMENOS A PARTIR DE *Ageratum conyzoides* L. : IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO**. 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: LF Livros, 2002. p. 13-56.

AMYX, H. L.; HXSOLL, D. L.; ZEILER, D. C.; HILDEBRANDT, P. K. Therapeutic and prophylactic value of tetracycline in dogs infected with the agente of torpical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.159, n.11, p.1428-1432, 1971.

ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. 2010. 100f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 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. **Brazilian Journal Biology**, vol. 72, no. 3, p. 505-509, 2012.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v.15, n. 1, p. 132-139, 2011.

BAHMANI, M.; SAKI, K.; EZATPOUR, B.; SHASAVARI, S.; EFTHEKARI, Z.; JELODARI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SEPAHVAND, R. Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on Leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.15, n.5 (9), p.695-701, 2015.

BARBOZA DA SILVA, N. C.; DELFINO REGIS, A. C.; ESQUIBEL, M. A.; ESPÍRITO SANTO SANTOS, J.; ALMEIDA, M. Z. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II – Bahia, Brasil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 5, p. 435 – 453, 2012.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Informa**, v.17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BONET, M. A.; VALLÈS, J. Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 130–147, 2007.

BRAGA, I. A.; SANTOS, L. G. F.; RAMOS, D. G.; MELO, A. L. T.; MESTRE, G.; AGUIAR, D. M. . Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 641-645, 2014.

BRASIL. **Lei N° 5.991, DE 17 DE DEZEMBRO DE 1973**. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos, e dá outras Providências, 1973.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução – RDC N° 17 de 24/02/2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF (25/02/2000), 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 156 p., 2012.

COELHO, F. B. R.; DALBELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. Levantamento Etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, v. 2, p. 52-55, 2005.

COSTA, H. X. Erliquiose monocítica canina: revisão sobre a doença e o diagnóstico. **Seminário** (Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás) Nível: Doutorado, Goiânia, 2011.

DAGNONE, A. S.; De MORAIS, H. S; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DE SÁ, M. C. A.; PEIXOTO, R. M.; KREWER, C. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.18, n.2/3, p.62-66, 2011.

DIALLO, A.; EKLUGA-DEGBEKEU, K.; AMEGBOR, K.; AGBONON, A.; AKLIKOKOU, K.; CREPPY, E.; GBEASSOR, M. In vivo and in vitro toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, p.1214–1218, 2014.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.5, p.724-728, 2010.

DI STASI, L. C. 1995. Plantas medicinais: Arte e Ciência. UNESP. Brasil, 230p.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, v.7, 2006.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia Phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2145-2165, 2001.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713., 1998.

ESCOBAR, B. T. **AVALIAÇÃO PSICOFARMACOLÓGICA DE *Ageratum conyzoides* L. ASTERACEAE**, Criciúma, Santa Catarina. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I e SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, p.301-303,200.

FARIAS, M.P.O.; SOUSA, D.P.; ARRUDA, A.C.; ARRUDA, M.S.P.; WANDERLEY, A.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Eficácia in vitro do óleo da Carapa guianensis Aubl. (andiroba) no controle de Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.68-71, 2007.

FRANÇA , I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 61, n. 2, p. 201-8, 2008.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v.33, n.9, 2010.

FONTALVO, M. C.; BRAGA, I. A.; AGUIAR, D. M.; HORTA, M. C. Serological evidence of exposure to Ehrlichia canis in cats. **Ciência Animal Brasileira**, v.17, n.3, p.418-424, 2016.

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M.B. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida* no período de 2005-2013. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.175-185, 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GONÇALVES, J. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e triagem fitoquímica dos extratos de espécies da família Asteraceae encontradas no semi-árido baiano**. 2010. 91 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

GONÇALVES, J. M. **Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (lam) dc. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano**. 2015, 111f. Tese (Programa de Pós Graduação em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2015.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for

the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p.1027-1031, 2002.

JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J. J.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of test methods. **Planta Medica**. Stuttgart, v. 40, p. 395-398, 1987.

KONE, W.M., ATINDEHOU, K.K. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in traditional veterinary medicine in Northern Cote d'Ivoire (West Africa). **South African Journal of Botany**, v. 74, p.76–84, 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. 1ª ed. São Carlos: RiMa. 2004. 531p.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Veterinary Clinical Small Animals**, v. 40, p.1121-1140, 2010.

LOPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Revista Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v.1 (1), p.19-27, 2006.

LORENZI, M.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa. Instituto Plantarum. 512p, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.Jr.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, p. 429-438, 2002.

MALHEIROS, S. G. L. **Estudo farmacobotânico de seis espécies de uso medicinal no nordeste brasileiro, João Pessoa**, Paraíba. 2012. 94f. Dissertação (Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

MANOEL, C. S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2010.

MARINHO, M.L.; ALVES, M.S.; RODRIGUES, M.L.C.; ROTONDANO, T.E.F.; VIDAL, I.F.; SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber Popular. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MELO, A. L. T.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.2, n.4, p.213-218, 2011.

MESA-VANEGAS, A. M.; ZAPATA-URIBE, S.; ARANA, L. M.; ZAPATA, I. C.; MONSALVE, Z.; ROJANO, B. Actividad antioxidante de extractos de deferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v.14, n.1, p.1-10, 2015.

MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.4, p.994-1002, 2008.

MIRANDA, G. S.; SANTANA, G. S.; MACHADO B. B.; COELHO, F. P.; CARVALHO, C. A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.15, n.1, p.104-111, 2013.

MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C.; BARBOSA, L. C. A.; GUEDES, R. N. C.; BARROS, E. C.; CAMPOS, M. R. Compounds from *Ageratum conyzoides*: isolation, structural elucidation and insecticidal activity. **Pest Management Science**, v.63, p.615-621, 2007.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti**. São Paulo: FMC Agricultural Products, 2011. 1017p.

MORI, S.A. et al. **Manual de Manejo do Herbário Fanerogâmico**. Ilhéus: CEPEC/CEPLAC. 1989.

NOGUEIRA, J. H. C. **Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina**. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado do Instituto Biológico) – Instituto Biológico, São Paulo, 2009.

NWEZE, N. E.; OBIWULU, I. S. Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.6-9. 2009.

NYUNAI, N.; NJKAM, N.; ABDENNEBI, EL H.; MBAFOR, J. T.; LAMNAOUER, D. Hypoglycaemic and Antihyperglycaemic Ativity of *Ageratum conyzoides* L. in rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n.2, p.123-130, 2009.

NYUNAI, N.; MANGUELLE-DICOUM, A.; ABDENNEBI, E.; GERDARD, C. Antihyperglycaemic effect of *Ageratum conyzoides* L. fractions in normoglycaemic and diabetic male Wistar rats. **International Journal of Biomedical na Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.1, p.38-42, 2010.

OLIVEIRA BRAGA, M. S De.; ANDRÉ, M. R.; FRESCHI, C. R.; TEIXEIRA, M. C. A.; MACHADO, R. Z. Molecular and serological detection of Ehrlichia spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.1, p.37-41, 2012.

OKUNADE, A. D. L. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Fitoterapia** v. 73, p.1-16, 2002.

OZAKI, A. T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos utilizados na Medicina Veterinária, em cães e gatos. **Informa**, v.18, n.11/12, 2006.

PAIVA, J.; BENDAS, A. J.; ROSSI, M. I. D.; BRANCO, A. S.; VALLE, L. G.; BELMONTE, D.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; GUERRERO, J.; LABARTHE, N. Uso de doxiciclina (Doxifin®) em cães mantidos sob condições adversas, em foco de transmissão ativa de *Ehrlichia canis* (Donatein e Lestoquard, 1935) e de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.27, n.157, p.17-18, 2007.

PAPICH, M. G. **Manual Sanders Terapêutico Veterinário**. 2ªed. São Paulo: MedVet. 2009, 774p.

PONÈ, J. W.; TANKOUA, O. F.; YONDO, J.; KOMTANGI, M. C.; MBIDA, M.; BILONG, C. F. The In Vitro Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of the Leaves of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) on Three Life Cycle Stages of the Parasitic Nematode *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda: Heligmosomatidae). **Veterinary Medicine International**, 2011.

RIBEIRO, M.G.; CARVALHO FILHO, A.S.; LISTONI, F.J.P. Dimetilsulfóxido – DMSO no teste de sensibilidade microbiana in vitro em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 889-892, 2001.

RODRIGUES, T. S.; GUIMARÃES, S. F.; RODRIGUES, R. G.; GABRIEL, J. V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 587-590, 2011.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Salvador, EDUFAB, 2008, 73p.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SANTOS, R. F. **Padronização farmacognóstica e atividade antifúngica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L.** 2015. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. **Das plantas medicinais à fitoterapia: uma ciência em expansão**. Brasília: Editora IFB, 2016. 214p.

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de fração de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae).** 2005, 81p. Dissertação (Mestrado) Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina.

SILVA, V. L. D. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina.** 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.2, p.108-111, 2010.

SILVA, M. P.; BARBOSA, F. S. Q.; BARROS, R. F. M. Estudo taxonômico e etnobotânico sobre a família Asteraceae (Dumortier) em uma comunidade rural no Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, Edição Especial Populações Tradicionais, p.110-123, 2014.

SILVA, I. P. M. ERLIQUIOSE CANINA – REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n.24, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** 4 ed. Editora UFSC. 2004.

SINGH, S. B.; DEVI, W. R.; A, M.; DEVI, W. I.; SWAPANA, N.; SINGH, C. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n.8, p.371-385, 2013.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640 p

TANIGUCHI, M. & KUBO, I. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trials in the African savanna: screening of cast African plants for antimicrobial activity II. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1539-1546, 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 820p.

THAKUR, L. K.; PRAJAPATI, R.; ROY, S.; MISHRA, S.; RAZA, S. K. Formulation development, standardization and antimicrobial activity of *Ageratum conyzoides* extracts and their formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.2, p.369-374, 2014.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

UKWE, C. V.; EKWUNIFE, O. I.; EPUEKE, E. A.; UBAKA, C. M. Antimalarial activity of *Ageratum conyzoides* in combination with chloroquine and artesunate. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, P.943-947, 2010.

USHIMARU, P. I.; SILVA, M. T. N.; DI STASI, L. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.38, p.717-719, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VIANNA, U. R.; OLIVEIRA, F. A.; CARVALHO, J. R.; BARBOSA, J. M. Tópicos especiais em Ciência Animal V [e-book]. 1. ed. – Alegre, ES : CAUFES, 2016. 506p.

VIEGI, L; PIERONI, A; GARRERA, P. M; VANGELISTI, R;. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basics for a databank. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 89. p 223 –233, 2003.