



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO MULTIDISCIPLINAR UFRJ – MACAÉ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



MATEUS RANGEL SOUZA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DO EXTRATO BRUTO DA PLANTA
Tocoyena bullata NO MODELO *Caenorhabditis elegans***

MACAÉ

2022

MATEUS RANGEL SOUZA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DO EXTRATO BRUTO DA PLANTA
Tocoyena bullata NO MODELO *Caenorhabditis elegans***

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Julia Peralta Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Aleksandra Menezes de Oliveira

MACAÉ

2022

CIP - Catalogação na Publicação

S729

Souza, Mateus Rangel

Avaliação do efeito anti-helmintico do extrato bruto da planta *Tocoyena bullata* no modelo *Caenorhabditis elegans* / Mateus Rangel Souza - Macaé, 2022.

68 f.

Orientador(a): Júlia Pereira Gonçalves .

Coorientador(a): Aleksandra Menezes de Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Helminthos. 2. Anti-helminticos. 3. *Caenorhabditis elegans*. 4. *Tocoyena bullata*. I. Gonçalves, Júlia Pereira, orient. II. Oliveira, Aleksandra Menezes, coorient. III. Título.

CDD 615.32

MATEUS RANGEL SOUZA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DO EXTRATO BRUTO DA PLANTA
Tocoyena bullata NO MODELO *Caenorhabditis elegans***

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 08 de julho de 2022

Comissão avaliadora:

Prof. Dra. Júlia Peralta Gonçalves (Presidente da banca)

Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé

<http://lattes.cnpq.br/7776896862981992>

Prof. Dra. Elaine dos Anjos da Cruz da Rocha

Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé

<http://lattes.cnpq.br/5154038840072425>

Prof. Dr. Celso Luis Ribeiro Belmiro

Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé

<http://lattes.cnpq.br/9429973583748796>

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e por me ajudar a enfrentar os obstáculos encontrados ao longo do curso.

Aos meus pais, Carmem e Márcio, e meus irmãos Vitor e Bruna, por todo incentivo, apoio e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus avós, Marilene e Jorge, por sempre terem ficado do meu lado e nunca medirem esforços para me proporcionar o melhor.

Às minhas orientadoras, Prof^a Júlia Peralta e Prof^a Aleksandra Menezes, por todos os ensinamentos, paciência e por serem tão parceiras. Vocês me inspiram.

A todos meus amigos de curso, em especial Alana e Thuane, por todos esses anos juntos, pelas risadas, conversas, momentos de desespero, mas também os de alegria. Vocês fizeram meus dias melhores.

A todos os integrantes do Laboratório de Imunoparasitologia da UFRJ – Macaé, por toda parceria, troca de experiências e também ajuda para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores que passaram pela minha vida durante esses cinco anos e que com toda certeza contribuiu muito para o meu aprendizado e formação.

À Unidade Integrada de Imagem do NUPEM/UFRJ pelo apoio com o uso dos seus equipamentos.

A PIBIC/UFRJ pela bolsa de pesquisa e apoio no desenvolvimento do projeto.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para a minha formação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia e principais características de um nematoide macho e fêmea.....	14
Figura 2. Esquema da parede corporal de nematoides e componentes moleculares presentes.....	16
Figura 3. Ano de aprovação e ano de resistência aos anti-helmínticos relatados em caprinos e ovinos.....	23
Figura 4. Folhas e flores de <i>Tocoyena bullata</i>	28
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	30
Figura 6. Morfologia de <i>C. elegans</i> adulto hermafrodita.....	31
Figura 7. Percentual de eclosão de L1 de <i>Caenorhabditis elegans</i> não tratados e tratados com o extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i>	38
Figura 8. Percentual de sobrevivência de larvas L3-L4 de <i>Caenorhabditis elegans</i> não tratados e tratados com o extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i>	39
Figura 9. Percentual de sobrevivência de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> não tratados e tratados com o extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i>	40
Figura 10. Micrografias ópticas de larvas L3-L4 de <i>C. elegans</i> não tratados e tratados com extrato bruto de <i>T. bullata</i>	42
Figura 11. Micrografias ópticas de adultos de <i>C. elegans</i> não tratados e tratados com extrato bruto de <i>T. bullata</i>	45

LISTA DE ABREVIACÕES

BZs	Benzimidazolicos
DMSO	Dimetilsulfóxido
TB	<i>Tocoyena bullata</i>
AFA	lcool-Formaldeido-cido Acético

SUMÁRIO

RESUMO	10
1. Introdução	11
1.1. Helmintíases	11
1.2. Nematoides	13
1.3. Controle e Tratamento das Helmintíases	18
1.4. Tratamento com fontes alternativas: Produtos Naturais	24
1.5. <i>Tocoyena bullata</i>	26
1.6. Modelo experimental: <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
2. Justificativa.....	34
3. Objetivos	34
3.1. Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. Metodologia.....	35
4.1. Manutenção de <i>C. elegans</i>	35
4.2. Extrato Bruto de <i>Tocoyena bullata</i>	35
4.3. Atividade anti-helmíntica.....	35
4.3.1. Sincronização da cultura para obtenção das diferentes formas de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	35
4.3.2. Tratamento dos ovos para avaliação da eclosão de L1.....	36
4.3.3. Ensaio de sobrevivência de larvas L3-L4 de <i>C. elegans</i>	36
4.3.4. Ensaio de sobrevivência de adultos de <i>C. elegans</i>	36
4.4. Cálculo do IC50 e análises estatísticas.	37
4.5. Análise morfológica das diferentes formas de vida de <i>C. elegans</i> tratados com o extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i>	37
4.1.5. Microscopia de Luz	37
5. Resultados	38
5.1. Efeito do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> na eclosão de larvas L1 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	38
5.2. Efeito do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> na sobrevivência de larvas L3-L4 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
5.3. Efeito do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> na sobrevivência de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i>	40
5.4. Análise morfológica do efeito do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> em larvas L3-L4 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	41

5.5 Análise morfológica do efeito do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i>	44
6. Discussão.....	47
7. Perspectivas futuras.....	53
8. Conclusão	54
9. Referências Bibliográficas:	55

RESUMO

Os helmintos são metazoários, sendo muitas espécies parasitas que podem infectar o homem, impactando negativamente sua saúde. O modelo experimental utilizado para testes de atividade anti-helmíntica é o *Caenorhabditis elegans*, um nematoide de vida livre, que apresenta alta disponibilidade, facilidade de cultura e rápido ciclo de vida, sendo utilizado no desenvolvimento de novos fármacos e que compartilha diversas características com nematoides parasitas de humanos. Os produtos naturais vêm sendo avaliados pelas suas propriedades anti-helmínticas, e grande fonte desses produtos são plantas coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica do extrato bruto de *Tocoyena bullata* em ovos, larvas e adultos de *C. elegans*. A cepa N2 de *C. elegans* foi mantida em laboratório utilizando *Escherichia coli* cepa OP50 como fonte alimentar a 20°C. O extrato foi cedido pela Prof^a Dr^a Michelle Frazão Muzitano (LPBio/UFRJ). Foi realizada a sincronização da cultura para obtenção de ovos do *C. elegans* a partir da lise dos helmintos adultos com solução de NaOH 5% e NaOCl 6%. Após 30 horas, são obtidas as larvas L3-L4 e 72 horas depois, os adultos. Cerca de 30 espécimes de ovos, L3-L4 e adultos foram incubados com o extrato de *T. bullata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. A condição DMSO 0,01% foi utilizada como controle. O efeito nos ovos foi avaliado pela eclosão de larvas L1, e nas larvas L3-L4 e nos adultos, avaliou-se a sobrevivência dos mesmos. As alterações morfológicas foram analisadas através da microscopia óptica utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX51 acoplado a câmera DP-71. Para o cálculo do IC₅₀, o percentual de sobrevivência de larvas e adultos e de eclosão de L1 foram plotados em função da concentração do composto utilizando-se uma análise não-linear com o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., EUA). Houve diminuição estatisticamente significativa na eclosão de larvas L1 e na sobrevivência de larvas L3-L4, obtendo-se IC₅₀ de 344,7 µg/mL e 194,6 µg/mL, respectivamente, assim como em outros estudos na pesquisa de produtos naturais promissores. Em adultos, o efeito foi mais acentuado, diminuindo drasticamente sua sobrevivência, sendo obtido IC₅₀ de 32,12 µg/mL. Por microscopia óptica, foi possível observar alterações cuticulares e degenerações das estruturas internas, tanto de larvas quanto dos adultos, em quase todas as concentrações avaliadas. Além disso, é possível perceber o fenômeno *endotokia matricida* em adultos tratados com o extrato a 25 e 50 µg/mL. Tais alterações encontradas afetam sua integridade, metabolismo e comprometem a sobrevivência do nematoide. Nossos resultados demonstram o potencial efeito anti-helmíntico de *T. bullata*, com diminuição significativa na sobrevivência e danos morfológicos relevantes. Dessa forma, o extrato bruto apresenta potencial efeito anti-helmíntico utilizando-se o modelo *C. elegans*.

Palavras-chave: Helmintos; *Caenorhabditis elegans*; anti-helmíntico; produtos naturais; *Tocoyena bullata*

1. Introdução

1.1. Helminthíases

As infecções causadas por helmintos parasitos são um grande problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020), mais de 1,5 bilhão de pessoas (24% da população mundial) estão infectados por helmintos em todo o mundo, impactando negativamente na saúde humana. Tais infecções estão incluídas no grupo das doenças consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), visto que acometem as populações de maior vulnerabilidade social, com baixo acesso a saneamento básico adequado e água potável (BRASIL, 2018). Somado a isso, a desinformação a respeito da prevenção e tratamento dos parasitos específicos pode prejudicar ainda mais as populações menos favorecidas.

A distribuição das infecções helmínticas ocorre em áreas tropicais e subtropicais, principalmente na África Subsaariana, Leste Asiático, Américas e China, atingindo as populações que vivem em condições precárias de saúde, afetando especialmente as crianças, visto que estão em contato contínuo com locais contaminados e os seus hábitos de higiene não são os mais convenientes, além das mulheres em idade fértil e gestantes (OMS, 2020). Estima-se que mais de 835 milhões de crianças em idade pré-escolar e escolar vivem em áreas onde os parasitos são transmitidos intensamente e necessitam de maior suporte e apoio (OMS, 2020). Quando não tratadas de forma adequada, as infecções podem retardar o desenvolvimento físico e mental, causar deficiências na memória e cognição, prejudicar o desempenho educacional, ocasionar a desnutrição e até mesmo a mortalidade infantil. Além disso, a população adulta também é alvo das doenças helmínticas e que intimamente ligadas a elas, a morbidade pode prejudicar na produtividade agrícola e econômica, no desenvolvimento cognitivo, deficiências físicas, dor, causar impactos negativos na saúde materna, como anemia, parto prematuro, baixo peso ao nascer e mortalidade materna (LUSTIGMAN *et al.*, 2012).

Em muitos casos, ainda pode ocorrer a coinfeção, ou também chamado de poliparasitismo, na qual o indivíduo adquire mais de uma espécie de helmintos. Nessas situações, o impacto na morbidade é maior, visto que a intensidade das infecções é exacerbada (BROOKER *et al.*, 2000). Ainda assim, o poliparasitismo pode aumentar a suscetibilidade de infecções como malária e HIV em países em

desenvolvimento, em especial a África Subsaariana, em consequência da resposta imunológica estar prejudicada pelas infecções helmínticas (HOTEZ *et al.*, 2008). Gallagher *et al.* (2005) revelou em um estudo que a coinfeção por helmintos está relacionada ao aumento de risco na transmissão vertical do HIV em mulheres grávidas, gerando consequências negativas na saúde. Vale ressaltar que, a co-ocorrência de infecções está relacionada aos fatores ambientais e ecológicos, suscetibilidade e exposição do hospedeiro, fatores sociais e econômicos, hábitos de higiene e nível de comprometimento do governo com a população mais vulnerável (LUSTIGMAN *et al.*, 2012).

As infecções causadas por geo-helmintos, também chamadas de helmintíases transmitidas pelo solo (HTS), estão entre as doenças tropicais negligenciadas mais prevalentes e são causadas quando o hospedeiro ingere as formas dos helmintos que se desenvolvem no solo ou pelo contato direto com o solo contaminado (OMS, 2020). Acometem principalmente as regiões de saneamento básico precário e com o nível do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) baixo, afetando principalmente crianças, devido às más condições de higiene e por estarem em contato com o solo com maior frequência. No Brasil, essas infecções estão presentes principalmente nas zonas rurais e periferias de centros urbanos, sendo mais prevalentes nas regiões Norte e Nordeste. Os geo-helmintos são abordados como um grupo pois apresentam ciclo de vida, diagnóstico e tratamento semelhantes (BRASIL, 2018; OMS, 2020). Segundo a Organização Panamericana da Saúde, da OMS, estima-se que no mundo 820 milhões de pessoas estão infectadas por *Ascaris lumbricoides* (ascaridíase), 600 milhões por *Strongyloides stercoralis* (estrongiloidíase), 460 milhões por *Trichuris trichiura* (tricuríase) e 440 milhões por ancilostomíase (OPAS, 2018; OMS, 2020).

Os seres humanos são os principais hospedeiros dos geohelmintos, na qual a transmissão ocorre por ingestão de ovos eliminados nas fezes de pessoas infectadas que contaminam o solo, ingestão de alimentos contaminados crus e mal cozidos e água não potável e não tratada. Além disso, as larvas de ancilostomídeos e *S. stercoralis* são liberadas no solo e penetram ativamente na pele do hospedeiro, quando há contato direto, principalmente ao andar descalço no solo contaminado, gerando assim uma lesão cutânea (BRASIL, 2018; OMS, 2020). As infecções por *A. lumbricoides* e *T. trichiura* afetam particularmente as crianças em idade pré-escolar e escolar, enquanto as infecções por ancilostomídeos são mais prevalentes em adultos.

Ressaltasse ainda que, diferentemente de *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos, em infecções por *S. stercoralis*, pode ocorrer a autoinfecção interna, causando casos de hiperinfecção, que pode gerar danos sérios no indivíduo (OMS, 2020).

Após a infecção, esses helmintos se instalam no hospedeiro, se alimentam de tecidos, incluindo sangue e promovem a má absorção de nutrientes, além de competir com vitaminas no intestino (OMS, 2020). Além do mais, os sintomas decorrentes da infecção variam de acordo com a carga parasitária, indo desde casos assintomáticos a diarreias, dores abdominais, palidez, febre, fraqueza, mal-estar geral, perda de sangue podendo levar a anemia. (SANTANA & LOUREIRO, 2017; OMS, 2020).

1.2. Nematoides

O Filo Nematoda compreende os helmintos mais prevalentes. Os principais parasitos humanos são os geo-helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*) e, - *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermiculares* e os helmintos filarídeos *Onchocerca volvulus* e os causadores da Filariose Linfática (*Wuchereria bancroft* e *Brugia malayi*) (REY, 2008).

Os helmintos do Filo Nematoda possuem características morfológicas comuns, como corpo cilíndrico, alongado, não segmentado, pseudocelomados, com simetria bilateral e geralmente com dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos, porém ainda existem algumas espécies monoicas (Figura 1) (TRAVASSOS, 1950).

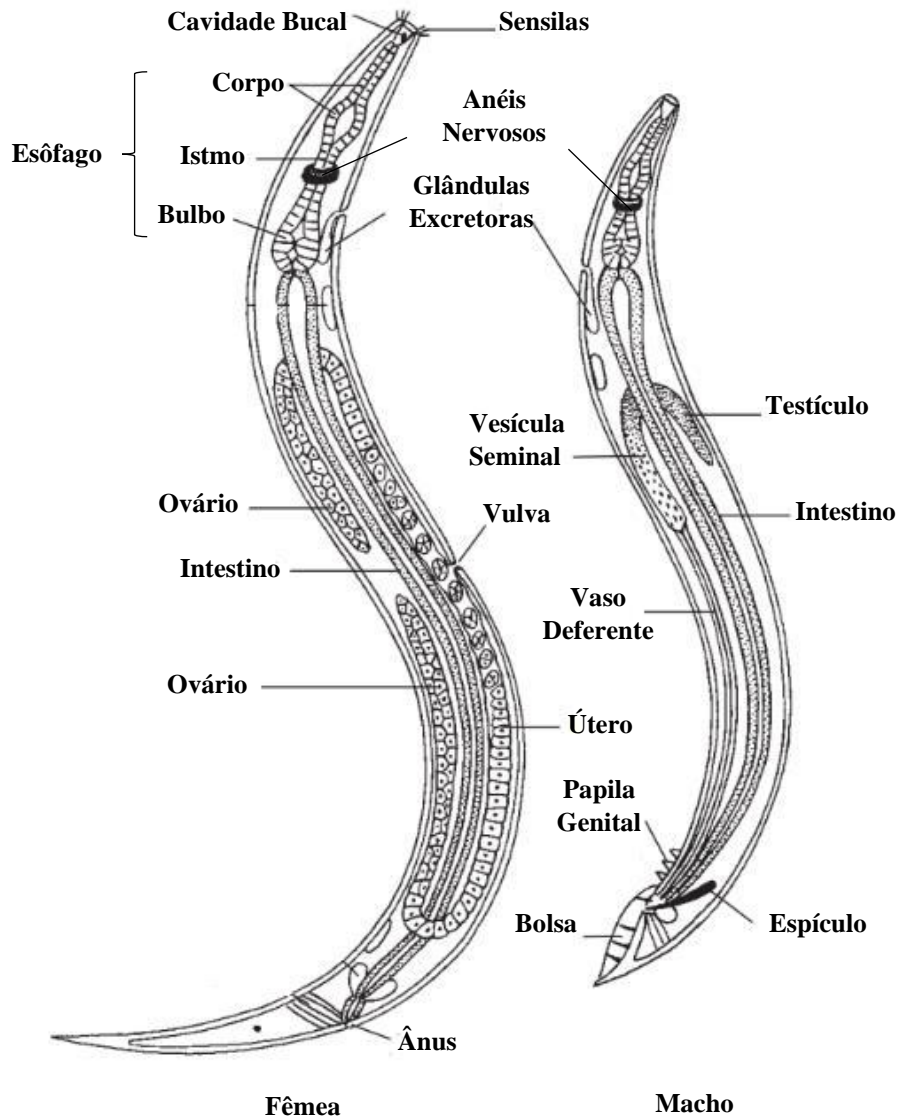


Figura 1 - Morfologia e principais características de um nematoide macho e fêmea. **Fonte:** Adaptado de OBER & GARRISON, 1950.

A parede do corpo (Figura 2) é dividida em cutícula, hipoderme e camada muscular. A cutícula é um revestimento que pode ter aspecto liso, saliências, espinhos ou expansões e desempenha importante função na respiração do animal, permitindo a troca gasosa, na evasão da resposta imune, além de conferir grande resistência no ambiente externo ou interno no hospedeiro (SCMIDT & ROBERTS, 2008). Ela é composta principalmente por colágeno e cuticulinas não colágenas, mas também

proteínas solúveis, lipídeos, glicolipídeos e carboidratos. Apresenta a epicutícula, um revestimento externo rico em carboidratos e importante em processos evasivos do sistema imunológico e é dividida em três regiões: zona cortical, camada mais externa rica em colágeno e proteínas resistentes (cuticulina), zona mediana, uma região elétron-lúcida atravessada por fibrilas, sendo basicamente uma camada de fluido que liga o córtex a zona basal, e a zona basal, camada intimamente ligada ao músculo e que confere uma rigidez circunferencial da parede do corpo (FETTERER & RHOADS, 1993; BALDWIN & PERRY, 2004). Além disso, as aberturas do nematoide, como cavidade bucal, faringe, reto, ducto excretor e poro também são revestidos por uma cutícula, porém, diferentemente da presente no corpo, a cutícula dessas aberturas não é dividida em três zonas e é secretada por células epiteliais subjacentes (WRIGHT & THOMSON, 1981).

A cada estágio larval é realizada a ecdise, ou seja, a renovação da cutícula para permitir o crescimento do nematoide. Dessa maneira, a cutícula presente em cada estágio apresenta diferentes composições quanto a expressão de proteínas, número de camadas e espessura relativa, a fim de adaptar as necessidades de desenvolvimento e também as condições ambientais de vida do parasito (PAGE & JOHNSTONE, 2007). Exemplificando, a cutícula de um nematoide adulto tem aproximadamente 0,5 μm de espessura e é organizada em cinco camadas: a camada superficial, a camada epicuticular, zona cortical, zona mediana e zona basal. Conforme o envelhecimento, a espessura da cutícula adulta estende devido ao aumento da zona basal (COX *et al.*, 1981; HERDON *et al.*, 2002).

A hipoderme é constituída de cordões epidérmicos longitudinais, que se projetam na pseudocele e dividem a musculatura somática em 4 quadrantes. Além disso, apresenta mitocôndrias, grande reserva de glicogênio e desempenha importante função na secreção dos materiais que compõem a cutícula (BIRD & BIRD, 1991). Além de sua principal função na formação da cutícula, a hipoderme é responsável, ainda no desenvolvimento inicial do animal, por organizar a estrutura corporal, depositar componentes da membrana basal, orientar as migrações de células etc. À medida que o nematoide se desenvolve, ela realiza a deposição de novos componentes da cutícula para a ecdise, armazena nutrientes e funciona como uma barreira para a cavidade pseudocelômica. De fato, essa estrutura é fundamental para a sobrevivência do animal (YOCHEM *et al.*, 1998; MICHAUX *et al.*, 2001).

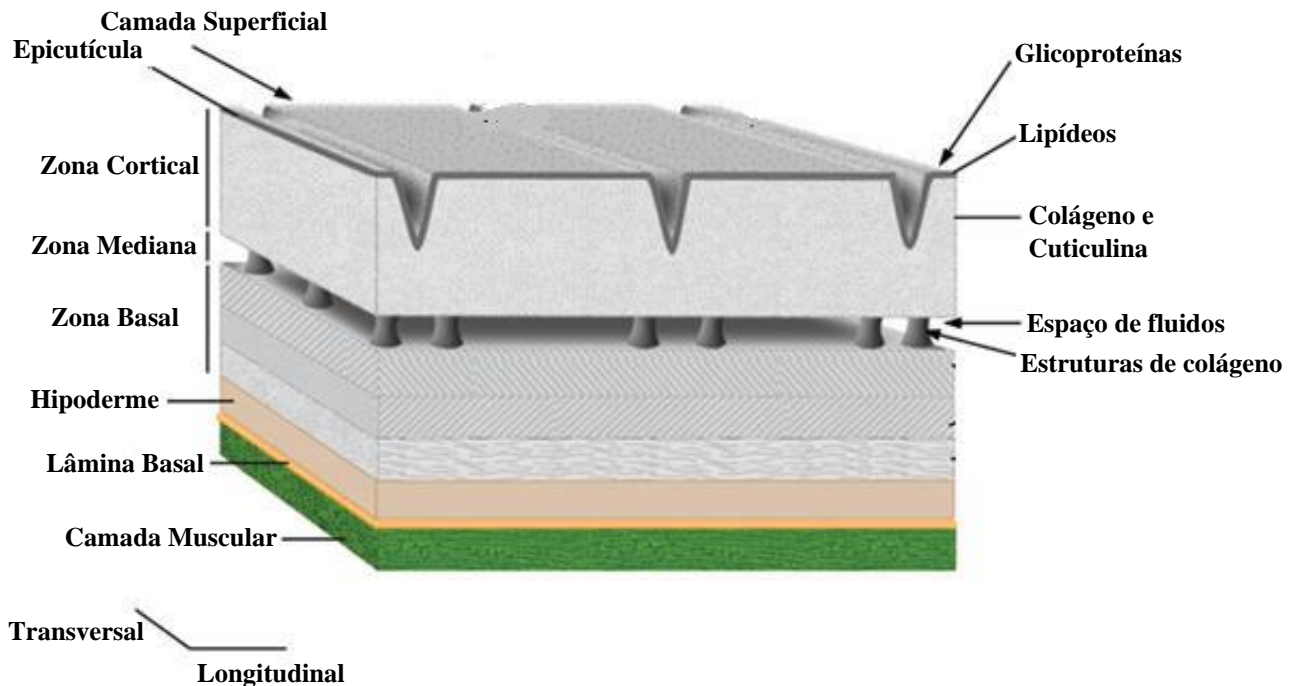


Figura 2 – Esquema da parede corporal de nematoides e componentes moleculares presentes. **Fonte:** Adaptado de BLAXTER & ROBERTSON, 1998.

Outro componente importante da parede corporal dos nematoides é a camada muscular, na qual as células são alongadas conjuntamente ao comprimento do helminto, apresentando uma região contrátil, na porção basal rica em miofibrilas, e uma região não-contrátil, responsável por inervar a parede corporal, enviando prolongamentos nervosos dos miócitos aos cordões epidérmicos. Seu músculo é diferente de qualquer outro, visto que cada sarcômero está ligado perpendicularmente ao local de aplicação da força, a cutícula (FRANCIS & WATERSTON, 1985, 1991; BARTNIK *et al.*, 1986). As células musculares têm diversos conectivos músculo-músculo e se prendem à cutícula por meio das fibras cuticulares que cruzam a membrana basal e a hipoderme. Além disso, apresentam dois tipos de músculos, os somáticos (sarcômeros múltiplos), envolvimento no funcionamento e estrutura do organismo e os não estriados (sarcômero único), referentes a certas funções específicas (BURR & GANS, 1987).

Os nematoides são desprovidos de sistema circulatório e apresentam uma cavidade chamada de pseudocele, com um líquido pseudocelomático, a hemolinfa.

Juntos, eles funcionam como um hidroesqueleto no parasito, proporcionando aporte estrutural e permite o transporte de solutos, como eletrólitos, proteínas, gorduras e carboidratos, de um tecido para o outro (SCMIDT & ROBERTS, 2008). O sistema nervoso é simples, possuindo os anéis nervosos - um aglomerado de elementos nervosos, localizado na região esofágica e outro na região anal, e ambos conectados por troncos nervosos longitudinais de onde partem nervos e gânglios. O sistema nervoso periférico é formado por um conjunto de nervos que se interconectam até as terminações sensoriais dentro da cutícula (CHEN, *et al.*, 2004; LEWBART, 2011). Apesar de apresentarem um sistema nervoso relativamente simples, a sua diversidade neuroquímica é grande, sendo a acetilcolina o principal neurotransmissor excitatório e o ácido gama-aminobutírico (GABA) o inibitório. Além disso, apresentam diversos órgãos sensitivos, como as papilas cefálicas, caudais, cervicais e labiais (BOGITSH *et al.*, 2005).

O sistema digestório é completo, indo de boca a ânus, na qual o alimento ingerido passa pela cavidade bucal e move-se para o esôfago, um órgão de bombeamento que puxa o alimento e força-o para o intestino (GUTIERREZ, 2000). A alta pressão da pseudocele circundante promove o fechamento da boca e do lúmen do esôfago, na qual o alimento percorre pelo esôfago por uma onda constante posterior de movimentos musculares, abrindo o lúmen até que atinja o intestino. Dessa forma, o peristaltismo que permite a passagem do alimento até o intestino não ocorre devido a contração muscular, mas sim pela pressão hidrostática provocada pela pseudocele (SCMIDT & ROBERTS, 2008). O intestino apresenta uma camada fina e simples de células com borda em escova, com mecanismo de absorção eficiente e em alguns helmintos a digestão não é de grande relevância, visto que, a passagem do alimento pelo intestino ocorre de maneira rápida. Ainda assim, a alta pressão hidrostática em torno do intestino promove a excreção de resíduos pelo ânus, principalmente amônia, mas também ureia, aminoácidos, ácidos graxos, dentre outros (LEE, 2003)

O aparelho reprodutor masculino é composto de um testículo, sendo duplo em algumas espécies de vida livre, o ducto espermático e o ducto ejaculador e como órgãos acessórios têm a presença do espículo, podendo ser projetado para fora ou retraído, e a bolsa do espículo, chamado de gubernáculo (BARAN, 2011). O sistema reprodutor feminino apresenta dois ovários, mas em algumas espécies apenas um,

dois ovidutos que são a continuação da parede dos ovários e dois úteros. A ligação do útero com o meio exterior é por meio da vagina, na qual apresenta o poro genital chamado de vulva. No momento da cópula o espículo é introduzido na vulva e os espermatozoides percorrem pelo oviduto até chegarem no útero, na qual funciona como um receptáculo seminal (FOX, 2006). A reprodução ocorre de maneiras diversas, podendo o espermatozoide fecundar o ovócito no útero e a fêmea liberar o ovo fecundado, ou o embrião pode se desenvolver dentro do ovo no meio externo (como é o caso de *Ascaris lumbricoides*), ou ocorre a liberação de larvas, sendo estes nematoides chamados de larvivíparos. No meio externo ou no hospedeiro, a larva se desenvolve em 5 estádios (L1-L5), havendo o processo de ecdise, com a troca da cutícula a cada estágio larval (TRAVASSOS, 1950; NEVES, 2016).

1.2. Controle e Tratamento das Helmintíases

Diversas são as medidas de controle e prevenção contra as infecções helmínticas. A principal e de grande importância é o acesso da população ao saneamento básico adequado com serviços de água potável, tratamento e coleta de esgoto, visto que o acesso a esses serviços é essencial para a melhoria da qualidade de vida das pessoas, eliminação de focos de poluição, redução da incidência de doenças e da mortalidade, principalmente a infantil. As ações de educação em saúde no controle das doenças constituem importantes medidas para que as pessoas tenham consciência e compreensão dos seus problemas, e do processo saúde-doença, para que a partir disso tome iniciativas para mudanças em melhores condições em vida. Atividades como reuniões com a comunidade, palestras, conferências, feiras nas escolas, material educativo e mobilização de profissionais são algumas das fontes de informações e conhecimento para induzir modificações nos hábitos e conduta da população, melhorando assim a eficácia das medidas de controle (BRASIL, 2018). Resumindo, as melhores condições ambientais e de moradia, acesso a água limpa e potável, aumento dos hábitos de higiene e o desenvolvimento de atividades de educação em saúde são essenciais para a eliminação das infecções por helmintos, tendo como requisitos o apoio governamental, o planejamento e o investimento.

No entanto, mesmo que tais medidas sejam de suma importância, a intervenção farmacológica com anti-helmínticos para tratar a população é fundamental na eliminação das helmintíases humanas (LUSTIGMAN *et al.*, 2012; BRASIL, 2018). A quimioterapia preventiva é uma estratégia de controle, na qual se utiliza medicamentos de amplo espectro, afim de reduzir a prevalência da doença e/ou a intensidade de infecção, seja de maneira direcionada para um determinado grupo, como as crianças em idade escolar que são alvos principalmente das geo-helmintíases ou em comunidades inteiras. (LUSTIGMAN *et al.*, 2012; BRASIL, 2018). Segundo a OMS, o tratamento frequente é uma medida preventiva e eficaz para redução da carga parasitária e suas consequências (OMS, 2011; 2018). Tal quimioterapia disponível no mercado abrange fármacos com diferentes características, mecanismo de ação e indicações.

Os fármacos anti-helmínticos atuam diretamente no lúmen intestinal afim de expulsar os parasitos ou apresentam ação sistêmica contra aqueles que se localizam fora do trato intestinal. Contudo, o tratamento de helmintos que habitam os tecidos, como as filárias, não é totalmente eficaz devido a seus ciclos de vida longos e complexos (BRUNTON *et al.*, 2012). Os fármacos anti-helmínticos apresentam dois mecanismos de ação básicos: aqueles que atuam em canais iônicos dos parasitos, como por exemplo a Ivermectina, Pamoato de Pirantel, Praziquantel e Piperazina e aqueles com o mecanismo não envolvendo os canais iônicos, como os Benzimidazólicos (BZs) e Dietilcarbamazina (DEC). Ainda assim, os fármacos podem atuar de forma direta, causando paralisia e morte do helminto ou interferindo no seu metabolismo energético. Os canais iônicos são proteínas de membrana que ao interagir com um ligante, alteram sua conformação e podem se abrir, permitindo o fluxo de íons (KATZUNG *et al.*, 2017). Portanto, a finalidade dos fármacos é ativar ou bloquear os canais iônicos.

A classe dos BZs apresenta atividade contra infecções por geo-helmintos (ascaridíase, tricuriase, ancilostomíase e estrogiloidíase), cisticercose, em combinações com DEC e ivermectina para o tratamento da filariose linfática e dentre outros. É representada principalmente pelos fármacos de amplo espectro Albendazol, Mebendazol e Tiabendazol, sendo o último menos utilizado na clínica devido aos efeitos tóxicos, principalmente no sistema nervoso central, fígado e reações de

hipersensibilidade (BRUNTON *et al.*, 2012). O mecanismo de ação compreende sua ligação à β -tubulina, um constituinte proteico presente nos microtúbulos, inibindo a polimerização dos mesmos, interferindo no metabolismo energético do parasito. Como resultado, ocorre a ruptura do citoesqueleto, além da inibição da absorção de glicose, da secreção de proteínas, redução da atividade enzimática, como a secreção de acetilcolinesterase e o catabolismo de carboidratos (BRUNTON *et al.*, 2012; AGPTEA, 2019). São fármacos altamente eficazes para o tratamento das infecções, são ativos contra as formas larvares, adultas e são também ovicidas, com exceção do Tiabendazol. Apresentam perfil de segurança excelente com poucos ou nenhum efeito adverso. Em relação as características farmacocinéticas, o tiabendazol é hidrossolúvel, enquanto o mebendazol e albendazol são pouco solúveis em solução aquosa, o que facilita sua ação. O mebendazol apresenta baixa biodisponibilidade sistêmica, uma vez que cerca de 95% se ligam às proteínas plasmáticas e são amplamente metabolizados. O albendazol, depois de absorvido é rapidamente metabolizado pelo fígado, gerando o sulfóxido de albendazol, seu potente metabólito ativo (BRUNTON *et al.*, 2012).

Em relação aos fármacos que atuam nos canais iônicos, a Ivermectina pertence à classe das lactonas macrocíclicas e é um análogo semissintético da avermectina B1a (abamectina). É muito utilizada como um antiparasitário de amplo espectro para tratar diversas infecções como ascaridíase, oncocercose, estrogiloidíase, tricuriase e as microfilárias de *W. bancrofti* e *B. malayi* (BRUNTON *et al.*, 2012). Este fármaco atua na ativação dos canais de cloreto regulados por glutamato nas membranas plasmáticas de nematoides, resultando na hiperpolarização de células neuromusculares e paralisia da faringe dos parasitos. Além disso, ela intensifica a ação do GABA nas terminações pré-sinápticas, ativando os receptores, gerando um estado de hiperpolarização e promovendo assim o bloqueio da transmissão neuromuscular e paralisia do helminto. Apresenta uma meia vida longa de aproximadamente 57h, 93% do fármaco está ligado a proteínas plasmáticas e é bem tolerado quase não apresentando efeitos adversos, visto que não atravessa a barreira hematoencefálica (BRUNTON *et al.*, 2012; KATZUNG *et al.*, 2017). Embora a ivermectina sozinha tenha uma eficácia ótima, estudos indicam que sua coadministração com o albendazol é ainda mais eficaz na eliminação dos helmintos transmitidos pelo solo (KNOPP, S *et al.*, 2010). Recentemente, a junção desses

fármacos foi adicionada à Lista de Medicamentos Essenciais da OMS para o tratamento da infecção por geohelmintos (OMS, 2017).

Outro fármaco utilizado na clínica é o pamoato de pirantel, um análogo n-oxifenólico do pirantel e eficaz no tratamento da ascaridíase, enterobíase, e ancilostomíase, bem como é uma alternativa ao tratamento com benzimidazóis (BRUNTON *et al.*, 2012). Ele atua como bloqueador neuromuscular despolarizante, abrindo os canais de cátions não seletivos, induzindo a ativação dos receptores nicotínicos da acetilcolina e promovendo assim a paralisia espástica dos helmintos. Ele age de maneira seletiva nos receptores nicotínicos dos helmintos, visto que estes são diferentes dos receptores dos mamíferos, e dessa maneira apresentam poucos efeitos adversos no hospedeiro (ROBERTSON *et al.*, 1994).

A piperazina é um anti-helmíntico muito tolerado e altamente satisfatório contra *A. lumbricoides* e *E. vermiculares* (BRUNTON *et al.*, 2012). É um fármaco agonista dos receptores GABA_A, promovendo o aumento do influxo de íons cloreto na membrana dos parasitos, causando hiperpolarização, reduzindo a excitabilidade e gerando assim o relaxamento muscular e paralisia flácida do corpo do helminto (MARTIN, 1985).

O praziquantel é um derivado da pirazinoisoquinolona e é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose causada pelas espécies de *Schistosoma* que infectam o ser humano e também a teníase (BRUNTON *et al.*, 2012). O mecanismo de ação exato é desconhecido, porém estudos demonstram que o fármaco aumenta a permeabilidade da membrana do parasito ao cálcio, causando contratilidade muscular e por consequência provocando a paralisia espástica. Em concentrações elevadas, o praziquantel provoca lesão tegumentar e expõe alguns antígenos do tegumento dos platelmintos. Ele é ineficaz contra as formas jovens de *Schistosoma*, não sendo indicado para o tratamento nas infecções agudas (REDMAN *et al.*, 1996; BRUNTON *et al.*, 2012). A farmacocinética do fármaco é dependente da dose, apresentando extenso metabolismo hepático e podendo causar alguns efeitos adversos como desconforto abdominal, cefaleia, náuseas e tontura (MARTIN, 1997).

Embora o tratamento quimioterápico seja eficaz contra as infecções helmínticas e evitando suas consequências, existe a grande problemática da resistência

medicamentosa, ou seja, quando ocorre um aumento significativo no número de espécimes de parasitos, em uma população específica, devido a um impedimento ao fármaco em manter sua eficácia contra os parasitos e que normalmente são sensíveis à ação do fármaco (VIEIRA, 2008). Os mecanismos específicos da resistência estão relacionados à ação dos medicamentos anti-helmínticos, ao passo que os inespecíficos compreendem às alterações no receptor do fármaco ou na modulação da concentração do fármaco. Esta resistência pode ocorrer de diversas maneiras, como: (i) uma alteração no alvo molecular, para que o fármaco não o reconheça e se torne ineficaz; (ii) uma mudança no metabolismo que inativa ou remove o fármaco, impedindo sua ação; (iii) alteração na distribuição do fármaco no organismo alvo, impedindo que o fármaco tenha acesso ao local de ação; ou (iv) uma alteração no gene-alvo para resistir à ação do fármaco (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004). Salienta-se que, a resistência anti-helmíntica pode ocorrer em todas as classes de fármacos utilizados no controle de nematoides parasitas.

Há relatos de resistência para alguns dos anti-helmínticos mais comumente usados, como mebendazol e pirantel, contra ancilóstomos humanos (DE CLERCQ *et al.*, 1997; REYNOLDS *et al.*, 1997), resistência ao praziquantel em esquistossomos (LIANG *et al.*, 2000), resistência do *S. mansoni* à oxamniquina (CIOLI *et al.*, 1992) e existe um alerta em relação ao desenvolvimento de resistência à Ivermectina em programas de combate a oncocercose, que utilizam o mesmo fármaco continuamente por longos períodos (SHOOP, 1993). Destaca-se que, muitos relatos de resistência foram feitos poucos anos após a introdução do fármaco no mercado, refletindo a conciliação de populações de parasitos geneticamente diversificadas, além da pressão de seleção para resistência (KAPLAN *et al.*, 2004; REINEMEYER, 2016). A questão preocupante é que o tempo de resistência tem sido menor do que o período de desenvolvimento de novos medicamentos anti-helmínticos. Ainda assim, é importante destacar que a falta de resposta anti-helmíntica, chamada “eficácia reduzida” não significa necessariamente um caso de resistência medicamentosa, visto que na redução da atividade do medicamento pode estar envolvidas variações farmacocinéticas e dinâmicas, fatores relacionados a formulação, intensidade da infecção, além de fatores relacionados ao próprio hospedeiro (VERCRUYSSSE *et al.*, 2011).

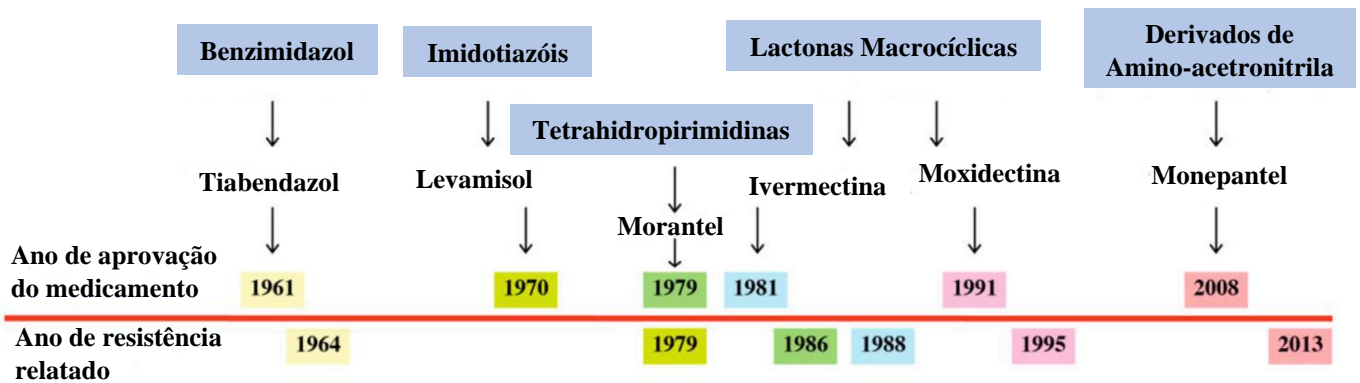


Figura 3 – Ano de aprovação e ano de resistência aos anti-helmínticos relatados em caprinos e ovinos. Em azul, indicam a classe farmacológica pertencentes dos medicamentos. **Fonte:** Adaptado de DRUDGE *et al.*, 1964; WALLER *et al.*, 1986; KAPLAN, 2004.

O desenvolvimento da resistência anti-helmíntica depende de fatores capazes de promover tal situação em questão, principalmente os operacionais, genéticos e bioecológicos. Os fatores operacionais compreendem a frequência de tratamento, visto que quanto maior a pressão do medicamento e sua utilização por tempos prolongados ou abaixo do previsto, mais rápido ocorre a seleção de cepas resistentes, além da rápida rotação de princípio ativo e a subdosagem do medicamento, impedindo que o mesmo atinja 100% de eficácia. Os fatores genéticos são explicados como a dominância dos alelos para resistência, o número e frequência do alelo de resistência inicial, diversidade genética da população, adaptação dos organismos resistentes, além da possibilidade para recombinação genética (MELO *et al.*, 2009; VERCRUYSSSE *et al.*, 2011). Vale ressaltar que, a tendência de sobreviver e resistir a futuras exposições a um fármaco pode ser transmitida hereditariamente e os genes envolvidos dentro de uma população são raros (em torno de 5%). Entretanto, à medida que o agente seletivo é utilizado com frequência, a proporção aumenta e a falha no controle pode aparecer rapidamente (MELO *et al.*, 2009). O tamanho da população em refúgio é o principal fator bioecológico, fenômeno pelo qual alguns espécimes de parasitos não são expostos ao fármaco e conseguem escapar da seleção para resistência. O tamanho do refúgio é influenciado pela população tratada e a proporção da população contida no ambiente que não sofreu a ação dos medicamentos, e ambos são influenciados por fatores climáticos, invulnerabilidade dos estágios de transmissão e prolongamento dos estágios de vida livre (VERCRUYSSSE *et al.*, 2011). Dessa maneira, percebe-se que a resistência medicamentosa aos anti-helmínticos é

um problema crescente e que deve ter grande atenção com estratégias a serem tomadas, principalmente no desenvolvimento de novos medicamentos com novos mecanismos de ação, uma vez que existe um número limitado de anti-helmínticos disponíveis no mercado para o tratamento nos seres humanos.

1.3. Tratamento com fontes alternativas: Produtos Naturais

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos anti-helmínticos na indústria farmacêutica têm sido lento nos últimos 40 anos (PRESTON *et al.*, 2017). Isso ocorre principalmente pelas doenças helmínticas serem negligenciadas, provocando altos custos no desenvolvimento e baixo retorno financeiro para as indústrias. Dessa maneira, a pesquisa por compostos com atividade antiparasitária tem se tornando relevante no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. As plantas são utilizadas desde a antiguidade para fins medicinais e seu uso era baseado na experiência e conhecimento oral, sem comprovações científicas. Com o passar dos anos e os avanços na ciência, diversos fármacos derivados de plantas medicinais foram descobertos e introduzidos no mercado como galantamina, tiotrópio e artemisinina, um antimalárico extraído da planta *Artemisia annua* (LIU & PANDA & LUYTEN, 2020; JAYAWARDENE & PALOMBO & BOAG, 2021). A atividade farmacológica das plantas é decorrente da produção dos metabólitos secundários, compostos que estão envolvidos no crescimento, desenvolvimento, reprodução e proteção do vegetal. Alguns desses compostos ativos isolados de plantas medicinais apresentam atividade anti-helmíntica contra nematoides, principalmente as classes de metabólitos flavonóides, alcalóides, cumarinas, lignóides, triterpenos, saponinas, polifenóis e taninos (OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2019).

O uso de métodos *in vitro* padronizados é muito importante para a avaliação da eficácia dos produtos naturais, sobretudo a determinação de EC_{50} e IC_{50} (concentração efetiva e concentração inibitória, respectivamente) permitindo assim a comparação das atividades de diferentes plantas (BORGES & BORGES, 2016). Muitos estudos na busca por compostos com atividade antiparasitária através de produtos naturais se fazem presentes e um dos sucessos foi a descoberta da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica extraída da planta *Artemisia annua* que é utilizada contra *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, além das formas de

malárias resistentes ao tratamento convencional (RODRIGUES *et al.*, 2006). Na fase sanguínea da infecção, a maior parte das hemoglobinas dos eritrócitos infectados são digeridas e o grupo heme é liberado. Esse grupo heme livre é tóxico, logo, ele ou o ferro ferroso livre, catalisam a abertura da ponte peróxido da artemisinina, gerando radicais livre tóxicos ao parasita, principalmente radicais carbono. Dessa forma, inicia-se uma cascata de reações químicas que provocam a morte do parasito (AGTMAEL *et al.*, 1999; POSNER; O'NEILL, 2004). Afim de superar algumas desvantagens farmacocinéticas, foram obtidos derivados da artemisinina, melhorando assim a eficácia do fármaco, sendo esses derivados a diidroartemisinina (DHA), artemeter e artesunato (JANSE *et al.*, 1994; HO *et al.*, 2014; LOO *et al.*, 2017).

Além do sucesso no tratamento da malária, a artemisinina e seus derivados foram testados no tratamento de outras infecções parasitárias e foram relatados possuindo atividade contra muitos helmintos parasitos. Estudos demonstram alterações fisiológicas importantes e redução significativa na viabilidade de *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis*, *Haemonchus contortus*, em cestodas (*Echinococcus* spp. e *Taenia crassiceps*) e trematódeos (*Schistosoma mansoni* e *Echinostoma* spp.), além de efeitos sinérgicos observados pela combinação de derivados de artemisinina e outros fármacos antiparasitários, por exemplo, combinações de artemeter-triclabendazol e artesunato-tribendimidina resultam em maior eficácia na eliminação de *Fasciola hepatica* e *Clonorchis sinensis* (LAM *et al.*, 2018). Em todos os casos, a artemisinina e seus derivados apresentaram melhor atividade que os fármacos comumente utilizados no tratamento, porém o mecanismo de ação específico ainda não foi completamente elucidado.

Embora já relatada em alguns estudos, a identificação das moléculas ativas é um grande desafio para o conhecimento do potencial do extrato vegetal como uma nova fonte importante na descoberta de medicamentos (MOORE *et al.*, 2017). As propriedades terapêuticas das plantas podem ser atribuídas a uma substância isolada ou a combinação de compostos produzidos pelo metabolismo secundário, e assim como alguns medicamentos tradicionais, a atividade terapêutica dos extratos vegetais também podem funcionar por meio de atividades sinérgicas de moléculas distintas (MOORE *et al.*, 2017; OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2019). A complexidade e diversidade estrutural dos fitocompostos podem permitir sua interação com diferentes alvos moleculares no parasito e, conseqüentemente, podem ajudar a reduzir o rápido

desenvolvimento de resistência, visto que a chance de desenvolvimento de mutações simultâneas em vários genes será significativamente menor (CHAN-PÉREZ *et al.*, 2016). Dessa forma, o sinergismo pode explicar de certa maneira a atividade relativamente baixa de alguns compostos isolados e seu uso combinado com anti-helmínticos sintéticos pode ser útil.

1.5. *Tocoyena bullata*

A Rubiaceae é uma das maiores famílias de plantas dentre as Angiospermas, sendo considerada uma das mais importantes da flora brasileira com 126 gêneros e 1.412 espécies já descritas, e é constituída pelas subfamílias Rubioideae, Ixoroideae e Cinchonoideae, (BARBOSA *et al.*, 2015). A distribuição geográfica dessa família é cosmopolita, ou seja, pode ser encontrada em qualquer lugar do mundo, porém, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais e em menor quantidade nas áreas temperadas e frias (FERREIRA JUNIOR & VIEIRA, 2015). No Brasil, 53% das espécies são endêmicas no país e a região Sudeste é um destaque como um dos principais centros de diversidade desta família no mundo. Na Mata Atlântica, ocorrem 79 gêneros e 580 espécies, o que representa 42% do total de espécies da família (TORRES-LEITE *et al.*, 2018). Além disso, por apresentar significativo número de espécies com hábitos diferentes e diversidade em biomas, a família Rubiaceae é uma fonte promissora de substâncias bioativas, devido a diversidade estrutural de compostos que podem ser encontrados, e que podem servir até de protótipos para medicamentos. Esta família se destaca pelo seu uso medicinal, devido as diversas atividades biológicas relatadas, tais como, anti-inflamatória, analgésica, antiviral, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, anticâncer, anti-helmíntica, antidiabética, antimalárica, hepatoprotetora e antileishmania (CARDOSO *et al.*, 2008).

O gênero *Tocoyena* (Rubiaceae) é característica do Cerrado, mas também ocorre em regiões tropicais como a região Amazônica, integrando 30 espécies de árvores de pequeno porte (HAMERSKI *et al.*, 2005). No Brasil há presença de 12 espécies, sendo cinco nativas do país, e são amplamente distribuídas em todas as regiões brasileiras. Esse gênero pertence à subfamília Ixoroideae e somente quatro espécies de *Tocoyena* possuem perfil químico estudado, sendo elas *T. formosa*, *T. bullata*, *T. brasiliensis* e *T. sellowiana* (BOLZANI *et al.*, 1997). Algumas atividades biológicas já

foram descritas, como anti-inflamatória, antinociceptiva, antifúngica, estimulante em útero de ratas e antioxidante (CESÁRIO, *et al.*, 2019). Dessa forma, os estudos envolvendo essa classe são considerados relevantes visto que a mesma apresenta potencial para a indústria farmacêutica.

A *Tocoyena bullata* é uma espécie nativa do Brasil, encontrada em regiões de restinga, na qual é popularmente conhecida como marmelada da praia, bacochi, louro do brejo e jenipapo bravo (Figura 4) (VIEIRA, 1986). Apesar de poucos estudos fitoquímicos, os iridóides são considerados os principais marcadores quimiotaxonômicos, e além disso, ela é conhecida por biossintetizar flavonóides, triterpenoides, saponinas triterpênicas, derivados fenólicos e alcalóides (SANTOS *et al.*, 2020), metabólitos estes que já apresentam estudos relacionados a sua atividade anti-helmíntica (OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2019). Essa diferença na síntese de metabólitos secundários ocorre devido a variações genéticas, alteração na rota biossintética, variações climáticas e do solo, disponibilidade de água e o ritmo circadiano. Sendo assim, devido a seu potencial farmacológico por apresentar diversos metabólitos secundários com atividades biológicas, as pesquisas envolvendo a *T. bullata* podem contribuir na investigação de novos compostos com possível atividade antiparasitária.



Figura 4 – Folhas e flores de *Tocoyena bullata*. **Fonte:** OLIVEIRA, J. A., 2015; MUSEU NACIONAL/UFRJ, 2022

1.6. Modelo experimental: *Caenorhabditis elegans*

A análise *in vitro* de compostos contra nematoides parasitos apresenta fatores limitantes, como a difícil obtenção de estágios de vida relevantes, ciclo de vida dependente do hospedeiro, alto custo e difícil manutenção, sistemas de cultura *in vitro* complexos e kits de ferramentas moleculares limitados (HAHNEL *et al.*, 2020). Como alternativa às limitações, a utilização de *Caenorhabditis elegans* como modelo tem sido amplamente realizada nos estudos de anti-helmínticos e proporciona um rendimento não alcançável com espécies parasitas. O *C. elegans* é um pequeno nematoide de vida livre, apresenta corpo cilíndrico e não segmentado, em sua grande maioria são hermafroditas autofertilizantes, sendo machos em menor escala e possuem um ciclo de vida curto (3 dias a 25° indo de ovo a helminto adulto) (BARRIÈRE *et al.*, 2014). Apresentam facilidade de manutenção, com meios de cultura simples e de baixo custo, sendo geralmente cultivados em laboratórios em meio ágar contendo a bactéria *Escherichia coli* como fonte alimentar. Além disso, apresentam alta disponibilidade, visto que, por serem hermafroditas autofertilizantes, um único nematoide pode povoar uma placa de cultura, devido a seu tamanho

pequeno, eles podem ser cultivados em um pequeno espaço, as populações podem ser congeladas e revividas quando necessário e a cultura pode ser sincronizada (CORSI *et al.*, 2015). Ainda assim, o *C. elegans* é um importante modelo para estudos genéticos eucarióticos, pelo fato de ter sido o primeiro organismo multicelular a ter uma sequência genômica completa descrita (*C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM, 1998). Dessa forma, percebe-se que tais vantagens consolidam a utilização desse modelo na pesquisa por compostos com atividades anti-helmínticas, devido a sua facilidade e praticidade nos estudos, além do simples manuseio e utilização.

O modelo experimental *C. elegans* apresenta grande progênie e compreende em quatro estágio larvais (L1-L4) e adultos (Figura 5). Quanto a sua morfologia, constitui-se sua parede do corpo a cutícula, hipoderme e camada muscular, sendo a hipoderme responsável por secretar a cutícula - uma barreira altamente impermeável, composta de colágeno, lipídios e glicoproteínas, e que atua na proteção, manutenção da morfologia, integridade corporal e locomoção. A cada estágio de desenvolvimento é realizada a ecdise, ou seja, a troca da cutícula para acomodar o crescimento do nematoide (CHISHOLM & HARDIN, 2005; PAGE & JOHNSTONE, 2007). Vale salientar que, a cutícula é um dos principais alvos de fármacos anti-helmínticos, pois afetando sua integridade, compromete na sobrevivência do helminto. Além dessas estruturas, é possível observar na região interna a faringe, o intestino e nos adultos, as gônadas (Figura 6). Na região interna a epiderme, está a camada muscular que percorre por todo comprimento corporal e a contração e relaxamento dos músculos promovem o movimento sinusoidal do helminto. Além disso, as células musculares enviam projeções para receber as sinapses neuronais, logo, a inervação muscular não é comum (WRIGHT & THOMSON, 1981).

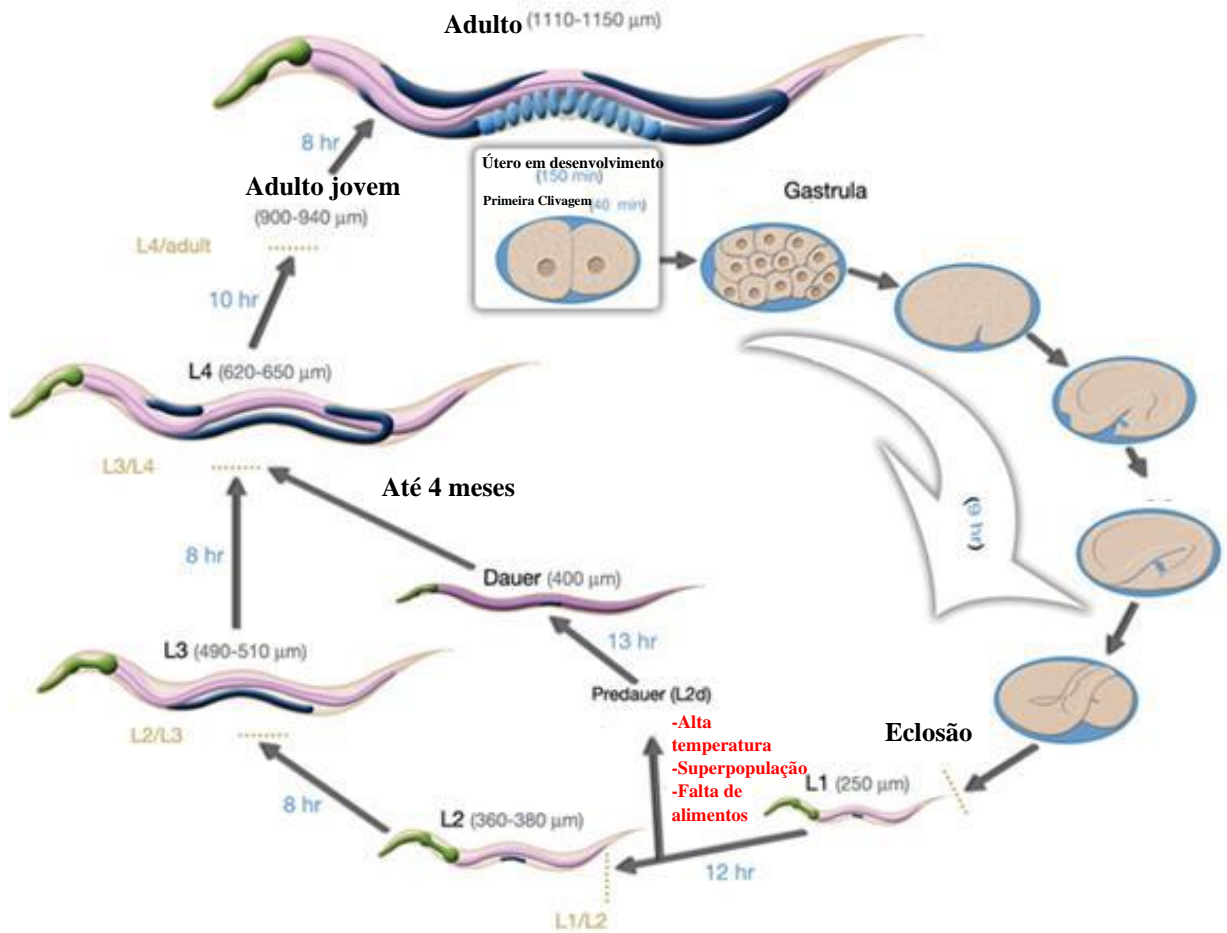


Figura 5 – Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*. As horas em azul indicam o tempo em que o nematoide passa em determinado estágio. Em preto e amarelo, indicam a fase atual de desenvolvimento. **Fonte:** Adaptado de ALTUN & HALL, 2009.

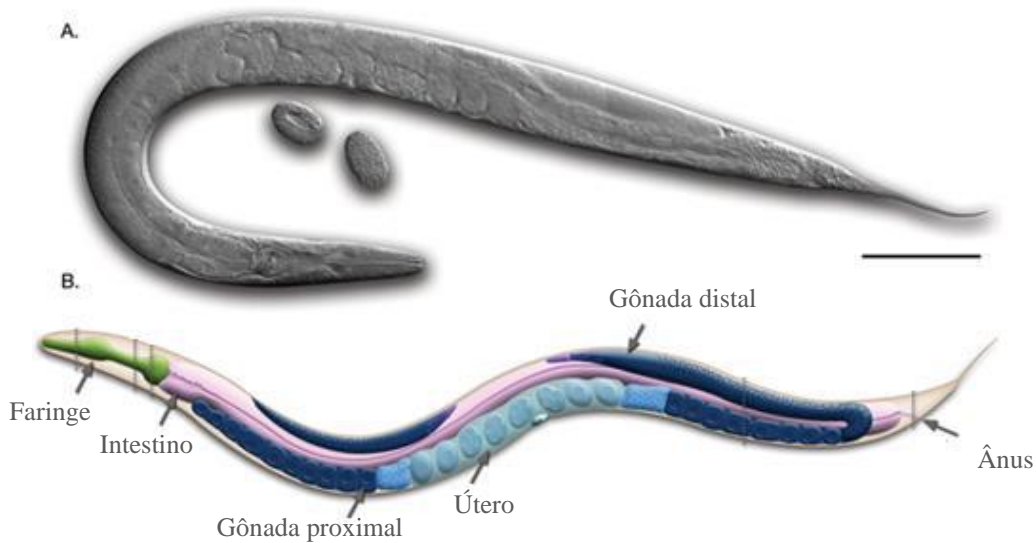


Figura 6 – Morfologia de *C. elegans* adulto hermafrodita. Em A, microscopia óptica com escala de 0,1mm. Em B, esquema das principais estruturas internas. **Fonte:** ALTUN & HALL, 2009.

Quando alimentados, as bactérias (fonte alimentar) entram na porção anterior e passam pela faringe, estrutura de dois lóbulos que realiza o bombeamento neuromuscular para a quebra do alimento antes de atingir o intestino para ocorrer a digestão (AVERY & YOU, 2012). Seu bombeamento depende da quantidade e qualidade do alimento e este é outro importante alvo de fármacos anti-helmínticos, visto que alterando o funcionamento desse órgão, a alimentação do helminto estará comprometida e conseqüentemente sua sobrevivência. Quanto ao seu sistema nervoso, o hermafrodita e o macho apresentam 302 e 383 neurônios, respectivamente, e as células nervosas estão dispersas no anel nervoso (circunda a faringe), nos cordões nervosos ventral e dorsal e na cauda (WRIGHT & THOMSON, 1981). Além disso, apresentam células de suporte semelhante a glia, que estão associadas a neurônios que respondem a estímulos sensoriais, incluindo mecanossensação, termotaxia e quimiotaxia, na qual muitos desses são multifuncionais comparados aos neurônios sensoriais de vertebrados (TROEMEL *et al.*, 1995; SEPÚLVEDA-CRESPO *et al.*, 2020). Em relação ao aparelho reprodutivo, os sexos apresentam diferenças quanto a gônada somática, estruturas sexuais secundárias e o tamanho do corpo, sendo os machos mais finos que os hermafroditas.

A gônada encontra-se no centro do corpo, sendo nos hermafroditas dois tubos em forma de U espelhados e um único lobo em forma de U nos machos. Quanto a estrutura secundária, os machos apresentam a cauda em forma de leque e os hermafroditas a vulva, servindo de saída dos ovos do útero e entrada dos espermatozoides dos machos (EMMONS, 2005; HERMAN, 2006). Assim, percebe-se que o *C. elegans* apresenta uma anatomia relativamente simples e que pode ser facilmente estudado.

O uso do *C. elegans* permitiu compreender diversos parâmetros e ainda contribuiu para o entendimento no ramo da helmintologia e biologia, incluindo genética, desenvolvimento celular e neurobiologia. Foi possível identificar alvos moleculares de fármacos com auxílio da expressão heteróloga para demonstrar genes-alvo de fármacos com potencial antiparasitário (DRISCOLL *et al.*, 1989; DENT *et al.*, 2000; LAW *et al.*, 2015; SLOAN *et al.*, 2015). Além disso, devido a seu sucesso, este modelo colaborou para a hipótese de que existem alvos de fármacos nematocidas altamente conservados (WOODS & LAURET & GEARY, 2007). É fato que o *C. elegans* permite a pesquisa anti-helmíntica, visto que partilha as principais características morfológicas com os nematoides parasitas, abrangendo a presença da cutícula, organização do sistema nervoso e outras propriedades fisiológicas. O sistema neuromuscular, por exemplo, apresenta alto grau de conservação dentro do filo Nematoda, consentindo com hipóteses e conclusões geralmente válidas sobre a motilidade, a postura de ovos e a alimentação. Como exemplo, os receptores para os neurotransmissores acetilcolina, glutamato e GABA são bem conservados e desempenham atividades centrais na maioria das espécies de nematoides (HARDER, 2016). Ressalta-se que não apenas o controle molecular intrínseco, mas também os efeitos comuns de vários anti-helmínticos no sistema neuromuscular manifestam as semelhanças entre *C. elegans* e os principais parasitos pertencentes ao filo (HAHNEL *et al.*, 2020). Ainda assim, existe uma sobreposição genética entre este modelo com algumas espécies parasitas, como por exemplo, *Ascaris suum* e *Haemonchus contortus*, que compartilham cerca de 67-69% de seus genes com *C. elegans* (CONSORTIUM, 2018). Portanto, tais fatos apresentados fundamentam que o *Caenorhabditis elegans* é um excelente modelo para a pesquisa anti-helmíntica.

Os ensaios *in vitro* podem ser realizados isoladamente ou através de um conjunto de testes para pré-rastrear os compostos antes dos estudos *in vivo*. A avaliação da

motilidade do helminto é considerada o padrão ouro para medir a eficácia de fármacos contra nematoides parasitos *in vitro*. Além disso, outros testes como o de eclosão dos ovos, desenvolvimento larval, viabilidade/mortalidade e o de migração larval são considerados parâmetros úteis e válidos na análise dos efeitos anti-helmínticos *in vitro* de novos compostos (BULL *et al.*, 2007; BUCKINGHAM & PARTRIDGE & SATTELLE, 2014). Diversos estudos veem sendo realizados investigando o potencial anti-helmíntico de extratos naturais, na identificação das moléculas ativas e os possíveis mecanismos de ação.

Muitos compostos isolados de plantas e os próprios extratos brutos apresentam atividade nematocida contra o modelo *C. elegans*. Um estudo fitoquímico de *Hypericum roeperianum* resultou em dez compostos, na qual o 3-geranil-1-(2'-metilbutanoil)-floroglucinol, da classe do acilfloroglucinol, mostrou atividade anti-helmíntica significativa contra *C. elegans*, provocando a morte de 37% da população testada após 30 min de tratamento a 100 µg/mL (285,3 µM) (FOBOFOU *et al.*, 2015). O totatol, um diterpeno da classe dos terpenos, isolado da *Juniperus procera* mostrou potente atividade nematicida contra *C. elegans* a 80 µg/mL (279,3 µM) (SAMOYLENKO *et al.*, 2008). Três compostos isolados da *Warburgia ugandenses* foram purificados por Liu *et al.* (2018), na qual o poligodial, um sesquiterpeno dialdeído da classe dos terpenos, foi ativo contra diversas cepas mutantes de *C. elegans*, resistentes às principais classes de medicamentos anti-helmínticos, indicando que esse composto pode atuar por um mecanismo distinto dos fármacos atualmente comercializados. Os autores demonstraram ainda que o poligodial inibe a síntese mitocondrial de ATP de *C. elegans* de maneira dependente da concentração. Ainda assim, o estudo realizado por MACHADO *et al.* (2015) demonstrou a atividade de frações de diclorometano e acetato de etila do extrato da folha de *Annona crassiflora*, rica em alcaloides, contra *C. elegans*. Metabólitos encontrados nessas frações, como ácido fórmico e o ácido γ-aminobutírico, são tóxicos e promovem paralisia muscular do nematoide.

Dessa forma, a avaliação de extratos naturais de plantas com atividade anti-helmíntica e posteriormente isolamento da(ais) molécula(as) e investigação do seu mecanismo de ação, pode ser realizada com êxito no modelo experimental *Caenorhabditis elegans*.

2. Justificativa

As infecções por helmintos parasitos causam um impacto significativo na saúde humana, afetando principalmente os países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, na qual carecem de saneamento básico, não tem acesso a água limpa e potável e que não apresentam hábitos de higiene adequados. Além disso, os medicamentos anti-helmínticos disponíveis no mercado atualmente são muito limitados, visto que existem poucas opções de tratamento quando comparados a outras doenças e que, paralelamente a isso, seu uso extensivo e errôneo durante décadas levou ao aumento da resistência medicamentosa, reduzindo ainda mais as opções terapêuticas eficazes.

Considerando que os produtos naturais são utilizados há décadas no tratamento de enfermidades e que apresentam grandes propriedades biológicas, se faz necessário o seu uso para a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos anti-helmínticos novos e inovadores, com diferentes mecanismos de ação, afim de superar a resistência dos medicamentos convencionais, e desta forma, obter fármacos eficazes.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-helmíntica do extrato bruto da planta *Tocoyena bullata* no modelo experimental *Caenorhabditis elegans*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do extrato bruto de *T. bullata* na eclosão das larvas L1 de *C. elegans*.
- Avaliar o efeito do extrato bruto de *T. bullata* na sobrevivência das larvas L3-L4 de *C. elegans*.
- Avaliar o efeito do extrato bruto de *T. bullata* na sobrevivência dos adultos de *C. elegans*.
- Avaliar o efeito do extrato bruto de *T. bullata* na morfologia das larvas e dos adultos de *C. elegans* por microscopia de luz.

4. Metodologia

4.1. Manutenção de *C. elegans*

A cepa N2 de *C. elegans* do tipo selvagem, obtida do Caenorhabditis Genetics Center, foi cultivada em meio NG (Nematode Growth: 3g de NaCl, 25g de Ágar, 2,5g de Bacto-peptona, 1mL de colesterol em etanol a 5mg/mL, 1mL de CaCl₂ (1mM), 1mL de MgSO₄ (1mM), 25mL de KPO₄ (1mM) em 1L de água) e semeados com *Escherichia coli*, cepa OP50, a 20°C, conforme descrito por Brenner (1974) (SANT'ANNA *et al.*, 2013).

4.2. Extrato Bruto de *Tocoyena bullata*

O extrato bruto etanólico obtido das folhas de *Tocoyena bullata* foi cedido pela Prof^a Dr^a Michelle Frazão Muzitano (LPBio/UFRJ), e a mesma foi coletada no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, que compreende os municípios de Macaé, Quissamã e Carapebus. Posteriormente, o extrato foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção das concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL no meio de incubação. A concentração máxima de DMSO foi de 0,01% em todos os ensaios e o mesmo também foi adicionado como controle

4.3. Atividade anti-helmíntica

4.3.1 Sincronização da cultura para obtenção das diferentes formas de vida de *Caenorhabditis elegans*

Os adultos foram coletados do meio NG através da lavagem da placa com tampão M9 (3g de KH₂PO₄, 6g de Na₂HPO₄, 5g de NaCl, 1mL de MgSO₄ (1mM) em 1L de água) e centrifugados por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet incubado com a solução de lise (1mL de hipoclorito 4 a 6% e 0,5mL de NaOH 5M) por no máximo 5 minutos. Após esse tempo, o pellet foi lavado três vezes com tampão M9 (SANT'ANNA *et al.*, 2013). Essa sincronização da cultura é realizada para obter apenas os ovos. Para análise da eclosão de L1, os ovos foram incubados no dia que foi realizada a sincronização. Para análise do efeito na sobrevivência de L3-

L4 e adultos, os ovos foram incubados em meio NG suplementado com *E. coli* por 30 horas e 72 horas, respectivamente.

4.3.2 Tratamento dos ovos para avaliação da eclosão de L1

Os ovos obtidos no dia da sincronização foram lavados com tampão M9 e incubados cerca de 30 espécimes em cada poço em uma placa de 24 poços, com meio S Basal (2,925g de NaCl, 0,5g de K₂HPO₄, 3g de KH₂PO₄, 0,5mL de colesterol em etanol a 5mg/mL em 500mL de água), suplementada com *E. coli* e as diferentes concentrações do extrato da *T. bullata* a 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, por 24h a 20°C. Os grupos controles estavam sem tratamento e com DMSO 0,01%. Após cerca de 24h, quando já deveria haver eclosão de L1, foram contadas as larvas L1 eclodidas em cada condição e calculada a porcentagem de eclosão de L1. Três experimentos independentes foram realizados (SANT'ANNA *et al.*, 2013).

4.3.3 Ensaio de sobrevivência de larvas L3-L4 de *C. elegans*

Ovos de *C. elegans* foram obtidos conforme descrito na seção 4.3.1, colocados na placa de cultura contendo meio NG e semeado com *E. coli*. Após 30h, quando as larvas atingiram o estágio L3-L4, foram incubados cerca de 30 espécimes em cada poço, numa placa de 24 poços, com o meio S Basal, suplementada com *E. coli* e as diferentes concentrações do extrato de *T. bullata* a 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, por 24h a 20°C. Os grupos controles estavam sem tratamento e com DMSO 0,01%. Ao fim, foram contados os helmintos vivos e mortos e, calculado o percentual de sobrevivência. Os parâmetros de sobrevivência utilizados foram a movimentação do corpo e do esfôago bulbo faringeal. Três experimentos independentes foram realizados (SANT'ANNA *et al.*, 2013).

4.3.4 Ensaio de sobrevivência de adultos de *C. elegans*

Ovos de *C. elegans* foram obtidos conforme descrito na seção 4.3.1, colocados na placa de cultura contendo meio NG e semeado com *E. coli*. Após 72h, quando as larvas atingiram o estágio adulto, foram incubados cerca de 30 espécimes em cada poço, numa placa de 24 poços, com o meio

S Basal, suplementada com *E. coli* e as diferentes concentrações do extrato de *T. bullata* a 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, por 72h a 20°C. Os grupos controles estavam sem tratamento e com DMSO 0,01%. Ao fim, foram contados os helmintos vivos e mortos e, calculado o percentual de sobrevivência. Os parâmetros de sobrevivência utilizados foram a movimentação do corpo e do esôfago bulbo faringeal. Três experimentos independentes foram realizados (SANT'ANNA *et al.*, 2013).

4.4 Cálculo do IC₅₀ e análises estatísticas.

Os percentuais de eclosão de L1, sobrevivência de L3-L4 e adultos foram plotados em função das concentrações do extrato de *T. bullata*. Para o cálculo do IC₅₀ (concentração inibitória do extrato necessária para matar 50% dos helmintos), esses percentuais foram plotados em função da concentração dos compostos utilizando-se uma análise não-linear com o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., EUA). As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (One Way ANOVA, Tukey pós teste) utilizando-se o mesmo programa e significância aceita se $p < 0,05$ (SANT'ANNA *et al.*, 2013). Todos os grupos foram comparados entre si, e as diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas.

4.5 Análise morfológica das diferentes formas de vida de *C. elegans* tratados com o extrato bruto de *Tocoyena bullata*

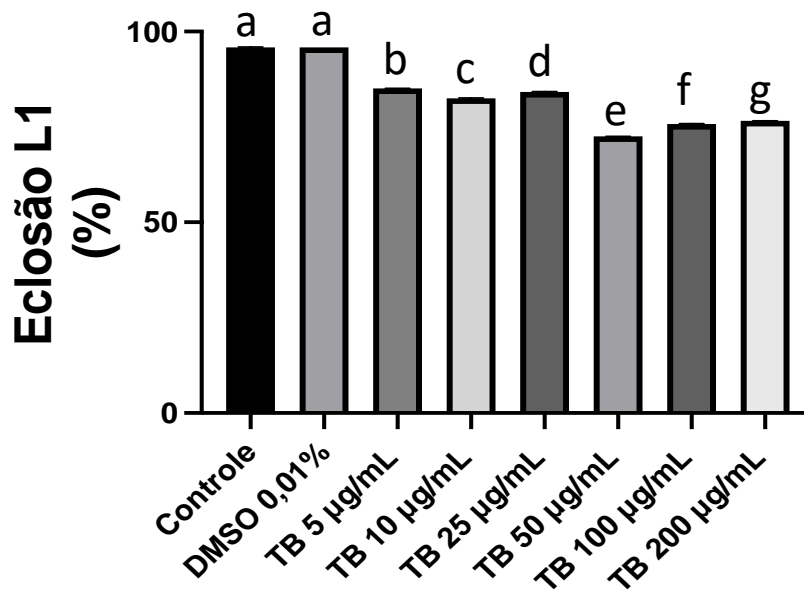
4.5.1 Microscopia de Luz

As larvas L1 obtidas dos ensaios com os ovos, larvas L3-L4 e adultos das diferentes condições de tratamento foram fixados em AFA (ácido acético glacial, formol 37% e álcool etílico 70%). Posteriormente, foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, transferidas com micropipetas para lâminas de vidro e observadas em microscópio óptico Olympus BX51 acoplado a câmera digital Olympus DP-71 para obtenção das micrografias (SANT'ANNA *et al.*, 2013). Esta etapa foi realizada na Unidade Integrada de Imagem do NUPEM/UFRJ – campus Macaé.

5. Resultados

5.1. Efeito do extrato bruto de *Tocoyena bullata* na eclosão de larvas L1 de *Caenorhabditis elegans*

O gráfico da Figura 7 demonstra o percentual de eclosão de L1 nas diferentes condições experimentais e nas concentrações crescentes do extrato. Observa-se que houve uma diminuição estatisticamente significativa na eclosão das larvas em todas as concentrações do extrato testadas, com um perfil semelhante entre elas. O IC_{50} encontrado foi de 344,7 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 7).

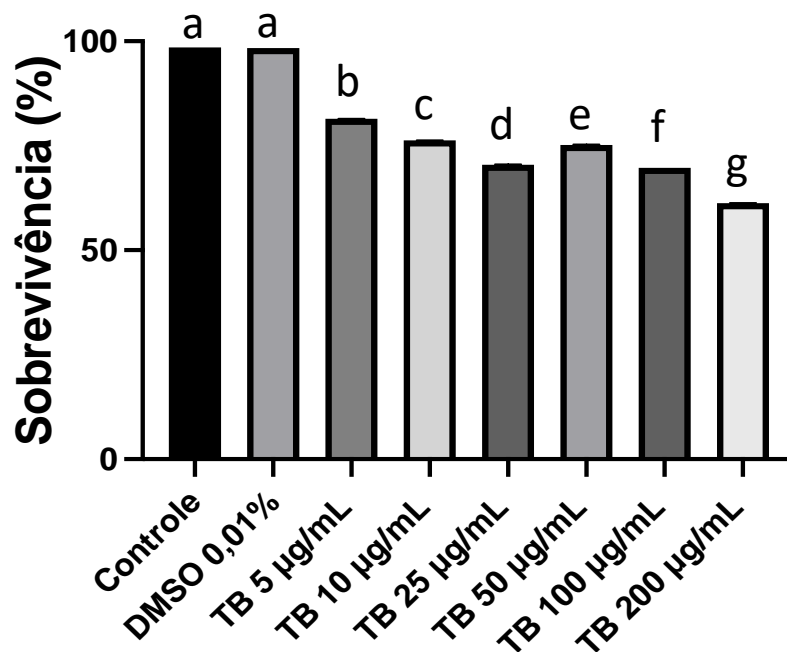


$$IC_{50} = 344,7 \mu\text{g/mL}$$

Figura 7 – Percentual de eclosão de L1 de *Caenorhabditis elegans* não tratados e tratados com o extrato bruto de *Tocoyena bullata*. Resultado de 24 horas de incubação em diferentes concentrações. Os valores são a média \pm e Erro Padrão da Média (EPM) de três experimentos em triplicata. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$; One-way ANOVA, Tukey pós-teste).

5.2. Efeito do extrato bruto de *Tocoyena bullata* na sobrevivência de larvas L3-L4 de *Caenorhabditis elegans*

Para a análise do efeito de *T. bullata* na sobrevivência de larvas L3-L4 de *C. elegans*, foi plotado o gráfico que indica o percentual de sobrevivência em função da concentração do extrato. Observa-se que houve diminuição estatisticamente significativa da sobrevivência de L3-L4 em todas as concentrações testadas, porém uma eficácia maior na maior concentração de 200 µg/mL. O IC₅₀ encontrado foi de 194,6 µg/mL (Fig.8).



$$IC_{50} = 194,6 \mu\text{g/mL}$$

Figura 8 – Percentual de sobrevivência de larvas L3-L4 de *Caenorhabditis elegans* não tratados e tratados com o extrato bruto de *Tocoyena bullata*. Resultado de 48 horas de incubação em diferentes concentrações. Os valores são a média \pm e Erro Padrão da Média (EPM) de três experimentos em triplicata. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$; One-way ANOVA, Tukey pós-teste).

5.3. Efeito do extrato bruto de *Tocoyena bullata* na sobrevivência de adultos de *Caenorhabditis elegans*

Para a análise da ação de *T. bullata* na sobrevivência de adultos de *C. elegans*, foi plotado o gráfico que mostra o percentual de sobrevivência em função da concentração do extrato. O extrato bruto da *T. bullata* diminuiu de forma significativa a sobrevivência dos adultos, com efeito dependente da concentração. A maior concentração de 200 µg/mL se mostrou a mais eficaz. O IC₅₀ encontrado foi de 32,12 µg/mL (Fig. 9).

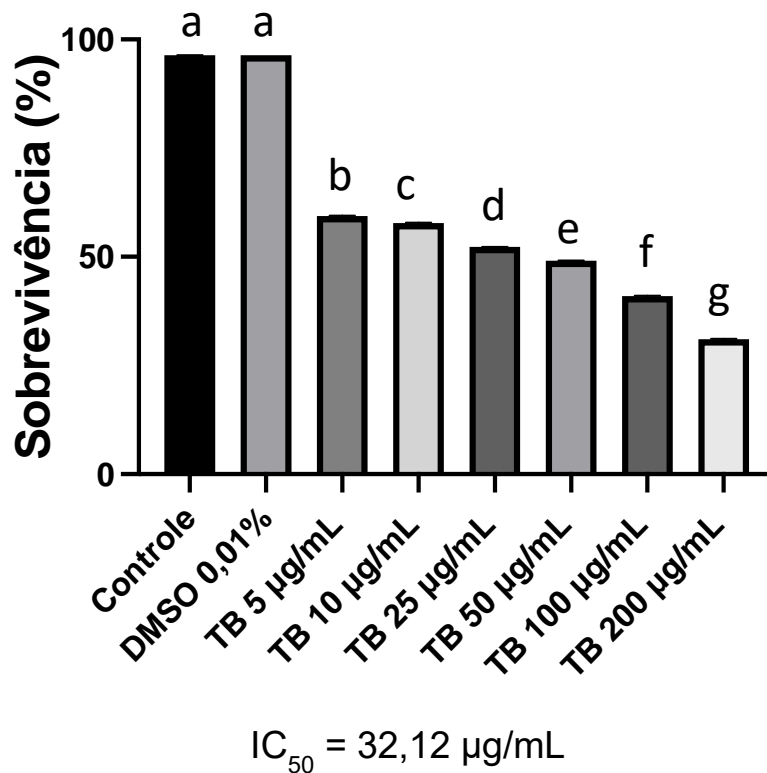
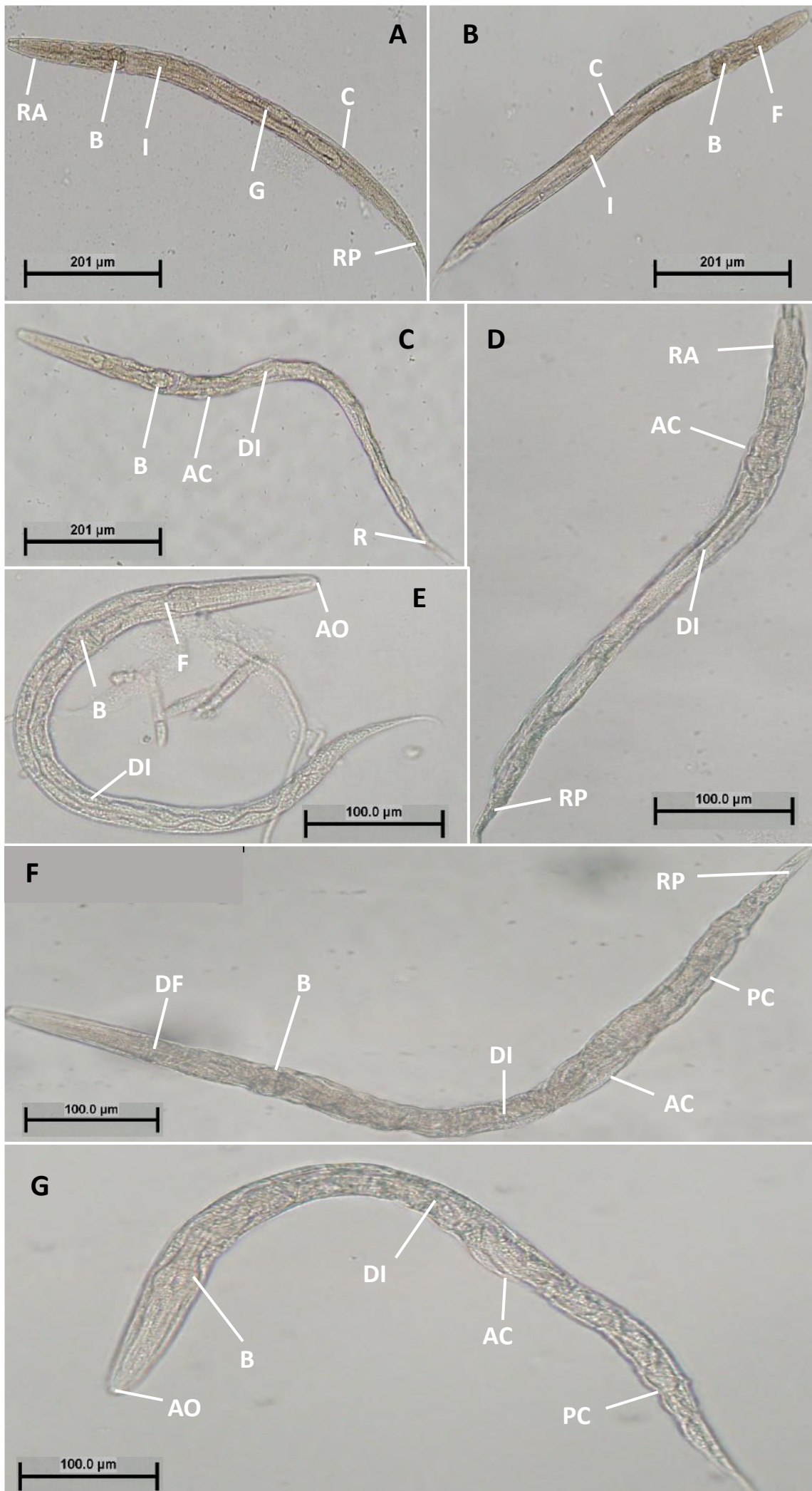


Figura 9 – Percentual de sobrevivência de adultos de *Caenorhabditis elegans* não tratados e tratados com o extrato bruto de *Tocoyena bullata*. Resultado de 72 horas de incubação em diferentes concentrações. Os valores são a média ± e Erro Padrão da Média (EPM) de três experimentos em triplicata. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$; One-way ANOVA, Tukey pós-teste).

5.4. Análise morfológica do efeito do extrato bruto de *Tocoyena bullata* em larvas L3-L4 de *Caenorhabditis elegans*

A microscopia óptica permite visualizar órgãos internos como a faringe, bulbo, intestino e gônadas, devido a transparência do nematoide, e dessa forma avaliar as alterações ocorridas. O grupo controle e o tratado com DMSO 0,01%, diluente do extrato bruto, são utilizados como padrões de referência para avaliar as modificações com os grupos que receberam o tratamento com o extrato da *T. bullata*. A integridade morfológica é mantida em ambos os grupos, com os órgãos internos intactos e sem alterações na cutícula (Fig. 10A, B). É possível perceber uma intensa degeneração interna (DI), principalmente no intestino, e alterações cuticulares (AC) com a formação de vacúolos, em todos os grupos tratados com o extrato (Fig. 10C - K). Além disso, os grupos tratados com TB 25 e 50 µg/mL, apresentaram pregueamento da cutícula (PC), com grande deformação da mesma (Fig. 10F, G). O extrato na concentração de 5 µg/mL e na maior concentração de 200 µg/mL foi capaz de causar uma intensa degeneração e desorganização da região anterior (RA) do nematoide, não sendo possível delimitar a faringe e o bulbo (Fig. 10D, J). Além do mais, nos tratados com o extrato 25 e 100 µg/mL, é possível perceber uma dilatação da faringe (DF), com aumento do tamanho da mesma (Fig. 10F, H).



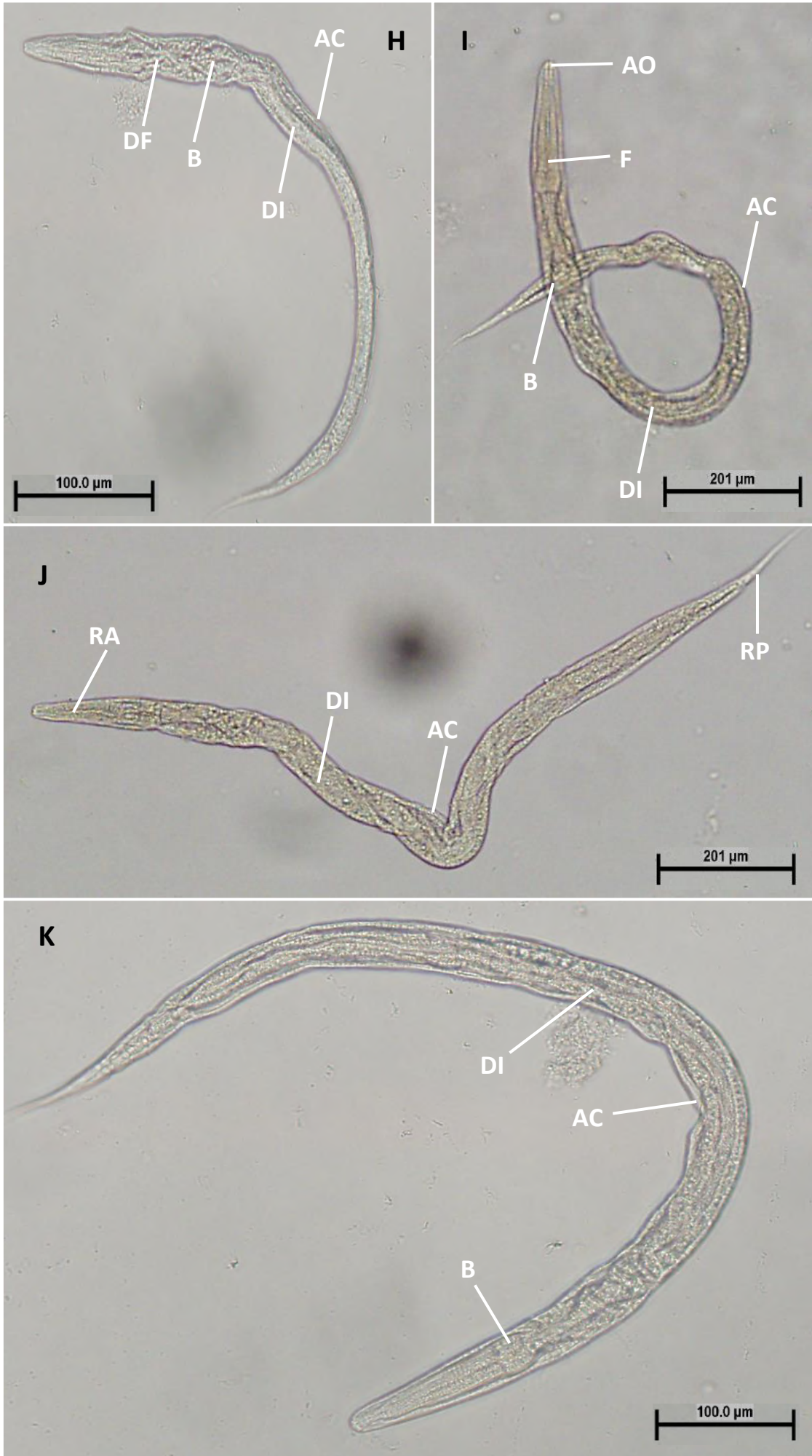
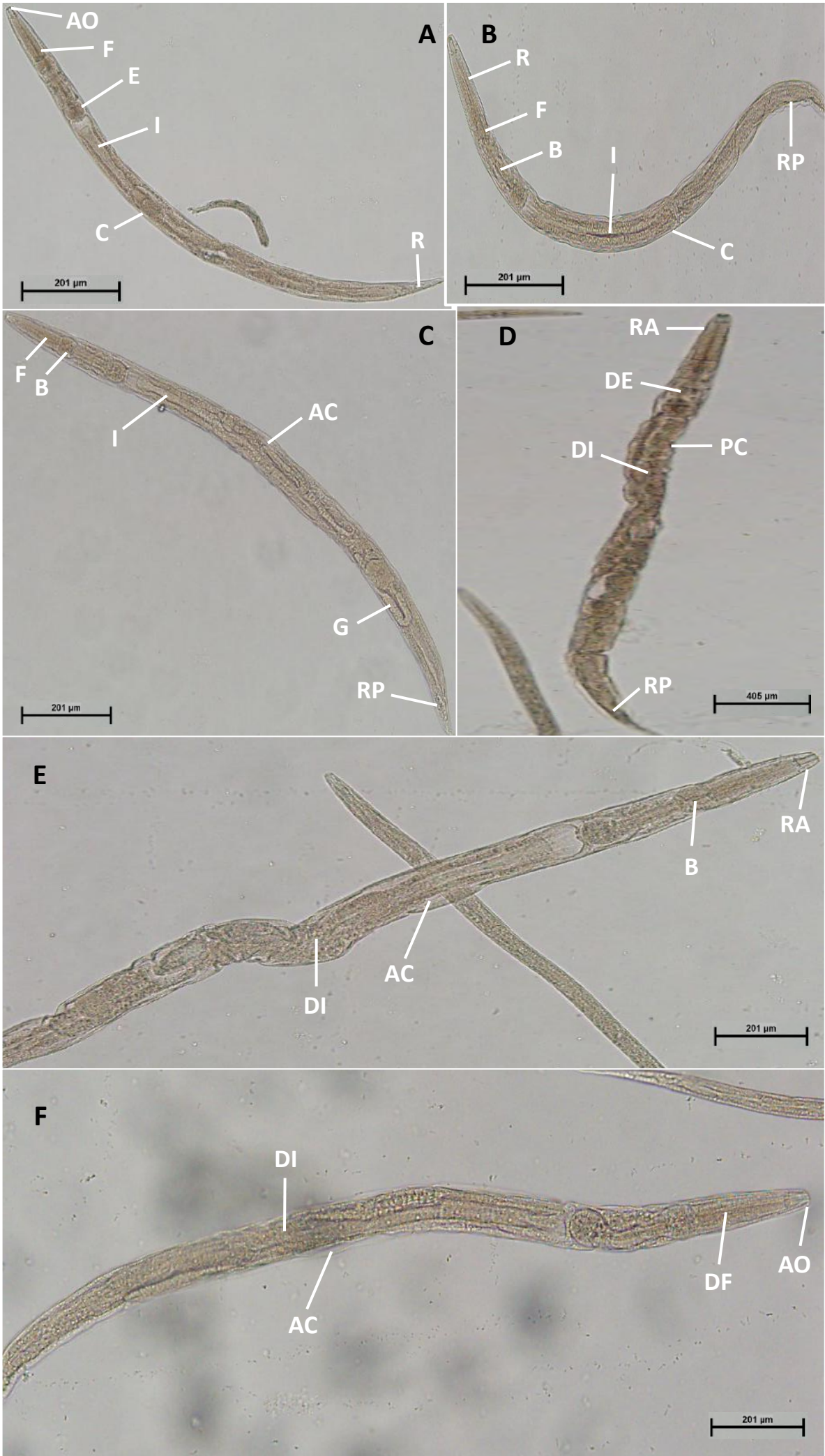


Figura 10 (A-K) – Micrografias ópticas de larvas L3-L4 de *C. elegans* não tratados e tratados com extrato bruto de *T. bullata*. **A** - Larvas do grupo controle não tratados mostrando região anterior (RA) e região posterior (RP), bulbo (B), intestino (I), gônada (G) e cutícula (C) íntegros, sem nenhuma alteração. **B** - Larvas tratadas com DMSO 0,01% mostrando bulbo (B), faringe (F), intestino (I) e cutícula (C) sem alterações. **C, D** - Larvas tratadas com o extrato bruto 5 µg/mL com degeneração interna (DI), alteração cuticular (AC) e degeneração da região anterior (RA). **E** - Larvas tratadas com o extrato bruto 10 µg/mL apresentando degeneração interna (DI). **F** - Larvas tratadas com o extrato bruto 25 µg/mL com dilatação da faringe (DF), degeneração interna (DI), alteração cuticular (AC) e pregueamento da cutícula (PC). **G** - Larvas tratadas com o extrato bruto 50 µg/mL com degeneração interna (DI), alteração cuticular (AC) e pregueamento da cutícula (PC). **H, I** - Larvas tratadas com o extrato a 100 µg/mL com degeneração da faringe (DF), degeneração interna (DI) e alteração cuticular (AC). **J, K** - Larvas tratadas com extrato bruto a 200 µg/mL com degeneração da região anterior (RA), degeneração interna (DI) e alteração cuticular (AC). O valor das barras está indicado em cada figura.

5.5. Análise morfológica do efeito do extrato bruto de *Tocoyena bullata* em adultos de *Caenorhabditis elegans*

O grupo controle e o grupo tratado com DMSO 0,01%, referências de padrão morfológico, apresentaram órgãos internos como faringe, bulbo, esôfago e intestino, intactos, sem nenhuma deformação, e também a cutícula íntegra, com ausência de alterações (Fig. 11A, B). Exceto o grupo tratado com TB 5 µg/mL, todos os outros tratados com o extrato bruto apresentaram degeneração interna com deformação de seus órgãos internos (Fig. 11D - L). Os tratados com TB 10, 50 e 200 µg/mL apresentaram uma exorbitante degeneração de seus órgãos internos, não sendo possível as suas identificações; e na concentração de 10 µg/mL é possível perceber descamação e danos severos da cutícula por todo o corpo do nematoide. Além disso, o extrato provocou intensa alteração do esôfago (Fig. 11D, H, I, K). Nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, foi possível identificar o fenômeno “endotokia matricida”, também chamado de eclosão intrauterina, na qual os ovos eclodem ainda dentro dos adultos e liberam suas larvas (Fig. 11G, I). Ressalta-se que na concentração de 50 µg/mL, tal fenômeno foi tão intenso, que houve deterioração quase que por completa dos órgãos internos do adulto. Além disso, os ovos dos tratados com o extrato de TB a 25, 100 e 200 µg/mL, apresentaram um aspecto morfológico em processo de deformação (Fig. 11G, J, K).



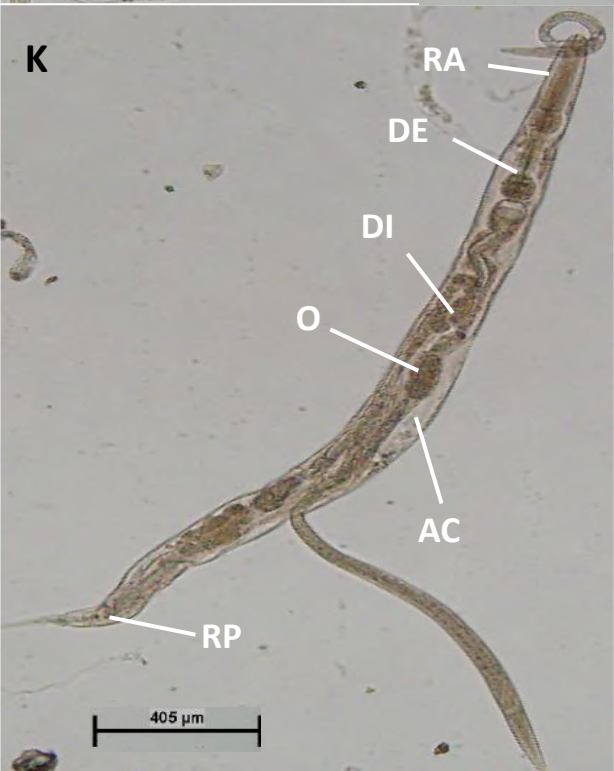
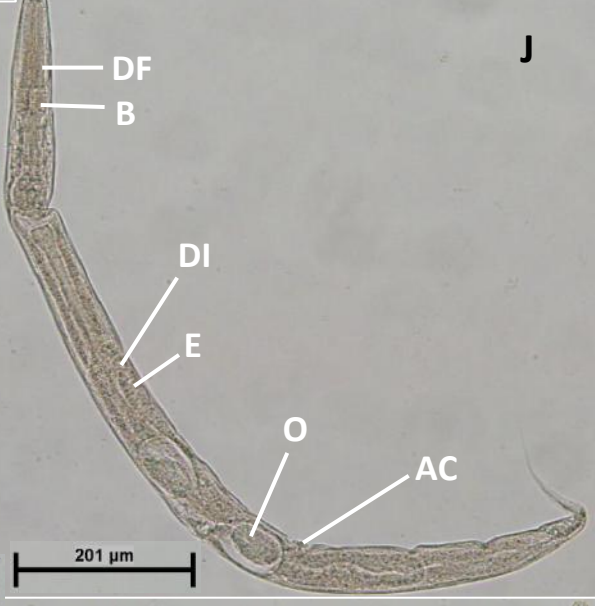
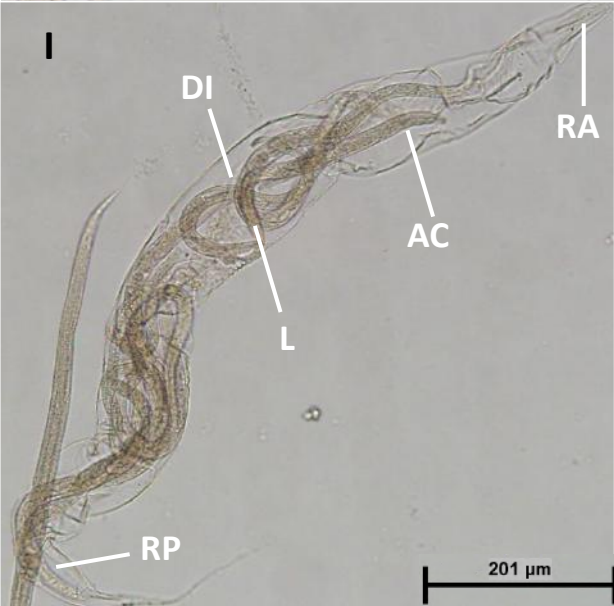
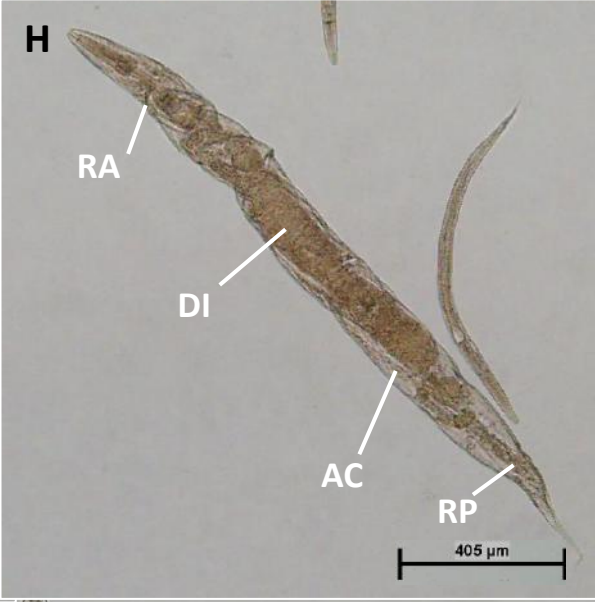
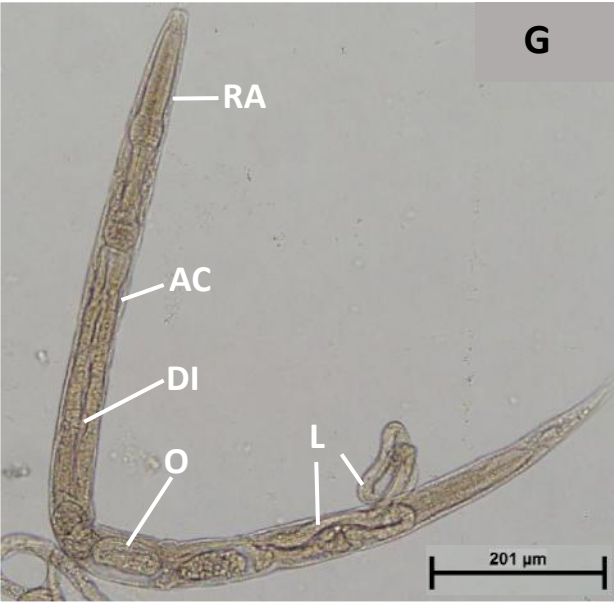


Figura 11 (A-J) – Micrografias ópticas de adultos de *C. elegans* não tratados e tratados com extrato bruto de *T. bullata*. **A** - Adultos do grupo controle não tratados mostrando abertura oral (AO) e região posterior (RP), faringe (F), esôfago (E), intestino (I) e cutícula (C) íntegros, sem nenhuma alteração. **B** – Adultos tratados com DMSO 0,01% mostrando região anterior (RA), faringe (F), bulbo (B), intestino (I) e cutícula (C) sem alterações. **C** - Adultos tratados com o extrato bruto 5 µg/mL com a presença das gônadas (G) e alterações cuticulares (AC). **D, E** - Adultos tratados com o extrato bruto 10 µg/mL apresentando intensa degeneração interna (DI), degeneração do esôfago (DE), alterações cuticulares (AC) e pregueamento da cutícula (PC) por todo o corpo. **F, G** - Adultos tratados com o extrato bruto 25 µg/mL com dilatação da faringe (DF), degeneração interna (DI), alteração cuticular (AC), a presença de ovos (O) e larvas (L) que foram liberadas em seu interior. **H, I** - Adultos tratados com o extrato bruto 50 µg/mL com intensa degeneração interna (DI), degeneração do esôfago (DE) alteração cuticular (AC) e larvas (L) liberadas em seu interior. **J** - Adultos tratados com o extrato a 100 µg/mL com dilatação da faringe (DF), degeneração interna (DI), presença de embriões (E), ovos (O) e alteração cuticular (AC). **K, L**- Adultos tratados com extrato bruto a 200 µg/mL com intensa degeneração interna (DI), degeneração do esôfago (DE), presença de ovos (O) e alteração cuticular (AC) com a presença de vacúolos. O valor das barras está indicado em cada figura.

6. Discussão

Os produtos naturais são utilizados há anos no tratamento de doenças em humanos e animais com base nas experiências, sem nenhum conhecimento racional. Posteriormente, esse cenário foi evoluindo com a descoberta e isolamento do analgésico morfina (ANATASOV *et al.*, 2015; JAYAWARDENE *et al.*, 2021). Tais produtos são muito utilizados como plantas medicinais e também pela indústria farmacêutica, caracterizando-se como um ponto de partida para a pesquisa e descoberta de novos candidatos a fármacos. Isso é válido, tendo em vista que quase um quarto dos medicamentos utilizados e prescritos atualmente são derivados de plantas ou de metabólitos derivados das mesmas (ROMERO-BENAVIDES *et al.*, 2017).

A utilização de produtos naturais tem sido sugerida como uma alternativa para o controle de doenças parasitárias em vários países, no entanto, sua correta indicação clínica só poderá ocorrer mediante comprovação científica de plantas classificadas como medicinais (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2005). Dessa maneira, sua utilização gerou respostas positivas, como baixo impacto ambiental e ausência de resíduos indesejáveis em produtos de origem animal, como carne e leite (CANOVA,

2016). Ainda assim, sua aplicação tem se expandido conforme o aumento da resistência a medicamentos convencionais. Dessa forma, no presente estudo, os experimentos realizados com o extrato bruto etanólico da planta *Tocoyena bullata* são de extrema importância, visto que não há descrito na literatura a atividade anti-helmíntica relacionado a esta planta, e assim, apresentar um possível composto e/ou substância para sua utilização.

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como controle, pois foi o diluente do extrato bruto, visto que garante estabilidade química ao composto e dissolve amostras com uma vasta propriedade química (CHENG *et al.*, 2003). A concentração utilizada em nossos ensaios de 0,01% garante que não haja influência na sobrevivência ou desenvolvimento do nematoide, pois em concentrações acima de 2% pode afetar em algum parâmetro a ser avaliado (ZWIRCHMAYR *et al.*, 2020). Dessa maneira, nossos resultados de todas as condições experimentais com o grupo que recebeu o tratamento com DMSO 0,01% foi idêntico ao grupo controle, com ausência de diferenças estatísticas e ausência de alterações morfológicas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o extrato da *T. bullata* afeta a sobrevivência de *C. elegans*, principalmente os adultos, de maneira dependente da concentração. A maior concentração de 200 µg/mL apresentou a melhor atividade, e após 72 horas de tratamento foi obtido o IC₅₀ de 32,12 µg/mL. No ensaio com as larvas L3-L4, foi obtido um IC₅₀ mais alto, de 194,6 µg/mL após 48 horas de tratamento, entretanto os grupos tratados apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. Em ambos os ensaios realizados, foram encontradas diversas alterações morfológicas importantes que afetam a integridade e impactam na sobrevivência do nematoide, demonstrando assim a promissora atividade anti-helmíntica do extrato bruto etanólico das folhas da planta *Tocoyena bullata*, mesmo em concentrações mais baixas do que as utilizadas em outros estudos.

Resultados semelhantes ao nosso foram encontrados em outros trabalhos. Zabré *et al.* (2017) avaliou o efeito anti-helmíntico do extrato da planta *Acacia nilotica*, espécie usada para tratar doenças em ruminantes, e concluiu que a mesma inibiu somente em 22% a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*, com IC₅₀ > 5mg/mL, inibiu o desembainhamento de larvas L3 com IC₅₀ de 0,195 mg/mL e diminuiu a sobrevivência de adultos de *C. elegans* com IC₅₀ de 1,01 mg/mL. Além disso, Ondua

et al. (2021) ao isolar os compostos do extrato da *Typha capensis*, revelou que o isolado isoramnetina 3-O-rutinosídeo inibiu a eclosão de ovos de *H. contortus* com um IC₅₀ de 510,00 µg/mL e apresentou maior atividade ao inibir a sobrevivência larval com IC₅₀ de 55,61 µg/mL. Essas diferenças encontradas no efeito anti-helmíntico dos extratos nas diferentes formas de vida podem ser explicadas pelo modo de ação nos diversos alvos e as diferentes vias envolvidas nesse processo, ou também pela absorção dos constituintes presentes nos extratos que pode ser diferenciada entre as formas de vida dos nematoides, sabendo-se que pode ser ingerido por via oral, e/ou ser permeável na cutícula e parede dos ovos dos parasitos (BURNS *et al.* 2010; KUMARASINGHA *et al.* 2016).

Uma das alterações morfológicas predominantes encontradas em nosso trabalho foi a alteração na cutícula, como descamação, rupturas e formação de vacúolos, sendo alguns casos marcados por danos severos nesta estrutura, como observados nos adultos tratados com o extrato a 10, 50 e 200 µg/mL e nas larvas tratadas a 25 e 50 µg/mL. A cutícula é essencial para a sobrevivência do nematoide, sendo responsável pela manutenção da integridade, proteção, resistência e até mesmo função na respiração do animal, logo, qualquer modificação nesta estrutura, comprometerá a sobrevivência do helminto. Resultado semelhante ao nosso foi obtido por Idris *et al.* (2022), na qual ao tratar *C. elegans* adultos com 2 mg/mL do extrato da planta *Rumex crispus* L. e 0,1 mg/mL do anti-helmíntico levamisol por 72 horas, resultou em lesões cuticulares, como a formação de um aspecto áspero, manchas, listras e também a formação de cavidades nesta estrutura. O trabalho de Rocha (2016) mostrou que ao incubar larvas L3 infectantes de nematoides gastrointestinais de ovinos com 25 mg/mL do extrato bruto metanólico de *Cymbopogon citratus* e 25 mg/mL do extrato aquoso de *Allium sativum* L. por 48 horas, resultou em modificações em sua cutícula, com dissociação da hipoderme e camada muscular, além da presença de vacúolos. Além disso, foi confirmado por análise ultra estrutural, deformações na cutícula como colapsos, descamações e presença de poros. Também, Sant'anna *et al.* (2016) demonstrou em estudo que trifuralina a 25 µM promoveu a separação da cutícula adjacente a hipoderme em *C. elegans* após sete dias de tratamento.

Nosso estudo demonstrou a intensa degeneração das estruturas internas em todas as concentrações testadas do extrato de TB em larvas e adultos de *C. elegans*,

exceto na menor concentração de 5 µg/mL em adultos. Algumas dessas alterações apresentaram grande desorganização dos órgãos internos, não sendo possível identificar as estruturas ali presentes, como por exemplo o sistema digestivo e também a região anterior, que são facilmente reconhecidos no grupo controle. O mesmo foi encontrado por Roy *et al.* (2008), que ao incubar *Raillietina echinobothrida* com o extrato de *Millettia pachycarpa* nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL, promoveu desorganização do tegumento e degradação interna de estruturas, sendo estas relacionadas a perda de mitocôndrias, núcleo, membrana celular e a um aumento no número de vacúolos autofágicos. Outro trabalho revelou que o tratamento com 25 µM do anti-helmíntico albendazol por 7 dias em diferentes estágios de vida do *C. elegans* resultou em profunda destruição dos órgãos internos, além de descamação da cutícula e da superfície dos ovos, dificultando seu desenvolvimento (SANT'ANNA *et al.*, 2013). Em nosso trabalho também é possível perceber alguns ovos no interior do hermafrodita adulto nos grupos tratados com a TB a 25, 100 e 200 µg/mL, apresentando descamação e um aspecto rugoso, que conseqüentemente irá influenciar na sua eclosão.

Todas as alterações encontradas em nosso trabalho foram avaliadas apenas em microscopia óptica, sendo imprescindível a análise posterior por microscopia eletrônica de transmissão, para melhor aprofundamento nos detalhes. Todavia, tais modificações apontam para prejuízos no funcionamento normal do nematoide, afetando em seu metabolismo, integridade e conseqüentemente, em sua sobrevivência.

O fenômeno endotokia matricida, ou também chamado de eclosão intrauterina, foi observado em adultos que receberam o extrato bruto da TB a 25 e 50 µg/mL. Tal fenômeno é caracterizado pela eclosão das larvas ainda dentro do interior do nematoide, após sofrer um estresse oxidativo e extrema condição de fome. Essa adaptação na sobrevivência é comum da família Rhabditidae, onde a inanição dos adultos jovens ou adultos gravídicos, faz com que os ovos permaneçam em seu interior e que ao eclodirem, as larvas consomem o corpo do hermafrodita e continuam seu desenvolvimento (CHEN, 2004). O mesmo acontecimento foi apresentado por Sant'anna *et al.* (2013) ao incubar *C. elegans* adultos com 25 µM do anti-helmíntico albendazol durante três dias, demonstrando que fármacos que afetam a sobrevivência de *C. elegans* podem ser responsáveis por esse fenômeno.

Os extratos vegetais podem ser quimicamente diversos, tendo em vista que as plantas sintetizam uma série de metabólitos secundários e que muitos desses apresentam atividade biológica específica, principalmente, propriedade anti-helmíntica (ROMERO-BENAVIDES *et al.*, 2017). Esse é o primeiro estudo envolvendo a espécie *Tocoyena bullata* e sua atividade anti-helmíntica, não sendo abordado anteriormente na literatura. No entanto, sabe-se que esta planta sintetiza derivados fenólicos, triterpenoides, flavonóides, alcaloides e saponinas, que já foram relatados sua atividade antiparasitária anteriormente. O estudo de Ondua *et al.* (2021) demonstra que a fração butanol do extrato de *Typha capensis* exibiu melhor resultado, comparado a outros extratos, com LC₅₀ de 14,73 µg/mL em *C. elegans* adultos após 72 horas de tratamento. Posteriormente, esse resultado foi evidenciado pelo grande teor de substâncias fenólicas e flavonoides presentes na planta. Martínez-Ortiz-deMontellano *et al.* (2013) apresentou em estudo que a ao expor *Haemonchus contortus* adultos a extratos de *Lysiloma latisiliquum* e *Onobrychis viciifolia*, abundantes em taninos (principalmente taninos condensados), ocorreu alterações na cutícula e no trato digestivo, interferindo no movimento, estado nutricional e causando mortalidade do parasita. Gomes *et al.* (2016) demonstrou o potencial anti-helmíntico do extrato aquoso e da fração de saponinas de *Zizyphus joazeiro* nos ovos de *H. contortus*, tendo como resultado a inibição completa dos ovos e atividade inibitória de 79% da sobrevivência do nematoide. Além disso, Oliveira *et al.* (2017) utilizando os flavonoides encontrados na *Turnera ulmifolia* mostrou redução significativa na eclosão dos ovos, desenvolvimento e motilidade larval de *H. contortus*. Dessa maneira, percebe-se a importância de explorar a atividade antiparasitária dos compostos presentes nos vegetais, visto que o campo de busca e pesquisa dessa fonte alternativa é muito amplo.

Em frações de acetato de etila de *T. bullata* foram identificados diferentes compostos fenólicos, como por exemplo, flavonoides glicosilados, rutina, isoquercetina e trifolina, e estes foram promissores para a inibição da degranulação de mastócitos (SANTOS *et al.*, 2020). Ainda assim, os compostos fenólicos já foram relatados por possuírem propriedade anti-helmíntica, como o trabalho de Lei *et al.* (2010) que ao tratar larvas de *C. elegans* por 24 horas com 670 µM de carvacrol e timol, muito presentes em extratos vegetais, provocaram 100% de mortalidade, além do grupo tratado com timol apresentar ruptura na cutícula e dobra do corpo. Em outro

trabalho, warburganal e poligodial, dois sesquiterpenos, foram isolados do extrato etanólico da planta *Warburgia ugandenses*, e foram ativos contra uma cepa de *C. elegans* resistente, apresentando IC₅₀ de 28,2 µM e 13,1 µM, respectivamente, sugerindo que, o mecanismo de ação é diferente dos anti-helmínticos convencionais utilizados (LIU *et al.*, 2018).

O ensaio de eclosão de larvas L1 a partir dos ovos de *C. elegans* é bastante utilizado para avaliar a atividade anti-helmíntica de extratos vegetais e outros produtos (FOUCHE *et al.*, 2018). O extrato etanólico da raiz da planta *Uncaria guianensis*, uma Rubiaceae, mesma família da *Tocoyena bullata*, foi capaz de reduzir em 68% a eclosão dos ovos de nematoides gastrointestinais de ovinos, na concentração de 1,14 mg/mL. Já o extrato do caule da mesma planta na concentração de 1,25 mg/mL, reduziu em 86% na sobrevivência de larvas L3 infectantes (AMORIM *et al.*, 2021). Sant'anna *et al.* (2018) avaliou os efeitos da miltefosina na viabilidade, ultraestrutura e morfologia em diferentes fases do *C. elegans* e em larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis*. O fármaco em questão, inibiu a eclosão de larvas L1 a partir dos ovos, induzindo a morte nos embriões, promoveu alterações no aparelho reprodutivo dos hermafroditas e apresentou atividade contra as larvas de *C. elegans* e *S. venezuelensis*. Nossos resultados indicam que o extrato da TB diminuiu a eclosão de larvas L1, na qual obteve-se o IC₅₀ de 344,7 µg/mL, entretanto este valor é mais alto do que o encontrado em adultos, mostrando que o extrato é mais potente em formas de vida já desenvolvidas. O semelhante foi encontrado por Cavalcante *et al.* (2016), que ao avaliar o efeito anti-helmíntico do extrato de acetato de etila do látex do arbusto *Calotropis procera* em *H. contortus*, revelou que o mesmo apresentou um IC₅₀ razoável de 1,6 mg/mL na eclosão de ovos, porém, o efeito foi mais potente na inibição do desenvolvimento larval e na motilidade dos adultos, com IC₅₀ de 0,22 mg/mL e 0,05 mg/mL, respectivamente.

Esta diferença encontrada nos IC₅₀'s em ovos, larvas e adultos é um efeito esperado. Por exemplo, um extrato metanólico de uma planta pode não causar efeitos em ovos, mas um extrato aquoso da mesma planta pode apresentar tal efeito. Portanto, a diferença de polaridade dos solventes utilizados na preparação dos extratos, faz com que os mesmos apresentem diferentes composições químicas, corroborando com as diferentes atividades biológicas dos extratos (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2005). Além disso, pode ser válido que o extrato de uma

determinada planta atue somente em um determinado estágio de vida do nematoide, ou necessite de uma concentração maior para ter mais eficácia. Isso torna apropriado aos nossos resultados com as larvas L3-L4 de *C. elegans* tratados com a *T. bullata*, onde não ocorreu um impacto muito grande na sobrevivência, porém, as alterações morfológicas avaliadas já são suficientes para causar sérios danos no funcionamento e sobrevivência do helminto. Dessa forma, é como se as larvas estivessem em um “processo de morte” que talvez seria impulsionado por uma concentração maior do extrato.

Destaca-se que em nosso trabalho, as concentrações utilizadas são em escalas muito menores dos que as empregadas em outros estudos, que geralmente estão em mg/mL. Mesmo em baixas concentrações, foi possível obter alterações morfológicas importantes, além de afetar de maneira significativa a eclosão dos ovos e sobrevivência das larvas e adultos. Sendo assim, com base nos resultados apresentados, pode-se perceber que o extrato bruto etanólico das folhas de *Tocoyena bullata* é um potencial candidato no tratamento das helmintíases.

7. Perspectivas futuras

Baseando-se nos resultados encontrados e na potencial atividade anti-helmíntica da *Tocoyena bullata*, tem-se como perspectiva a realização do teste de citotoxicidade do extrato bruto etanólico, afim de permitir sua utilização em futuros testes *in vivo*. Além disso, é fundamental o isolamento das substâncias ativas presentes no extrato, para avaliar sua atividade isoladamente e determinar um possível mecanismo de ação. Por fim, as alterações morfológicas devem ser analisadas mais profundamente por microscopia eletrônica de transmissão, visando encontrar melhor detalhamento das modificações.

8. Conclusão

O extrato bruto da planta *Tocoyena bullata* foi capaz de reduzir a sobrevivência de *Caenorhabditis elegans* adultos de maneira dependente da concentração, obtendo-se o IC₅₀ de 32,12 µg/mL, e também diminuiu a sobrevivência das larvas L3-L4, obtendo-se o IC₅₀ de 194,6 µg/mL. Além disso, causou danos severos na morfologia de larvas e adultos, principalmente com alterações cuticulares e degenerações internas. Resultados semelhantes foram encontrados com outros extratos vegetais e anti-helmínticos analisados. O extrato da TB diminuiu a eclosão das larvas L1, obtendo-se o IC₅₀ de 344,7 µg/mL. Dessa maneira, os resultados apresentados apontam a *T. bullata* como uma possível alternativa para o tratamento das infecções helmínticas.

9. Referências Bibliográficas

AGTMAEL, M. A.; EGGELTE, T. A.; BOXTEL, C. J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 5, p. 199-205, mai. 1999.

ALTUN, Z. F. & HALL, D. H. Handbook of *C. elegans* Anatomy. **WormAtlas**. 2009. Disponível em: < <http://www.wormatlas.org/handbook/contents.Htm>.> Acesso em: 10 de julho de 2022

AMORIM, S. L.; OLIVEIRA, A. C. P. de; PEIXOTO, R. M.; BASTOS, L. S.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. Anthelmintic activity of the ethanol extract of the *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) on eggs and larvae of gastrointestinal nematodes of sheep in the Western Amazon Region. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 15, n. 1, p. 66-74. 2021. Editora da Universidade Federal Rural do Semi-Arido - EdUFERSA

ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DE PROFESSORES TÉCNICOS DE ENSINO AGRÍCOLA. (AGPTEA). **Apostila de Parasitologia Veterinária: Antiparasitários**. Porto Alegre (RS). Cap. 5. 2019

AVERY, L. & YOU, Y. J. *C. elegans* feeding. **WormBook**, ed. **The C. elegans Research Community, WormBook**. 2012

BALDWIN, J. G & PERRY, R. N. Nematode morphology, sensory structure and function. In: Chen. **Nematology, Advances and Perspectives**. Vol. 1 Nematode Morphology, Physiology and Ecology. Tsinghua University. P 171-256. 2004

BARAN, M. Nematodes reproductive system. **Parasitology**. p. 163. 2011

BALDWIN, L. G. & PERRY, R. N. Nematode morfologia, estrutura sensorial e função. **Nematologia, Avanços e Press**. China, pp. 171–256. 2004

BARBOSA, M. R. ZAPPI, D.; TAYLOR, C.; CABRAL, E.; JARDIM, J. G.; PEREIRA, M.S.; CALIÓ, M. F.; PESSOA, M. C. R.; SALAS, R.; SOUZA, E. B.; DI MAIO, F. R.; MACIAS, L.; ANUNCIAÇÃO, E. A. da; GERMANO FILHO, P.; OLIVEIRA, J. A.; BRUNICERA, C. P.; M. GOMES; DE TONI, K.; FIRENS, M. **Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015 Disponível

em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210> > Acesso em: 18 de novembro 2021

BARRIÈRE, A. & FÉLIX, M. A. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. **Wormbook**, p. 1-19. 2014

BARTNIK, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. Intermediate filaments in muscle and epithelial cells of nematodes. **Journal of Cell Biology** 102. p. 2033-2041. 1986

BIRD, A. F. & BIRD, J. **The structure of nematodes**. San Diego: Academic press; 1991

BLAXTER, M. L. & ROBERTSON, W. M. **The Cuticle**. In *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes*, (ed. R.N. Perry and D.J. Wright) pp. 25-48. CAB International. 1998

BOGITSH, B., CARTER, C.; OELTMANN, T. General characteristics of nematodes. In: **Human parasitology** 15: 308. 2005

BOLZANI, V. da S.; IZUMISAWA, C. M.; YOUNG, M.; C. M.; TREVISAN, L. M. V.; KINGSTON, D. G. I.; GUNATILAKA, A. L. Iridoids from *Tocoyena formosa*. **Phytochemistry**. v. 46, n. 2, p. 305-308, set. 1997

BORGES, D. G. L. & BORGES, F. de A. Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. **Nematoda**, v. 3, n. 1, p. 0, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia Prático Para o Controle das Geo-Helminthíases**. Brasília (DF); 2018.

BRENNER, S. THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. **Genetics**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 71-94. 1974.

BROOKER, S; MIGUEL, Ea; MOULIN, S; LOUBA, Ai; BUNDY, Dap; KREMER, M. Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya. **East African Medical Journal**. v. 77, n. 3, p. 157-161. 2009

BRUNTON, L. L. & HILAL-DANDDAN, R. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro, 2112 p. 2012.

BUCKINGHAM, S. D. & PARTRIDGE, F. A. & SATTELLE, D. B. Automated, high-throughput, motility analysis in *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes: Applications in the search for new anthelmintics. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 226–232. 2014.

BULL, K.; COOK, A.; HOPPER, N. A.; HARDER, A.; HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R. J. Effects of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 627-636. 2007

BURNS, A. R.; WALLACE, I. M.; WILDENHAIN, J.; TYERS, M.; GIAEVER, G.; BADER, G. D.; NISLOW, C.; CUTLER, S. R.; ROY, P. J. A predictive model for drug bioaccumulation and bioactivity in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Chemical Biology**. v. 6, n. 7, p. 549-557. 2010

BURR, A. & GANS, C. Mechanical significance of obliquely striated architecture in nematode muscle. **Biol Bull**. 194. 1987

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 7, n. 3, p. 97-106. 2005

CANOVA, E. B. **Eficiência de plantas taniníferas no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo (USP). Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/STB). 2016

CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 26–29. 2008.

CAVALCANTE, G. S.; MORAIS, S. M. de; ANDRE, W. P. P.; RIBEIRO, W. L. C.; RODRIGUES, A. L. M.; LIRA, F. C. M. L. de; VIANA, J. M.; BEVILAQUA, C. M. L. Chemical composition and in vitro activity of *Calotropis procera* (Ait.) latex on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 226, p. 22-25, ago. 2016.

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**. 282: 2012-2018. 1998

CESÁRIO, F. R. A. S.; ALBUQUERQUE, T. R. de; LACERDA, G. M. de; OLIVEIRA, M. R. C. de; SILVA, B. A. F. da; RODRIGUES, L. B.; MARTINS, A. O. B. P. B.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; VALE, M. L.; COUTINHO, H. D. M. Chemical fingerprint, acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of leaves from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 873-880. 2019

CHAN-PÉREZ, J. I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H.; CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G.; VILAREM, G.; MATHIEU, C. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. **Veterinary Parasitology**. v. 217, p. 53-60. 2016

CHENG, X.; HOCHLOWSKI, J.; TANG, H.; HEPP, D.; BECKNER, C.; KANTOR, S.; SCHMITT, R. Studies on Repository Compound Stability in DMSO under Various Conditions. **Slas Discovery**. v. 8, n. 3, p. 292-304,.2003

CHEN, J. & CASWELL-CHEN, E. P. Facultative vivipary is a life-history trait in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of nematology**, v. 36, n. 2, p. 107, 2004.

CHEN, Z. X.; SENYO, C.; DONALD, D. Nematology: advances and Perspectives. **Basic Nerve Elem.** 221. 2004

CHISHOLM, A. D. & HARDIN, J. Epidermal morphogenesis. **WormBook**, ed. **The C. elegans Research Community, WormBook**. 2005

CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L.; MARONI, R. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controled by a single autosomal recessive gene.**Experimental Parasitology**. 75: 425-432. 1992

CONSORTIUM, I. H. G. Comparative genomics of the major parasitic worms. **Nature Genetics**. v. 51, n. 1, p. 163-174. 2018

CORSI, A. K., WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **WormBook**, ed. **The C. elegans Research Community**. 2015

COX, G. N., KUSCH, M.; EDGAR, R. S. Cuticle of *C. elegans*: Its isolation and partial characterization. **J. Cell Biol.** 90: 7-17. 1981

DE CLERCQ, D.; SACKO, M.; BEHNKE, J.; GILBERT, F.; DORNY, P.; VERCRUYSSSE, J. Failure of mebendazole in treatment of human hookworm infections in the southern region of Mali. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 1, p. 25–30. 1997.

DENT, J. A.; SMITH, M. M.; VASSILATIS, D. K.; AVERY, L. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 6, p. 2674–2679. 2000.

DRISCOLL, M.; DEAN, E.; REILLY, E.; BERGHOLZ, E.; CHALFIE, M. Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 6 Pt 1, p. 2993–3003. 1989.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYANT, Z. N.; ELAM, G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thia-bendazole, ruelene, and phenothiazine. **Am. J. Vet. Res.** 25, 1512–1518. 1964

EMMONS, S. W. Male development. **WormBook**, ed. **The C. elegans Research Community, WormBook**. 2005

FERREIRA JUNIOR, M. & VIEIRA, A. O. S. Espécies arbóreo-arbustivas da família Rubiaceae Juss. na bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, p. 289–336. 2015.

FETTERER, R. H.; RHOADS, M. L. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Vet Parasitol.**;46(1–4):103–111. 1993

FOBOFOU, S. A. T.; FRANKE, K.; SANNA, G.; PORZEL, A.; BULLITA, E.; LACOLLA, P.; WESSJOHANN, L. A. Isolation and anticancer, anthelmintic, and antiviral (HIV) activity of acylphloroglucinols, and regioselective synthesis of empetrifranzins from *Hypericum roeperianum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 23, n. 19, p. 6327–6334. 2015

FOUCHE, G.; SAKONG, B. M.; ADENUBI, O. T.; PAUW, E.; LEBOHO, T.; WELLINGTON, K. W.; ELOFF, J. N. Anthelmintic activity of acetone extracts from South African plants used on egg hatching of *Haemonchus contortus*. **Onderstepoort J Vet Res**. v. 83, n. 1, p. 83-91. 2016

FOX, R. Invertebrate anatomy online. *Ascaris suum* Pig Roundworm: **Lander University**; 2006.

FRANCIS, G. R.; WATERSTON, R. H. Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. **Journal of Cell Biology** 101. P. 1532-1549. 1985

FRANCIS, G. R.; WATERSTON, R. H. Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Cell Biology** 114. P. 465-479. 1991

GALLAGHER, M.; MALHOTRA, I.; MUNGAI, P. L.; W., A. N; KIOKO, J. M; OUMA, J. H.; MUCHIRI, E.; KING, C. L. The effects of maternal helminth and malaria infections on mother-to-child HIV transmission. **Aids**. v. 19, n. 16, p. 1849-1855. 2005

GOMES, D. C.; LIMA, H. G. de; VAZ, A. V.; SANTOS, N. S.; SANTOS, F. O.; DIAS, Ê. R.; BOTURA, M. B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M. J. M. In vitro anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. **Veterinary Parasitology**. v. 226, p. 10-16. 2016.

GUTIERREZ, Y. Nematodes, body cavity. In: **Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations**, 2ED, p 278. 2000

HAHNEL, S. R.; DILKS, C. M.; HEISLER, I.; ANDERSEN, E. C.; KULKE, D.. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research – Old model, new perspectives. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v. 14, p. 237-248. 2020.

HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C. M. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 601-604. 2005

HARDER, A. The Biochemistry of *Haemonchus contortus* and Other Parasitic Nematodes. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 69–94, 2016.

HERNDON, L. A.; SCHMEISSNER, P. J.; DUDARONEK, J. M.; BROWN, P. A.; LISTNER, K. M.; SAKANO, Y.; PAUPARD, M. C.; HALL, D. H.; DRISCOLL, M. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. **Nature**. v. 419, n. 6909, p. 808-814. 2002

- HERMAN, M. A. Hermaphrodite cell-fate specification. **WormBook**, ed. **The C. elegans Research Community, WormBook**. 2006
- HO, W. E. PEH, H. Y.; CHAN, T. K.; WONG, W. S. F. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 1, p. 126–139. 2014.
- HOTEZ, P. J.; BRINDLEY, P. J.; BETHONY, J. M.; KING, C. H.; PEARCE, E. J.; JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **Journal Of Clinical Investigation**. v. 118, n. 4, p. 1311-1321. 2008
- IDRIS, O. A.; WINTOLA, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Anthelmintic potency of Rumex crispus L. extracts against Caenorhabditis elegans and non-targeted identification of the bioactive compounds. **Saudi Journal Of Biological Sciences**. v. 29, n. 1, p. 541-549. 2022
- JANSE, C. J.; WATERS, A. P.; KOS, J.; LUGHT, C. B. Comparison of in vivo and in vitro antimalarial activity of artemisinin, dihydroartemisinin and sodium artesunate in the Plasmodium berghei-rodent model. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 589–594. 1994.
- JAYAWARDENE, K. L. T. D. & PALOMBO, E. A. & BOAG, P. R. Natural Products Are a Promising Source for Anthelmintic Drug Discovery. **Biomolecules**, v. 11, n. 10, p. 1457. 2021.
- KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477–481. 2004.
- KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13^a ed. Porto Alegre. 1202 p. 2017
- KNOPP, S.; MOHAMMED, K. A.; SPEICH, B.; HATTENDORF, J.; KHAMIS, I. S.; KHAMIS, A. N.; STOTHARD, J. R.; ROLLINSON, D.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Albendazole and Mebendazole Administered Alone or in Combination with Ivermectin against Trichuris trichiura: a randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**. v. 51, n. 12, p. 1420-1428. 2010.
- KUMARASINGHA, R.; PRESTON, S.; YEO, T.; LIM, D. S. L.; TU, C.; PALOMBO, E. A.; SHAW, J. M.; GASSER, R. B.; BOAG, P. R. Anthelmintic activity of selected ethno-

medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**. v. 9, n. 1, p. 180-187. 2016

LAM, N. S.; LONG, X.; SU, X. Z.; LU, F. Artemisinin and its derivatives in treating helminthic infections beyond schistosomiasis. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 77–100. 2018.

LAW, W.; WUESCHER, L. M.; ORTEGA, A.; HAPIAK, V. M.; KOMUNIECKI, P. R.; KOMUNIECKI, R. Heterologous Expression in Remodeled *C. elegans*: a platform for monoaminergic agonist identification and anthelmintic screening. **Plos Pathogens**. v. 11, n. 4, p. 794. 2015

LEE, D. L. The biology of nematodes, secretory-excretory system. **Endokrinologie**. P 112–114. 2003

LEI, J.; LESER, M.; ENAN, E. Atividade nematicida de dois monoterpenóides e receptor de tiramina SER-2 de *Caenorhabditis elegans*. **Biochem Pharmacol**. 2010

LEWBART, G. Nematodes, Nervouse system In: Invertebrate Medicine. **John Wiley & Sons**. 2 ed. 2011

LIANG, Y.S.; COLES, G. C.; DOENHOFF, M. J. Detection of praziquantel resistance in schistosomes. **Trop Med Int Health**. 5(1): 72. 2000

LIU, M.; KIPANGA, P.; MAI, A. H.; DHONDT, I.; BRAECKMAN, B. P.; BORGGRAEVE, W. de; LUYTEN, W. Bioassay-guided isolation of three anthelmintic compounds from *Warburgia ugandensis* Sprague subspecies *ugandensis*, and the mechanism of action of polygodial. **International Journal For Parasitology**. v. 48, n. 11, p. 833-844. 2018

LIU, M. & PANDA, S. K. & LUYTEN, W. Plant-Based Natural Products for the Discovery and Development of Novel Anthelmintics against Nematodes. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 426. 2020

LOO, C. S. N.; LAM, N. S. K.; YU, D.; SU, X. Z.; LU, F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. **Pharmacological Research**, v. 117, p. 192–217. 2017.

LUSTIGMAN, S.; PRICHARD, R. K.; GAZZINELLI, A.; GRANT, W. N.; BOATIN, B. A.; MCCARTHY, J. S.; BASÁÑEZ, M.. A Research Agenda for Helminth Diseases of

Humans: the problem of helminthiasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 6, n. 4, p. 1582. 2012

MACHADO, A.; FERREIRA, S.; MEDEIROS, F. da S.; FUJIWARA, R.; SOUZA FILHO, J. de; PIMENTA, L. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & Vectors**. v. 8, n. 1, p. 113, 2015.

MARTIN, R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**. v. 154, n. 1, p. 11-34. 1997

MARTIN, R. J. gamma-Aminobutyric acid- and piperazine-activated single-channel currents from *Ascaris suum* body muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 445–461. 1985.

MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C. *et al.* Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. **Experimental Parasitology**, New York, v. 133, n. 3, p. 281-286. 2013

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. Resistência aos Anti-Helmínticos Benzimidazóis em Nematóides Gastrointestinais de Pequenos Ruminantes do Semiárido Nordeste Brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, Ceará, v. 10, p. 294-300, 2009.

MICHAUX, G.; LEGOUIS, R.; LABOUESSE, M. Epithelial biology: lessons from *Caenorhabditis elegans*. **Gene**. P 83-100. 2001

MUSEU NACIONAL. UFRJ. **Horto Botânico: *Tocoyena bullata***. 2022. Disponível em: <<https://www.museunacional.ufrj.br/hortobotanico/restinga/tocoyenabullata.html>> Acesso em: 10 de junho de 2022

MOORE, N.; HAMZA, N.; BERKE, B.; UMAR, A. News from Tartary: an ethnopharmacological approach to drug and therapeutic discovery. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 33–37. 2017.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu. 559 p. 2016

OBER, W. & GARRISON, C. Les relations de symetrie, regissant la distribution des organes sensibles anterieurs chez les nematodes. **Ann. Soc. Roy. Zool.** 81:25–31, 1950.

OLIVEIRA, A. F.; COSTA JUNIOR, L. M.; LIMA, A. S.; SILVA, C. R.; RIBEIRO, M. N.s.; MESQUISTA, J. W. C.; ROCHA, C. Q.; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W.. Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. **Veterinary Parasitology**. v. 236, p. 121-127. 2017

OLIVEIRA, J.A. **Tocoyena in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015 Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14337>>. Acesso em: 10 de junho de 2022

ONDUA, M.; NJOYA, E. M.; ABDALLA, M. A.; MCGAW, L. J. Investigation of anthelmintic activity of the acetone extract and constituents of *Typha capensis* against animal parasitic *Haemonchus contortus* and free-living *Caenorhabditis elegans*. **Parasitology Research**. v. 120, n. 10, p. 3437-3449. 2021

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Directrices: Quimioterapia preventiva para controlar las geohelmintiasis en grupos de población en riesgo**. Washington D.C, 2018. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

PAGE, A. P. & JOHNSTONE, I. L. The cuticle. **WormBook**, ed. **The C. elegans Research Community, WormBook**. 2007

POSNER, G. H. & O'NEILL, P. M. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome P450 metabolism of antimalarial trioxane like artemisinin allows rational desing of new antimalarial peroxides. **Accounts of Chemical Research**, v. 37, n. 6, p. 397-404. 2004

PRESTON, S.; JIAO, Y.; BAELL, J. B.; KEISER, J.; CRAWFORD, S.; KOEHLER, A. V.; WANG, T.; SIMPSON, M. M.; KAPLAN, R. M.; COWLEY, K. J. Screening of the 'Open Scaffolds' collection from Compounds Australia identifies a new chemical entity with anthelmintic activities against different developmental stages of the barber's pole worm and other parasitic nematodes. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v. 7, n. 3, p. 286-294. 2017.

REDMAN, C. A.; ROBERTSON, A.; FALLON, P. G.; MODHA, J.; KUSEL, J. R.; DOENHOFF, M. J.; MARTIN, R. J. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, v. 12, n. 1, p. 14–20. 1996

REINEMEYER, C. R. Formulations and Clinical Uses of Pyrimidine Compounds in Domestic Animals. **Pyrantel Parasiticide Therapy in Humans and Domestic Animals**, p. 67–107. 2016.

REY, L. **Parasitologia**: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 914 p. 2008

A REYNOLDSON, J.; BEHNKE, J. M.; PALLANT, L. J.; MACNISH, M. G.; GILBERT, F.; GILES, S.; SPARGO, R. J.; THOMPSON, R. C. A. Failure of pyrantel in treatment of human hookworm infections (*Ancylostoma duodenale*) in the Kimberley region of North West Australia. **Acta Tropica**. v. 68, n. 3, p. 301-312. 1997

ROBERTSON, S. J.; PENNINGTON, A. J.; EVANS, A. M.; MARTIN, R. J. The action of pyrantel as an agonist and an open channel blocker at acetylcholine receptors in isolated *Ascaris suum* muscle vesicles. **European Journal Of Pharmacology**, v. 271, n. 2-3, p. 273-282. 1994

ROCHA, L. O. da. **Cymbopogon citratus (DC) Stapf e Allium sativum L.: Avaliação da Atividade Nematicida, Toxicidade e Alterações Morfológicas e Ultraestruturais sobre Nematoides Gastrintestinais**. 2016. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Biociências e Biotecnologia, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2016

RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; JÚNIOR, S. B.; SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, p. 368–372. 2006

ROMERO-BENAVIDES, J. C.; RUANO, A. L.; SILVA-RIVAS, R.; CASTILLO-VEINTIMILLA, P.; VIVANCO-JARAMILLO, S.; BAILON-MOSCOSO, N. Medicinal plants used as anthelmintics: ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. **European Journal Of Medicinal Chemistry**. v. 129, p. 209-217. 2017

ROY, B.; DASGUPTA, S.; TANDON, V. Ultrastructural observations on tegumental surface of *Raillietina echinobothrida* and its alterations caused by root-peel extract of *Millettia pachycarpa*. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 11, p. 810-815. 2008

- SAMOYLENKO, V.; DUNBAR, D. C.; GAFUR, Md. A.; KHAN, S. I.; ROSS, S. A.; MOSSA, J. S.; EL-FERALY, F. S.; TEKWANI, B. L.; BOSSELAERS, J.; MUHAMMAD, I.. Antiparasitic, nematicidal and antifouling constituents from Juniperus berries. **Phytotherapy Research**. v. 22, n. 12, p. 1570-1576. 2008
- SANTANA, A. T. T. DE & LOUREIRO, M. B. Síndrome de hiperinfecção e/ou disseminação por *Strongyloides stercoralis* em pacientes imunodeprimidos. **Rev. bras. anal. clin**, p. 351–358, 2017
- SANT'ANNA, V.; SOUZA, W. DE.; VOMMARO, R. C. Anthelmintic effect of herbicidal dinitroanilines on the nematode model *Caenorhabditis elegans*. **Experimental parasitology**, v. 167, p. 43-49, 2016
- SANT'ANNA, V.; VOMMARO, R. C.; SOUZA, W. DE. *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: ultrastructural study of the effects of albendazole. **Experimental Parasitology**. v. 135, n. 1, p. 1-8. 2013
- SANT'ANNA, V.; RAILBOLT, M.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; CALOGEROPOULOU, T.; PINHEIRO, J.; SOUZA, W. de. Ultrastructural study of effects of alkylphospholipid analogs against nematodes. **Experimental Parasitology** v. 187, p. 49-58. 2018
- SANTOS, F. M.; MALAFAIA, C. A.; SIMAS, D. L. R.; PAULINO, A. B.; MUZITANO, M. F.; SIMAS, N. K.; DA-ROCHA, E. A. C.; AMARAL, A. C. F.; LEAL, I. C. R. Phenolic compounds from *Tocoyena bullata* Mart (Rubiaceae) with inhibitory activity in mast cells degranulation. **Natural Product Research** v. 34, n. 22, p. 3295-3298. 2019.
- SANTOS, F. O.; CERQUEIRA, A. P. M.; BRANCO, A.; BATATINHA, M. J. M.; BOTURA, M. B. Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: a review. **Parasitology**. v. 146, n. 10, p. 1233-1246. 2019
- SCHMIDT, G. D. & ROBERTS, L. S. **Foundations of Parasitology**. 8. ed. Nova York: Higher Education. 728 p. 2008
- SEPÖLVEDA-CRESPO, D.; REGUERA, R. M.; ROJO-VÁZQUEZ, F.; BALAÑA-FOUCE, R.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Drug discovery technologies: *Caenorhabditis elegans* as a model for anthelmintic therapeutics. **Medicinal Research Reviews**. v. 40, n. 5, p. 1715-1753. 2020
- SHOOP, W. L. Ivermectin resistance. **Parasitology Today**, v. 9, n. 5, p. 154-159. 1993

SLOAN, M. A.; REAVES, B. J.; MACLEAN, M. J.; STOREY, B. E.; WOLSTENHOLME, A. J. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits from parasitic nematodes in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular And Biochemical Parasitology**. v. 204, n. 1, p. 44-50. 2015

SPIRO, R. C.; PARSOS, W. G.; CAULFIELD, J. P.; HEIN, A.; REISFELD, R. A.; HARPER, J. R.; AUSTEN, K. F.; STEVENS, R. L. Inhibition of post-translational modification and surface expression of a melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan by diethylcarbamazine or ammonium chloride. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 11, p. 5121–5129, 15 abr. 1986

TORRES-LEITE, F.; HOLLUNDER, R. K.; GARBIN, M. L.; CARRIJO, T. T. Florística de Rubiaceae em um remanescente de Floresta Atlântica do Espírito Santo, Brasil. **Rodriguésia** v. 69, n. 2, p. 561-576. 2018.

TRAVASSOS, L. **Introdução ao estudo da Helminologia**. Rio de Janeiro: Revista Brasileira de Biologia. 170 p. 1950

TROEMEL, E. R.; CHOU, J. H.; DWYER, N. D.; COLBERT, H. A.; BARGMANN, C. I. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. **Cell**. v. 83, n. 2, p. 207-218. 1995

VERCRUYSSSE, J.; ALBONICO, M.; BEHNKE, J. M.; KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K.; MCCARTHY, J. S.; MONTRESOR, A.; LEVECKE, B. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v. 1, n. 1, p. 14-27. 2011

VIEIRA L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista Ciência e Tecnologia Agropecuária**. v.2, p. 28-31, 2008

VIEIRA, R. C. *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae). Anatomia foliar. **Rodriguésia**, v. 38–40, p. 33–39, dez. 1986

WALLER, P. J.; DOBSON, R. J.; OBENDORF, D. L.; GILLHAM, R. J. Resistance of *Trichostrongylus colubriformis* to levamisole and morantel: differences in relation to selection history. **Veterinary Parasitology**. v. 21, n. 4, p. 255-263. 1986

WHITE, J. G.; SOUTHGATE, E.; THOMSON, J. N.; BRENNER, S. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. B, Biological Sciences**. v. 275, n. 938, p. 327-348. 1976.

WOLSTENHOLME, A. J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N. C. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends In Parasitology**. v. 20, n. 10, p. 469-476. 2004.

WOODS, D. J. & LAURET, C. & GEARY, T. Anthelmintic discovery and development in the animal health industry. **Expert Opinion on Drug Discovery**. v. 2, n. s1, p. S25-33. 2007

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Helminth control in school age children**: a guide for managers of control programmes. 2nd ed. 2011. Disponível em: < <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241548267> >. Acesso em: 12 jun. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lymphatic filariasis**. 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis> > Acesso em: 25 de julho de 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> > Acesso em: 25 de julho de 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Soil-transmitted helminth infection**. 2020. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> > Acesso em: 20 de julho 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The selection and use of essential medicines**: report of the 21st WHO Expert Committee Geneva: World Health Organization, 2017.

WRIGHT, K. A. & THOMSON, J. N. The buccal capsule of *C. elegans* (Nematoda: Rhabditoidea): an ultrastructural study. **Can J Zool**. 1981

YOICHEM, J.; GU, T.; HAN, M. A new marker for mosaic analysis in *Caenorhabditis elegans* indicates a fusion between hyp 6 and hyp7, two major components of the hypodermis. **Genetics**. 1323-1334. 1998

ZABRÉ, G.; KABORÉ, A.; BAYALA, B.; KATIKI, L. M.; COSTA-JÔNIO, L. M.; TAMBOURA, H. H.; BELEM, A. M. G.; ABDALLA, A. L.; NIDERKORN, V.; HOSTE, H. Comparison of the in vitro anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. **Parasite** v. 24, p. 44, 2017

ZWIRCHMAYR, J.; KIRCHWEGER, B.; LEHNER, T.; TAHIR, A.; PRETSCH, D.; ROLLINGER, J. M. A robust and miniaturized screening platform to study natural products affecting metabolism and survival in *Caenorhabditis elegans*. **Scientific Reports**. v. 10, n. 1, p. 1-13. 2020