

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

Heitor Alves de Aguiar

**AVALIAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE PARA INIBIÇÃO DA
ECLODIBILIDADE E MIGRAÇÃO LARVAL DE *Trichostrongylidae* DE CAPRINOS**

Uberlândia - MG

2023

Heitor Alves de Aguiar

**AVALIAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE PARA INIBIÇÃO DA
ECLODIBILIDADE E MIGRAÇÃO LARVAL DE *Trichostrongylidae* EM CAPRINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em Zootecnia
da Universidade Federal de Uberlândia, como parte
das exigências para o título de Zootecnista.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Natália Berne Pinheiro

UBERLÂNDIA – MG

2023

Heitor Alves de Aguiar

**AVALIAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE PARA INIBIÇÃO DA
ECLODIBILIDADE E MIGRAÇÃO LARVAL DE Trichostrongylidae EM CAPRINOS**

Monografia aprovada como requisito parcial para
obtenção do título de Zootecnista no curso de
graduação em Zootecnia da Universidade Federal de
Uberlândia

APROVADA EM

Natália Berne Pinheiro

ICBIM

Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda

ICBIM

Ana Luísa Neves Alvarenga Dias

FAMEV

UBERLÂNDIA – MG

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por abençoar meus caminhos, me dar saúde e força para superar as dificuldades e seguir minha caminhada da vida, lutando sempre para realizar meus sonhos e objetivos e buscando sempre ser uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus pais Fernanda e Nilson pelo dom da vida, por me ensinar os valores morais, e que se deve sempre fazer o que é certo, independente das circunstâncias, obrigado pela criação, pelo amor e carinho. Minha irmã Leticia e minha tia Flávia que me apoia sempre a seguir em frente e realizar meus sonhos, nunca medindo esforços para estar presente apoiando e incentivando. Graças a vocês hoje sou um homem de bem com valores e princípios, amo vocês.

Agradeço ao apoio da minha noiva Nathalia, que de forma espontânea me faz buscar ser melhor a cada dia, amadurecendo, buscando realizar os sonhos, enriquecer meu conhecimento, traçando metas e objetivos certos, aquela pessoa que quando estava desanimado me acalmou e me deu motivos para não abandonar o barco, com as falhas e os acertos aprendemos muito juntos, amo você.

Agradeço ao meu sogro Ricardo, por me ceder espaço e me proporcionar viver na prática como é a pecuária e a roça, todos os desafios e dificuldades que são encontradas pelo homem do campo, por me fazer enxergar o quão abençoado é o sistema de criação e mesmo com as dificuldades, encontrarmos uma forma de sempre estar firmes e confiantes no melhor sempre.

Agradeço a minha orientadora Dra. Natalia Berne Pinheiro pela oportunidade de trabalharmos juntos em um projeto, pelos inúmeros aprendizados que tive executando esse trabalho, pela atenção e metodologia de ensino que proporcionou momentos de aprendizado com leveza e assertividade.

Agradeço aos amigos do curso Yuri e Brenda, com vocês eu aprendi realmente o que é ter amigos que sentam na mesa para conversar sobre a vida e estudar, gratidão por todas as disciplinas juntos, as dificuldades e principalmente pela parceria, muito obrigado.

Agradeço ao grupo do Laboratório de Parasitologia que me apoiaram e me acolheram com muito carinho, sempre auxiliando nas etapas de processamento, amostragem e leitura dos resultados, muito obrigado por abraçarem esse projeto com tanto carinho e proatividade.

Agradeço a UFU, que me acolheu durante o período de curso, aos docentes que proporcionaram e enriqueceram o conhecimento de forma atenciosa e produtiva. As aulas de

campo práticas, que mostraram na prática quais são os desafios encontrados no campo e estratégias para buscar sempre fazer o melhor possível como profissional.

Muito obrigado.

RESUMO

Caprinos, assim como outros ruminantes, sofrem com prejuízos na sua produtividade devido a infecção por parasitos gastrintestinais. Visando o controle destas infecções, estes animais são submetidos a recorrentes manejos com anti-helmínticos sintéticos, contribuindo para o aumento da resistência dos endoparasitos aos vermífugos, inviabilizando sua utilização. Assim, diversos estudos têm verificado a eficiência anti-helmíntica dos fitoterápicos, sendo uma alternativa natural, facilmente disponível na natureza e livre de resíduos. Para verificar a eficiência da utilização do extrato aquoso de própolis verde produzido por abelhas europeias (*Apis mellifera*) na redução de parasitos da família Trichostrongylidae em caprinos, o presente trabalho avaliou a influência do extrato nas diluições de 50mg/mL, 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.12mg/mL e 1.56mg/mL em testes *in vitro*, analisando a inibição da eclodibilidade e da migração larval. Para isso, foram utilizadas fezes coletadas diretamente da ampola retal de caprinos naturalmente infectados, seguida da recuperação de ovos e quantificação. Para o teste de inibição da eclodibilidade, os ovos foram mantidos em contato com o extrato nas seis diluições por 24h, após este período realizou-se a quantificação de ovos e larvas em microscópio invertido. Para controle positivo utilizou-se água destilada, e para controle negativo Tween e Levamisol 0.025mg/mL. Para o teste de migração larval utilizou-se amostras fecais previamente condicionadas em estufa para recuperação de larvas em terceiro estágio, seguidas da adição das mesmas seis diluições do extrato, seguido de incubação por 24h em estufa e mais 24h migrando em malhas de 25 µm e então contagem em microscópio invertido de larvas que migraram e das que ficaram retidas. Os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA, teste de Tukey e IC₅₀ pelo programa GraphPad Prism 8.0. A partir das análises foi possível concluir que o extrato de própolis apresentou alta eficiência ovicida, sendo a maior eficiência obtida na concentração de 50 mg/mL e 25 mg/mL com 98,88% e 87,43% de eficiência, respectivamente. Já em relação à migração larval, o composto apresentou baixa eficiência comparativa à anti-helmínticos sintéticos. Sendo assim, a própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*) pode ser considerada um composto promissor para o controle de parasitos da família Trichostrongylidae, especialmente na fase inicial do desenvolvimento deste parasito.

PALAVRAS CHAVES: própolis verde; caprinocultura; ovicida; migração larval; endoparasitas; ruminantes; Trichostrongylidae.

ABSTRACT

Goats, like other ruminants, suffer from losses in their productivity due to infection by gastrointestinal parasites. In order to control these infections, these animals are subjected to recurrent handling with synthetic anthelmintics, contributing to the increase in the resistance of endoparasites to vermifuge, making their use unfeasible. Thus, several studies have verified the anthelmintic efficiency of herbal medicines, being a natural alternative, easily available in nature and free of residues. To verify the efficiency of using the aqueous extract of green propolis produced by European bees (*Apis mellifera*) in reducing parasites of the Trichostrongylidae family in goats, this study evaluated the influence of the extract in dilutions of 50mg/mL, 25mg/mL and 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.12mg/mL and 1.56mg/mL in in vitro tests, analyzing the inhibition of hatchability and larval migration. For this, feces collected directly from the rectal ampulla of naturally infected goats were used, followed by egg retrieval and quantification. For the hatchability inhibition test, the eggs were kept in contact with the extract in the six dilutions for 24 hours, after which the eggs and larvae were quantified in an inverted microscope. For positive control, distilled water was used, and for negative control Tween and Levamisole 0.025mg/mL. For the larval migration test, fecal samples previously conditioned in an oven were used to recover larvae in the third stage, followed by the addition of the same six dilutions of the extract, followed by incubation for 24 hours in an oven and another 24 hours migrating in 25 μ m meshes and then counting in an inverted microscope of larvae that migrated and those that remained. Data were submitted to ANOVA statistical analysis, Tukey's test and IC50 using the GraphPad Prism 8.0 program. From the analyzes it was possible to conclude that the propolis extract showed high ovicidal efficiency, with the highest efficiency obtained at the concentration of 50 mg/mL and 25 mg/mL with 98.88% and 87.43% efficiency, respectively. In relation to larval migration, the compound showed low efficiency compared to synthetic anthelmintics. Therefore, green propolis from European bees (*Apis mellifera*) can be considered a promising compound for the control of parasites of the Trichostrongylidae family, especially in the initial phase of the development of this parasite.

KEYWORDS: green propolis; goat farming; ovicide; larval migration; endoparasites; ruminants; Trichostrongylidae.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 CAPRINOCULTURA NO BRASIL	11
2.2 ENDOPARASITOS E O USO DE FITOTERÁPICOS NO SEU CONTROLE	12
2.3 A PRÓPOLIS VERDE.....	13
3. METODOLOGIA	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Brasil tem crescido significativamente e se configura como uma atividade rentável, podendo ser implementada com baixo investimento e em pequenas propriedades rurais de todo o país. Com isso, torna-se uma alternativa importante no agronegócio brasileiro, ofertando oportunidade de renda para pequenos produtores e agricultura familiar (DA SILVA et al., 2012).

Os animais de produção são amplamente acometidos por nematódeos gastrintestinais, sendo este um dos principais entraves para a rentabilidade do agronegócio. Os caprinos em especial, possuem sensibilidade fisiológica a esses endoparasitas e tendem a sofrer diversos sintomas durante o processo de infecção (LOPES & COSTA JÚNIOR, 2015). Assim, o uso de anti-helmínticos tem representado a forma mais utilizada para o controle nos rebanhos, gerando resistência dos nematódeos e ocasionalmente inviabilizando sua utilização (PAPADOPOULOS, 2008).

Dentre os endoparasitos de caprinos têm-se: *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. e *Trichostrongylus axei* são parasitos do abomaso; *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia* spp., *Bunostomum* spp., *Strongyloides* spp. e *Nematodirus* spp. do intestino delgado e *Oesophagostomum* spp. e *Trichuris* spp. no intestino grosso. Em relação às espécies que mais acometem os pequenos ruminantes, *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* se destacam, sendo ambos pertencentes a família Trichostrongylidae (RUAS; BERNE, 2001). A incidência desses parasitas gera infecções de diferentes níveis de gravidade no hospedeiro, podendo causar perda de peso, anorexia, anemia, hipoproteïnemia, diarreia e morte (RODRIGUES, 2005).

Tanto a caprinocultura, o agronegócio como um todo, são considerados setores em constante evolução e crescimento, e apresentam tecnificação cada vez mais maior nas últimas décadas. Com isso, atingiu posição de destaque principalmente na produção e exportação de grãos, açúcar, suco de laranja, café e carne. Um dos pilares que possibilitou esse rápido avanço produtivo e econômico foi o estudo dos ecossistemas tropicais, a fim de viabilizar o uso dos recursos naturais em prol da produtividade agrícola (CRESTANA & DE MORI, 2015).

A busca por produtos naturais, fitoterápicos e medicinais cresce no mundo todo. No Brasil com a vasta gama de ecossistemas existem várias plantas com propriedades medicinais, sendo possível a realização da extração de diversos compostos fitoterápicos de interesse populacional para tratamento de enfermidades. A procura por esses produtos naturais é consequência da

grande diversidade étnica-cultural, que implantou diversas espécies de interesse medicinal no período colonial (ABREU & MARTINAZZO, 2021). Dentre os produtos mais procurados, sabe-se que a própolis está presente nos diversos ecossistemas e culturas brasileiras.

No estudo de ecossistemas e recursos naturais, é inevitável destacar o papel da apicultura no Brasil. A criação racional de abelhas é considerada uma atividade agropecuária capaz de gerar grandes impactos sociais, econômicos e ecológicos (KLOSOWSKI, 2020). As exportações brasileiras de mel apresentaram resultados importantes, representando 40,6 mil toneladas de mel exportadas *in natura* nos 9 primeiros meses de 2021 (FERREIRA, 2021). Dentre os estados brasileiros com maior participação, destacou-se: São Paulo com 25% da produção, Paraná com 21,3%, Santa Catarina com 18,8%, Piauí com 14,3% e Minas Gerais com 8,86% (KLOSOWSKI, 2020).

Dentre os produtos oriundos da apicultura, a própolis apresenta destaque na comercialização mundial devido a suas diversas aplicações. Sabe-se que a própolis designa o conjunto de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, produzida pelas abelhas para proteção e organização das colmeias (DONADIEU, 1986). Segundo Greenaway, Scaysbrook & Whatley (1990), essa substância é obtida da mistura de produtos de origem vegetal juntamente com a saliva das abelhas. Este processo resulta em novos compostos devido a ação catalítica das enzimas presentes nas secreções das glândulas que compõe o sistema salivar das abelhas (SANTOS et al., 2009). Com isso, alguns estudos tem sido desenvolvidos com o intuito de verificar a viabilidade do uso da própolis na pecuária, em especial na produção orgânica de caprinos.

Assim, considerando a importância da caprinocultura no Brasil, os danos causados em rebanhos de caprinos acometidos por helmintos, e as diversas propriedades medicinais da própolis, o presente trabalho teve como objetivo analisar *in vitro* a eficiência da utilização do extrato aquoso de própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*) para inibição da eclodibilidade e da migração larval de nematódeos da família Trichostrongylidae recuperados de caprinos naturalmente infectados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CAPRINOCULTURA NO BRASIL

Considerado numericamente expressivo, o rebanho brasileiro de caprinos possui 20,5 milhões de cabeças, destacando-se a região nordeste que corresponde a 69,9% do rebanho nacional. Dentre os estados criadores, a Bahia se destaca com 4,2 milhões de cabeças, ocupando o título de maior estado produtor de caprinos no Brasil. (IBGE, 2021). Graças a isso, a atividade da caprinocultura desempenha grande papel social, econômico e como fonte de proteína alimentar, sendo geradora de renda a partir da comercialização dos produtos diretamente relacionados aos caprinos, como carne, pele, leite e comercialização de animais (MOREIRA & GUIMARÃES FILHO, 2011).

A criação dos caprinos na região Semiárida concentra-se majoritariamente sob pastagens naturais da caatinga, tendo como complementação alimentar do rebanho, milho, feijão, mandioca e sorgo principalmente. Ainda na região, 22% dos produtores realizam manejo de vermifugação do rebanho de acordo com o indicado (4 vezes ao ano), demonstrando baixa taxa de efetividade na realização. Aproximadamente 1/3 dos produtores não o fazem sistematicamente e, segundo eles, as verminoses, piolhos e a linfadenite caseosa são os principais problemas enfrentados por eles, ocasionando um baixo desempenho zootécnico (MOREIRA & GUIMARÃES FILHO, 2011).

De modo geral, no Brasil, a caprinocultura de leite tem apresentado avanços na produtividade, ocasionado pelo melhoramento genético dos rebanhos, manejo e nutrição equilibrada. No entanto, para a produção de carne, há pouca melhora no aproveitamento do rebanho uma vez que culturalmente têm-se o hábito de descarte do macho, o que representaria uma alternativa para lucro extra com a produção de carne (YÁÑEZ et al., 2006).

Os caprinos caracterizam-se por possuírem carcaças pouco compactas, magras e com pouca gordura de cobertura, sendo a maior concentração de gordura corporal encontrada em torno dos órgãos internos (RIBEIRO, 1997). Além disso, não existe padrão de comercialização de carcaças e cortes de caprinos visando assegurar a qualidade, o que ocasiona baixo investimento em dietas balanceadas e baixo investimento sanitário (YÁÑEZ et al., 2006).

Sabe-se que a produção desses ruminantes é altamente prejudicada pelas helmintoses que geram o retardamento no desenvolvimento dos animais, baixa produtividade e até a morte, se não controladas (SILVA, BEVILAQUA & RODRIGUES, 2003).

2.2 ENDOPARASITOS E O USO DE FITOTERÁPICOS NO SEU CONTROLE

Os endoparasitas gastrintestinais afetam de forma gradativa a produção de pequenos ruminantes, causando queda da produção e elevados níveis de mortalidade. Os principais endoparasitas encontrados em caprinos e ovinos são pertencentes a família Trichostrongylidae (RUAS; BERNE, 2001). Morfológicamente, os trichostrongilídeos são parasitas pequenos, geralmente capiliformes, possuem poucos apêndices cuticulares com cápsula bucal vestigial. Os machos possuem bolsa copulatória bem desenvolvida e dois espículos. Sua capacidade infectante ocorre a partir do estágio L₃ (URQUHART et al., 1998).

O controle mais comum utilizado na pecuária é a utilização de anti-helmínticos sintéticos, que são muitas vezes ministrados de forma indiscriminada e abusiva, resultando na resistência dos endoparasitas aos compostos químicos oriunda da seleção de parasitas que não são acometidos pela molécula sintética, completando seu ciclo infeccioso mesmo após o contato com os tratamentos. Com isso ocorre dificuldade de controle sanitário do rebanho, gerando perda econômica aos produtores, que buscam alternativas eficazes. Dentre elas, os compostos fitoterápicos possuem grande capacidade de controle de helmintoses, se tornando uma alternativa com menor toxicidade para os animais e meio-ambiente (TONELOTTO et al., 2009).

No cenário atual, segundo Kaplan (2004), os anti-helmínticos químicos disponíveis no mercado já não apresentam resultados eficazes no controle aos endoparasitas, desencadeando o aumento da dosagem utilizada e prazos de reaplicação mais curtos que o recomendado, elevando custos ao produtor e aumentando a taxa residual química no organismo do animal, não sendo efetivos na redução da infecção dos animais.

Sendo assim, muitas alternativas vêm sendo testadas em pesquisas com o intuito de disponibilizar um composto que seja efetivo e eficaz contra os endoparasitos. Dentre os estudos, têm-se: o melhoramento genético que busca desenvolver animais mais resistentes no rebanho; as vacinas que utilizam moléculas químicas e os fitoterápicos (MOLENTO et al., 2013).

O desenvolvimento do estudo das plantas ocorre pela procura cada vez mais frequente de pessoas que prezam por maior qualidade de vida e saúde. O costume de utilizar ervas como remédio ainda é frequente por comunidades rurais e ribeirinhas, pela disponibilidade das plantas naturais no campo e dificuldade de adquirir medicamentos farmacêuticos (GADELHA et al., 2013).

Visando atender à essa classe populacional, há cada vez mais o investimento em pesquisa e desenvolvimento nessa área. No entanto, a disponibilidade de medicamentos de classe fitoterápica no Brasil para a pecuária ainda é escassa, registros em sites de entidades e empresas nacionais são poucos. Isso ocorre, por baixa disponibilidade e uso de fitoterápicos na pecuária (BRUNO, MARQUES & CARDOSO, 2016).

2.3 A PRÓPOLIS VERDE

Produzida pelas abelhas, a própolis verde é desenvolvida através de uma mistura de material resinoso, gomoso ou balsâmico oriundo dos botões florais, sépalas, pétalas, folhas e caules de plantas. Na colmeia, as abelhas misturam esse material a secreções e enzimas da saliva, originando a própolis (PEREIRA, SEIXAS & AQUINO NETO, 2002; FRANCO et al., 2000). Devido a isso, a própolis pode apresentar grande variação em sua composição de acordo com as características geográficas e climáticas do local de coleta, sendo influenciada diretamente pela flora local (BANKOVA, 2005).

De modo geral, a própolis contém mais de duzentos compostos químicos já identificados, sendo os Flavonoides e ácidos fenólicos os compostos de maior atividade biológica e os mais estudados (TORETI et al., 2013). Para fins comerciais nacional ou internacionalmente, é necessário que a própolis possua no mínimo 5% m/m de fenólicos totais, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (DE ALMEIDA, 2012).

Pesquisas utilizando a própolis verde para controle de helmintoses tem se mostrado positivas, tanto no controle de ovos quanto de larvas (BATISTA, 2016). De modo geral, o caráter anti-helmíntico da própolis é conferido pela presença de ácido elágico, que atua na captura de elétrons de diferentes rotas biológicas e no transporte de elétrons. Dentre os ácidos elágicos têm-se os elagitaninos (taninos hidrolisáveis) que atuam diretamente sobre helmintos através da inibição da fosforilação oxidativa, ocorrendo rompimento no fluxo de elétrons de larvas e ovos (VATTEM & SHETTY, 2005; MONDAL et al., 2015).

Os taninos hidrolisáveis se ligam à superfície da casca do ovo do parasito, impedindo a atuação das proteínas incubatórias e de revestimento, dificultando as trocas de gasosas entre interior e exterior do ovo (ENGSTROM et al., 2016). Nas larvas, os taninos interrompem o processo de extravasamento, inibindo o estabelecimento no hospedeiro e a infecção (BRUNET et al., 2007; ALONSO-DÍAZ et al., 2008).

3. METODOLOGIA

Para a realização deste estudo, o extrato aquoso de própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*) foi obtido a partir da metodologia proposta por Moroni, Hamaguchi, Brandeburgo (1999). Assim, 20g de própolis foram imersos em 250 mL de água destilada em uma temperatura de 70°C por 2 horas. Esta solução foi homogeneizada com bastão de vidro e filtrada em papel de filtro. Após, a mesma foi armazenada a frasco âmbar em temperatura de -20°C até a sua utilização.

Para os testes realizados neste estudo, foram coletadas fezes diretamente da ampola retal de dois animais mestiços com aproximadamente 2 anos de idade, provenientes do cruzamento entre as raças Anglo Nubiano e Saanen, na Fazenda Experimental Capim Branco da Universidade Federal de Uberlândia. O valor médio de OPG contabilizado nesses animais foi de 2.000. As amostras foram coletadas e levadas ao Laboratório de Helminologia Básica do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Para a realização do teste de inibição da eclodibilidade de parasitos da família Trichostrongylidae, realizou-se duas etapas, iniciando com a recuperação dos ovos seguida do desafio com seis diluições do extrato aquoso de própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*).

Para isso, a recuperação de ovos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hubert e Kerboeuf (1992), no qual as fezes coletadas e enviadas ao laboratório foram depositadas em béquer e aos poucos adicionou-se água destilada em temperatura de 40°C para maceração e posterior separação do material utilizando tamises de malhas de 1mm, 105µm, 55 µm e 25 µm, sucessivamente. Então, o conteúdo da tamis de 25µm, porção onde espera-se que os ovos fiquem retidos, foi vertido em béquer com água destilada e seu conteúdo recuperado em tubos de 15mL balanceados com água destilada, realizando três lavagens por centrifugação.

Os ovos retidos na malha foram recuperados após as lavagens e colocados em béquer para quantificação em lâmina de 5 alíquotas de 30µl cada, realizando-se a média ao final. Após a recuperação dos ovos realizou-se a colocação dos mesmos em contato com a solução teste em placas de poliestireno de 24 poços, seguindo a metodologia descrita por Coles et al. (1992). Resumidamente, foram adicionados em todas as concentrações testadas aproximadamente 150 ovos, que permaneceram em contato com o extrato aquoso por 24h em estufa em 28°C e 80% de umidade relativa. Após este período, ovos e larvas de cada poço foram quantificados em

microscópio invertido. As concentrações utilizadas do extrato aquoso de própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*) foram de 50mg/mL, 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.12mg/mL e 1.56mg/mL. Todas as concentrações foram testadas em quadruplicatas.

Para controle positivo e negativo utiliza-se água destilada, Tween (solução emulsificante) e Levamisol 0.025mg/mL respectivamente.

Para o cálculo da porcentagem de eficácia do produto utilizou-se a fórmula:

$$Eficácia = \frac{Larvas}{Larvas + Ovos} \times 100$$

Após os testes prévios de eclodibilidade de ovos, foi realizado o teste de inibição da migração larval descrito por Jackson e Hoste (2010), a fim de verificar a eficiência do extrato de própolis frente às larvas. Inicialmente, as fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos mesmos animais infectados do processo anterior, as amostras foram acondicionadas em estufa a 28°C e UR acima de 80% por sete dias para realização da técnica de coprocultura. Ao atingirem o terceiro estágio, as larvas foram recuperadas, contadas e identificadas (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950).

Após isso, aproximadamente 150 larvas foram adicionadas na primeira e terceira linha das placas de 24 poços para incubação por 24 horas em estufa a 28°C com 80% de UR, com 900 µL de extrato nas concentrações de 50mg/mL, 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.12mg/mL, 1.56mg/mL.

Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi transferido para tamises de 25 µm inseridas em placa de poliestireno de 24 poços e acondicionados novamente por 24 horas a 28°C e 80% UR, seguido da remoção das tamises e lavagem do conteúdo retido, para contagem das larvas que migraram da primeira e terceira linha e das larvas que ficaram retidas, em microscópio invertido.

Os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA, ao teste de Tukey e à medida da potência de uma substância de inibir uma substância em relação a uma função biológica, ou seja, o cálculo da concentração para inibir 50% da eclodibilidade, a IC₅₀, utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram submetidos e aprovados na Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia com protocolo número 23117.039043/2022-97.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a eficiência obtida após o teste de inibição da eclodibilidade, foi possível constatar a relação direta entre o aumento da concentração de própolis verde e a redução da porcentagem de eclosão dos ovos de Trichostrongylidae. Todos os tratamentos utilizando a própolis verde obtiveram maior eficiência estatisticamente ($p < 0.05$) se comparados ao tratamento testemunha (Tween e água). As menores taxas de eclosão foram obtidas com as concentrações de 50 mg/mL e 25 mg/mL de própolis verde, que apresentaram eficácia de 98.88% e 87.43% respectivamente. No entanto, mesmo sendo numericamente diferentes, estatisticamente não apresentam diferença entre si (Figura 1). Os resultados observados nas menores concentrações de própolis verde também diferiram estatisticamente ($p < 0.05$) dos controles, porém não foram considerados eficazes por obter ação inferior a 80%.

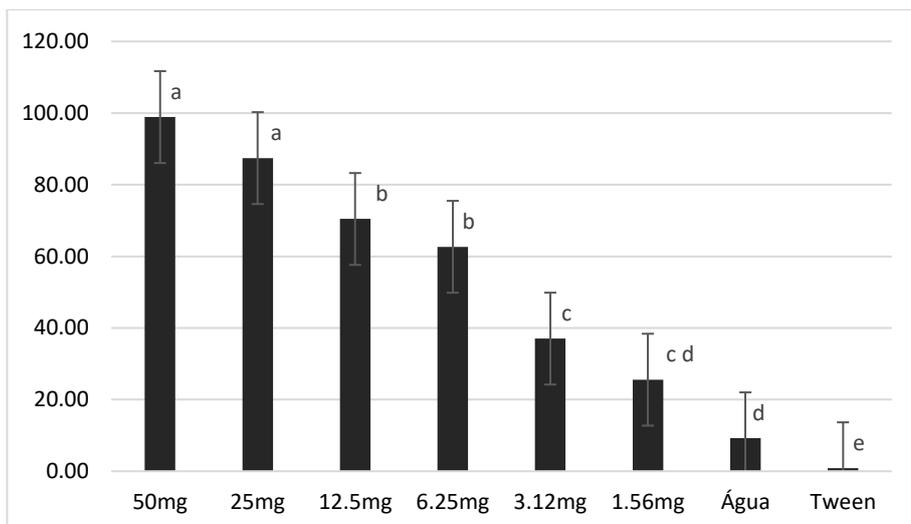


Figura 1: Média da porcentagem de eficácia da própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*) em inibir a eclodibilidade de helmintos da família Trichostrongylidae. Letras iguais apresentadas nas colunas do gráfico acima representam as concentrações em que não foi observado diferença estatística nos resultados. As diferentes letras obtidas no gráfico apresentam diferença estatística entre si.

Para o teste de migração das larvas obteve-se as menores taxas de migração larval nas concentrações de 50mg/mL, 12.5 mg/mL e 6.25 mg/mL com eficiência de 19.34%, 29.9% e 19.37%, respectivamente (Figura 2), sem apresentar diferença estatística entre elas e

evidenciando que a utilização da própolis verde não foi eficiente para inibição da migração larval, não diferindo significativamente do tratamento controle com água e Tween.

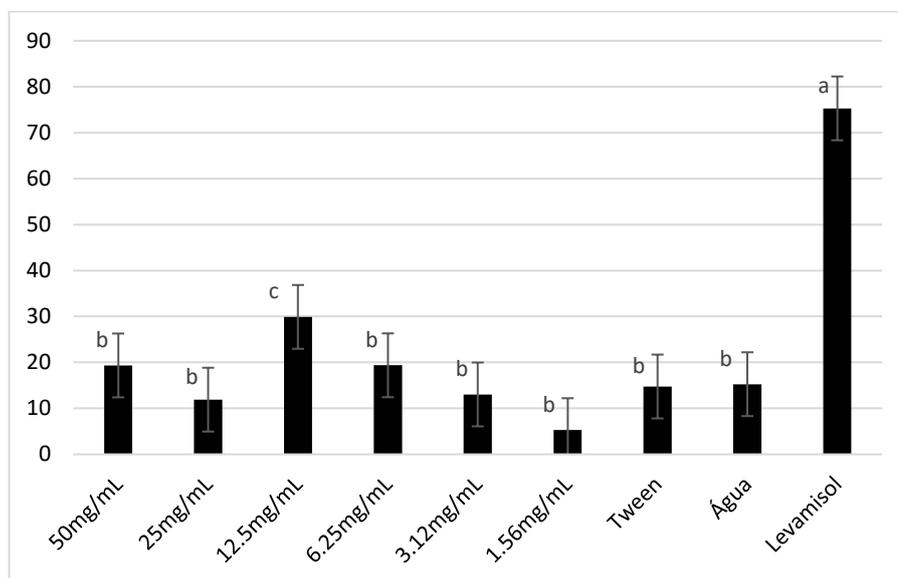


Figura 2: Média da porcentagem de eficácia da própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellífera*) em inibir a migração larval de helmintos da família *Trichostrongylidae*. Letras iguais apresentadas nas colunas do gráfico acima representam as concentrações em que não foi observado diferença estatística nos resultados. As diferentes letras obtidas no gráfico apresentam diferença estatística entre si.

O cálculo da concentração para inibir 50% da eclodibilidade, a IC_{50} da própolis verde, resultou em 4,515 mg/mL, e o da migração larval foi de 450,6mg/mL, ambos para parasitos da família *Trichostrongylidae* recuperados de fezes de caprinos naturalmente infectados.

Estudos *in vitro* realizados por BAUNGRATZ et al. (2019) mostraram resultados semelhantes em avaliação de parasitos de ovinos utilizando extrato de própolis verde nas concentrações de 99.99 mg/mL e 49.99 mg/mL alcançando taxas de inibição da eclodibilidade em nematódeos gastrointestinais de 96% e 100%, respectivamente, com IC_{50} de 26.81 mg/mL. Já para o teste de migração larval, a autora obteve a maior taxa de inibição na concentração de 99.99 mg/mL de própolis verde com uma inibição de migração de 97% das larvas.

Em estudos *in vivo*, Linécio et al. (2013) constataram a eficiência da utilização da própolis verde em ovinos sob uma única administração oral na dosagem de 10mL de extrato alcóolico de própolis a 30%. Tal dosagem foi suficiente para reduzir o número de ovos por grama de fezes em todos os 21 dias posteriores à aplicação, enquanto a dosagem de 5 mL do extrato não apresentou efetividade na primeira semana após a aplicação, sendo a maior eficiência encontrada no 21º dia. Resultados semelhantes foram encontrados em bovinos por Heinzen et

al., (2012), que conduziram experimento utilizando bezerros da raça Holandesa, de aproximadamente 90 dias de idade divididos em lotes que receberam tratamentos individuais via oral de extrato alcóolico de própolis a 30% no volume de 10 mL a cada 8 horas por 4 dias consecutivos. Sendo possível verificar a redução de 48,48% na taxa de OPG em 83% dos animais, podendo ser empregado como medida profilática de helmintoses em bovinos.

Loureiro (2007) avaliou 18 cordeiros Ile de France com 5 kg de peso corporal iniciais ao desmame. Os animais foram distribuídos em tratamentos controle, e em tratamentos que receberam 15mg de extrato de própolis a 11%/kg de peso corporal e 30 mg de extrato de própolis a 11%/kg de peso corporal fornecidos via *creep feeding*. A partir do estudo, foi possível comprovar a eficiência na redução das taxas de OPG de 3,53 (ovinos testemunha) para 3,06 em ovinos tratados com 30 mg de extrato de própolis/kg de peso corporal adicionados à ração.

O extrato aquoso de própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*) é uma substância complexa com composição química variável. A origem botânica da própolis é um fator importante de variação da sua composição. Bastos et al. (2000) identificaram em estudo na região do cerrado de Minas Gerais, por análise microscópica, que o pólen contido na própolis bruta apresentava como principal fonte do material resinoso as gemas foliares de *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como “alecrim do campo”. Apesar das diferentes composições da própolis, atualmente, sabe-se que ela possui diversas aplicações medicinais, sendo indicada como antibiótico, sem induzir resistência aos microrganismos, e como tratamento antifúngico, antiviral, anti-inflamatório e cicatrizante (GONÇALVES, 2019).

Estudos realizados anteriormente utilizando diversos óleos essenciais apresentaram resultados dose-dependentes de acordo com a concentração dos compostos. Para o óleo de *Cuminum cyminum* L, o cominho, obtido a partir dos frutos, observou-se máxima eficiência (98.62%) na concentração de 9.4 mg/mL, não diferindo estatisticamente do controle realizado com anti-helmíntico em teste de eclodibilidade contra *Haemonchus contortus* em ovinos (DE CASTRO et al., 2021). Utilizando a *Melaleuca alternifolia* (árvore-do-chá) Grandó et al. (2016) obtiveram 100% de inibição da eclusão na concentração de 56 mg/mL, enquanto Pinto et al. (2019) obtiveram variação de 97.4% a 100% de inibição na eclodibilidade utilizado concentrações de 227.5 mg/mL a 7.1mg/mL, respectivamente com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, o alecrim, demonstrando uma tendência a melhores resultados sob maiores concentrações.

5. CONCLUSÃO

O extrato de própolis apresentou alta eficácia ovicida, sendo a melhor eficiência obtida na concentração de 25 mg/mL com 87,43% de inibição, embora o composto tenha apresentado baixa eficiência em relação à migração larval comparativa à anti-helmínticos sintéticos. Sendo assim, a própolis verde de abelhas europeias (*Apis mellifera*) pode ser considerada um composto promissor para o controle de parasitos da família Trichostrongylidae nas suas fases iniciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Luciana de Paiva Santos; MARTINAZZO, Ana Paula. A busca pelo uso de produtos naturais na prevenção de infecção por Covid-19. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 41613-41650, 2021.

ALONSO-DÍAZ, M. A. et al. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. **Veterinary parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 187-192, 2008.

BANKOVA, Vassya. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BASTOS, Esther Margarida Alves Ferreira et al. Microscopic characterization of the green própolis, produced in Minas Gerais State, Brazil. **Honeybee Science**, v. 21, n. 4, p. 179-180, 2000.

BATISTA, M. C. A. Bioprospecção anti-helmíntica da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em testes in vitro com ovos e larvas de *Haemochus contortus* de pequenos ruminantes, São Luís. 2016. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

BAUNGRATZ, Andressa Radtke et al. **Extrato de própolis verde no controle de helmintos gastrointestinais de ovinos e caprinos: estudos in vitro e in vivo**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

BRUNET, Séverine et al. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both in vitro and in vivo. **Parasitology**, v. 134, n. 9, p. 1253-1262, 2007.

BRUNO, Luciana Oliveira; MARQUES, Luis Carlos; CARDOSO, Caroly Mendonça Zanella. Análise das normas vigentes para registro de fitoterápicos veterinários no Brasil. **Science And Animal Health**, v. 4, n. 3, p. 209-227, 2016.

COLES, G. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

DA SILVA, Haroldo Wilson; GUIMARÃES, Cristiano Rodrigues Borges; OLIVEIRA, Tadeu Silva. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, 2012.

DE CASTRO, Leonardo Mortagua et al. Atividade in vitro do óleo essencial de Cuminum cyminum contra *Haemonchus contortus* de ovinos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 44079-44091, 2021.

DONADIEU, Y. – **La própolis – thérapeutique naturelle**, Maloine, Paris, 1986.

ENGSTROM, M. T. et al. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their in vitro activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 840-851, 2016.

FERREIRA, Giovani. **Recorde de exportação de mel em 2021**. 2021. Disponível em: <<https://www.canalrural.com.br/noticias/brasil-deve-bater-recorde-de-exportacao-de-mel-em-2021/>> Acesso em: 25 jan. 2021.

FRANCO, S. L. et al. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, p. 1-10, 2000.

GADELHA, Claudia Sarmiento et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 27, 2013.

GONÇALVES, Juliane. **As propriedades farmacológicas da própolis e seus benefícios para a saúde humana**. 2019.

GORDON, H. McL et al. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J Counc Sci Ind Res**, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GRANDO, T. H. et al. In vitro activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 3, p. 377-382, 2016.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee world**, v. 71, n. 3, p. 107-118, 1990.

HEINZEN, Eduardo Luiz et al. Extrato de própolis no controle de helmintoses em bezerros. **Acta Veterinaria Brasilica**, p. 40-44, 2012.

HUBERT, J.; KERBOEUF, Dominique. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The veterinary record**, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

IBGE. **Produção agropecuária**, 2021. Disponível em:

<<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>> Acesso em: 25 jan. 2023.

JACKSON, Frank; HOSTE, Hervé. In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: **In vitro**

screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Springer, Dordrecht, 2010. p. 25-45.

KAPLAN, Ray M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KLOSOWSKI, Ana Léa Macohon; KUASOSKI, Marli; BONETTI, Maria Beatriz Petroski. Apicultura brasileira: inovação e propriedade industrial. **Revista de política agrícola**, v. 29, n. 1, p. 41, 2020.

LINÉCIO, Marlus et al. Verminose em ovelhas tratadas com extrato alcóolico de própolis. 2013.

LOPES, S. G.; COSTA-JUNIOR, L. M. Controle de helmintos gastrintestinais utilizando plantas no Brasil. **Controle de Helmintos de ruminantes no Brasil. Jundiaí: Paco Editora**, p. 261-304, 2015.

LOUREIRO, Cintia Maria Battiston. Redução de verminose, parâmetros hematológicos e bioquímicos de cordeiros alimentados com extrato de própolis na ração. 2007.

MOLENTO, M. B. et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 253-263, 2013.

MONDAL, Himangsu et al. Anthelmintic activity of ellagic acid, a major constituent of *Alternanthera sessilis* against *Haemonchus contortus*. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 35, n. 1, 2015.

MOREIRA, J. N.; GUIMARÃES FILHO, C. Sistema tradicionais para a produção de caprinos e ovinos. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2011.

MORONI, F.T., HAMAGUCHI, A., BRANDEBURGO, M.A.M. **Avaliação da eficácia de diferentes doses de própolis na redução da parasitemia e no aumento da sobrevivência em**

camundongos experimentalmente infectados com Trypanossoma cruzi. Revista da Universidade de Franca, v.7, n.7, p.50, 1999. n.7, Edição especial.

PAPADOPOULOS, E. **Anthelmintic resistance in sheep nematodes.** **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1-2, p. 99-103, 2008

PEREIRA, Alberto dos Santos; SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias Silva; AQUINO NETO, Francisco Radler de. Propolis: 100 years of research and future perspectives. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PINTO, Natália Berne et al. Potencial ovicida e larvicida de Rosmarinus officinalis para controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 807-811, 2019.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

RODRIGUES, Paulo Ricardo Centeno. **Medicina de Ovinos e Caprinos.** P 47-49.

RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos. **Doenças de Ruminantes e Equinos**, v. 2, p. 19-162, 2001.

SANTOS, Camila Gonçalves Dos et al. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Hymenoptera: Meliponini) workers associated with propolis. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 1, p. 137-143, 2009.

SILVA, WILSON W.; BEVILAQUA, CLAUDIA ML; RODRIGUES, ML de A. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-árido Paraibano, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 71-75, 2003.

TONELOTTO, M. et al. Atividade ovicida de fitoterápicos sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.

TORETI, Viviane Cristina et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, 2013.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. Parasitologia veterinaria. 2 ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1998.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of food biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

YÁÑEZ, Enrique Alejandro et al. Restrição alimentar em caprinos: rendimento, cortes comerciais e composição da carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2093-2100, 2006.