

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Atividades *in vitro* dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens* e *Thymus vulgaris* sobre *Haemonchus contortus*

Leonardo Mortagua de Castro

Pelotas, 2018

Leonardo Mortagua de Castro

Atividades *in vitro* dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens* e *Thymus vulgaris* sobre *Haemonchus contortus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Maria Elisabeth Aires Berne

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C355a Castro, Leonardo Mortagua de

Atividades in vitro dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens* e *Thymus vulgaris* sobre *Haemonchus contortus* / Leonardo Mortagua de Castro; Maria Elisabeth Aires Berne, orientadora. — Pelotas, 2018.

90 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Fitoterápicos. 2. Nematódeos. 3. Bioprospecção. I. Berne, Maria Elisabeth Aires, orient. II. Título.

CDD : 636.0895

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Leonardo Mortagua de Castro

Atividades in vitro dos óleos essenciais de Cuminum cyminum, Anethum graveolens e Thymus vulgaris sobre Haemonchus contortus

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16/08/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Maria Elisabeth Aires Berne (Orientador)
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela
Doutor em Ciências da Saúde pela FIOCRUZ-MG

Prof. Dr. Felipe Geraldo Pappen
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente
Doutor em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família, em especial a minha mãe Mariza, por não medir esforços, me proporcionando todas as condições para alcançar meus objetivos, por todo amor e dedicação em minha criação.

À minha orientadora, professora Dra. Maria Elisabeth Aires Berne, obrigado por todas as orientações durante todo este ciclo de Pós-graduação, pela amizade e pelos conselhos.

Aos colegas de Laboratório, Natália, Micaele, Tairan, Gabriela, Wesley e Adriane por toda a ajuda durante este trabalho e pela grande amizade construída.

À Universidade Federal de Pelotas por proporcionar a realização do curso de Medicina Veterinária, Mestrado e Doutorado.

Aos colegas, funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação e Faculdade de Veterinária.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

Muito Obrigado!

***“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso.”
Albert Einstein***

Resumo

CASTRO, Leonardo Mortagua de. **Atividades *in vitro* dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens* e *Thymus vulgaris* sobre *Haemonchus contortus***. 2018. 90f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Os nematódeos gastrintestinais são os maiores causadores de perdas na ovinocultura, entre eles se destaca *Haemonchus contortus*. O controle desses nematódeos se dá basicamente com a utilização de anti-helmínticos comerciais, porém, estes vem demonstrando uma considerável diminuição na sua eficiência. Com isso, a necessidade de busca por novas alternativas de controle a estes parasitos é de suma importância. As plantas medicinais são utilizadas desde as civilizações mais antigas no controle de diversas doenças, inclusive de parasitoses, em vista disto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação *in vitro* dos óleos essenciais das plantas aromáticas *Anethum graveolens* (endro), *Cuminum cyminum* (cominho) e *Thymus vulgaris* (tomilho), em ovos e larvas (L1 e L3) de *H. contortus*, descrever os seus principais constituintes e determinar a concentração inibitória 50% (CI50). Para isto, os óleos essenciais (OEs) das plantas foram extraídos de sementes, através do aparelho de clewenger e para determinar os principais constituintes foi realizado a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os ovos e larvas foram obtidos através da coleta de fezes de ovinos naturalmente infectados. Foram realizados o teste de inibição da eclosão de ovos (IE), teste da inibição da migração larval (IML) e teste da inibição do desenvolvimento larval (IDL). As concentrações utilizadas dos OEs foram: 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58; 0,29 mg/mL, todos os testes acompanhados de controle positivo com anti-helmíntico comercial, controle negativo com água destilada e controle com tween. Os resultados obtidos na maior concentração dos diferentes OEs (9,4mg/mL) para IE foram 100%, 98,62% e 100%, para IDL foram de 98,58%, 69,12%, 100% e para IML foram de 63,7%, 23,45% e 95,30% para *A. graveolens*, *C. cyminum* e *T. vulgaris*, respectivamente. Os constituintes majoritários presentes no OE de *A. graveolens* foi o Dihydrocarvone (39.1%), no OE de *C. cyminum* o Cumaldehyde (27,39%) e no OE de *T. vulgaris* o endo-Borneol (30.48), respectivamente. A CI50 foi de 0.7642 mg/mL, 0,0012 mg/mL e 0,1373 mg/mL (IE), 0.8297 mg/mL, 3.70 mg/mL e 0,8056 mg/mL (IDL) e 2.234 mg/mL, 104,34 mg/mL e 0,7253 mg/mL (IML), para *A. graveolens*, *C. cyminum* e *T. vulgaris*, respectivamente. Baseados nos resultados aqui apresentados pode-se concluir que os OEs avaliados tem ação sobre as diferentes fases de desenvolvimento do *H. contortus*, portanto com potencial para obtenção de biomoléculas com atividade anti-helmíntica.

Palavras-chave: fitoterápicos; nematódeos; bioprospecção

Abstract

CASTRO, Leonardo Mortagua de. ***In vitro* activities of the essential oils of *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens* and *Thymus vulgaris* on *Haemonchus contortus***. 2018. 90f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Gastrointestinal nematodes are the major cause of losses in sheep production, among them *Haemonchus contortus*. The control of these nematodes is basically due to the use of commercial anthelmintics, but these have shown a considerable decrease in their efficiency over the decades. Therefore, the need to search for new control alternatives to these parasites is of paramount importance. In view of this, the present study aimed to evaluate the *in vitro* action of the essential oils of the aromatic plants *Anethum graveolens* (dill), *Cuminum cyminum* (cumin) and *Thymus vulgaris* (thyme), in *H. contortus* eggs and larvae (L1 and L3), determine their main constituents and determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀). For this, the essential oils (OEs) of the plants were extracted from seeds, through the cleverger apparatus and to determine the main constituents was carried out the gas chromatography coupled to mass spectrometry. Eggs and larvae were obtained by collecting naturally infected sheep feces. The eggs hatch inhibition test (IE), larval migration inhibition test (IML) and larval development inhibition test (IDL) were performed. The concentrations used were: 9.4; 4.7; 2.35; 1.17; 0.58; 0.29 mg / mL, all tests followed by commercial anthelmintic positive control, negative control distilled water and control with tween. The results obtained in the highest concentration of the different OEs (9.4 mg / mL) for IE were 100%, 98.62% and 100%, for IDL were 98.58%, 69.12%, 100% and for IML were of 63.7%, 23.45% and 95.30% for *A. graveolens*, *C. cyminum* and *T. vulgaris*, respectively. The major constituents present in OE *A. graveolens* were Dihydrocarvone (39.1%), OE *C. cyminum*, Cumaldehyde (27.39%) and OE *T. vulgaris* and endo-Borneol (30.48), respectively. The IC₅₀ was 0.7642 mg / mL, 0.0012 mg / mL and 0.1373 mg / mL (IE), 0.8297 mg / mL, 3.70 mg / mL and 0.8056 mg / mL (IDL) and 2.234 mg / mL, 104.34 mg / mL and 0.7253 mg / mL (IML), for *A. graveolens*, *C. cyminum* and *T. vulgaris*, respectively. Based on the results presented here, it can be concluded that the evaluated OEs have an action on the different stages of development of *H. contortus*, therefore with potential to obtain biomolecules with anthelmintic activity.

Keywords: herbal medicines; nematodes; bioprospecting

Lista de Figuras

Figura 1: Sementes de <i>Cuminum cyminum</i>	20
Figura 2: Planta de <i>Cuminum cyminum</i>	21
Figura 3: Sementes de <i>Anethum graveolens</i>	22
Figura 4: Planta de <i>Anethum graveolens</i>	22
Figura 5: Sementes de <i>Thymus vulgaris</i>	23
Figura 6: Planta de <i>Thymus vulgaris</i>	23

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Resultados da atividade do óleo essencial de <i>A. graveolens</i> em diferentes fases de desenvolvimento de <i>H. contortus</i> (ovos, larvas de primeiro estágio - L1 e larvas infectantes - L3).....	36
----------	--	----

Artigo 2

Tabela 1	Principais constituintes químicos do óleo essencial de <i>Cuminum cyminum</i> obtidos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	52
Tabela 2	Porcentagem de eficácia do óleo essencial de <i>Cuminum cyminum</i> sobre ovos e larvas (L1 e L3) de <i>Haemonchus contortus</i>	52

Artigo 3

Tabela 1	Percentual de ação do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> contra ovos e larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	67
Tabela 2	Percentual de viabilidade de células MDBK após incubação com óleo essencial de <i>T. vulgaris</i>	67
Tabela 3	Tabela 3: Constituintes químicos do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> após análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	68

Lista de Abreviaturas e Siglas

B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
G	Gramas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L1	Larvas de Primeiro Estádio
L2	Larvas de Segundo Estádio
L3	Larvas de Terceiro Estádio / Larvas Infectantes
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
μL	Microlitro
μm	Micrometro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
OPG	Ovos por Grama de Fezes
RPM	Rotações por minuto
GC/MS	Cromatografia Gasosa com espectro de massa

Sumário

1 Introdução	11
1.1 Hipótese	12
1.2 Objetivos	12
1.2.1 Objetivo Geral	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
2 Revisão da Literatura	14
2.1 Ovinocultura	14
2.2 Nematódeos gastrintestinais	14
2.3 Anti-helmínticos	16
2.4 Plantas medicinais	18
2.4.1 <i>Cuminum cyminum</i>	20
2.4.2 <i>Anethum graveolens</i>	21
2.4.3 <i>Thymus vulgaris</i>	22
3 Artigos	24
3.1 Artigo 1	24
3.2 Artigo 2	45
3.3 Artigo 3	61
4 Considerações finais	73
Referências	74
Anexos	89

1 Introdução

O Brasil tem no setor primário a base da sua economia, sendo a pecuária uma das mais lucrativas atividades. O estado do Rio Grande do Sul por sua vez, possui grande tradição na criação de ovinos, na década de 70 possuía um rebanho de aproximadamente 15 milhões de animais, que tinham como função primordial a produção de lã para as indústrias têxteis, a carne destes animais era basicamente utilizada na alimentação dentro das fazendas, não atingia os grandes centros. Com o advento dos materiais sintéticos, o interesse pela lã ovina diminuiu consideravelmente ocasionando uma redução drástica no rebanho gaúcho. Desde então o foco da produção ovina se voltou para o mercado da carne, que nos últimos anos alcançou a população mais exigente, ocorrendo a valorização produto, com isto houve um crescente interesse na criação de ovinos. Atualmente o estado possui o maior rebanho do país, com raças caracterizadas por serem produtoras de carne, lã e leite.

O grande limitante da produção dos ovinos são os nematódeos gastrintestinais, estes parasitos são responsáveis por perdas significativas na ovinocultura mundial, tanto em modelos extensivos como intensivos de produção, ocasionando retardo no crescimento, perda de peso, baixa produção e qualidade da lã, carne e leite, podendo chegar até a morte dos animais. Entre os principais parasitos, destaca-se a família Trichostrongylidae, representada principalmente pela espécie *Haemonchus contortus*, mais patogênico e mais prevalente parasito de ovinos.

O controle sempre foi realizado com a utilização de anti-helmínticos, produtos comerciais que estão há décadas no mercado, e tem sua eficiência comprometida pela resistência desenvolvida pelos parasitos, devido ao uso repetitivo, errôneo e, muitas vezes, sem orientação por parte dos produtores. Há uma necessidade urgente de se buscar novas estratégias que possam vir a auxiliar no controle destes nematódeos, estando entre estas os fitoterápicos.

Sabe-se que as plantas são utilizadas como meio de controle a doenças da saúde humana e animal desde as civilizações mais antigas. Baseado nesse

conhecimento popular iniciaram-se estudos utilizando diferentes plantas para controle de diversos microrganismos, doenças e síndromes.

Na parasitologia, a busca por fitoterápicos que apresentem ação anti-helmíntica é extensa, já apresentando resultados promissores com diversas famílias de plantas, sobre as mais diversas metodologias científicas aplicadas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

As plantas *Anethum graveolens* (endro), *Cuminum cyminum* (cominho) e *Thymus vulgaris* (tomilho) são plantas aromáticas conhecidas mundialmente como especiarias, temperos para os mais diversos pratos. Além disso, seu uso na medicina popular é vasto, com ação como fungicidas, bactericidas, antioxidante entre outros.

Com base nisso, foi proposto este estudo que avaliou a ação anti-helmíntica *in vitro* dos óleos essenciais destas três plantas, em três distintas fases do ciclo evolutivo dos nematódeos gastrintestinais.

1.1 Hipótese

Os óleos essenciais das plantas, *Cuminum cyminum* (cominho), *Anethum graveolens* (endro) e *Thymus vulgaris* (tomilho) já utilizadas na cultura popular para diversos fins, e testadas cientificamente contra diversos micro-organismos, também possuem ação anti-helmíntica contra ovos e larvas de *Haemonchus contortus*.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o potencial antiparasitário de óleos essenciais das plantas, *Cuminum cyminum* (cominho), *Anethum graveolens* (endro) e *Thymus vulgaris* (tomilho) sobre ovos e larvas de *Haemonchus contortus*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Cuminum cyminum* na inibição da eclodibilidade de ovos, inibição da migração larval, inibição do desenvolvimento larval;

- Verificar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Anethum graveolens* na inibição da eclodibilidade de ovos, inibição da migração larval, inibição do desenvolvimento larval;

- Verificar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Thymus vulgaris* na inibição da eclodibilidade de ovos, inibição da migração larval, inibição do desenvolvimento larval;
- Descrever os constituintes majoritários dos óleos essenciais;
- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais com potencial anti-helmíntico em células eucarióticas;
- Determinar a Concentração Inibitória (CI 50) para cada óleo.

2 Revisão da Literatura

2.1 Ovinocultura

A produção agropecuária é um dos principais setores da economia brasileira, e também do estado do Rio Grande do Sul. O rebanho de ovinos no Brasil conta atualmente com 18,4 milhões de cabeças, onde 70% destes são criados por produtores familiares, principalmente nas regiões nordeste e sul do país, tendo como produto final a lã, a carne e o leite (IBGE, 2016).

No Rio Grande do Sul a ovinocultura está como uma das mais tradicionais atividades da pecuária, atualmente o rebanho ovino no estado é de aproximadamente 4 milhões de cabeças, sendo o rebanho gaúcho o maior do país, representando 21,5% do rebanho nacional. Este é caracterizado por ser um rebanho lanado, com uma produção de 10,9 toneladas de lã que abastecem o mercado interno da moda anualmente (IBGE, 2016).

Além da lã de qualidade, atualmente a carne ovina, antes muito consumida dentro das fazendas por ser uma carne de pouco valor, hoje atingiu os grandes centros consumidores, trazendo um alto valor agregado e tornando-se a quinta carne mais consumida no país, em torno de 0,7 kg/ano por brasileiro (MAPA, 2013).

O leite por sua vez, se destaca por ser o que apresenta maiores teores de proteínas, lipídeos, cálcio e fósforo. Na produção de queijos, o leite ovino possui um maior rendimento quando comparado ao leite bovino, isso devido a sua proporção maior de gordura e proteína (CAMPOS, 2011).

2.2 Nematódeos gastrintestinais

Com o crescimento da atividade e aumento da produtividade na ovinocultura, também aumentam os desafios para o produtor, tornando-se necessário combater os principais entraves da produção de ovinos, entre as quais se destacam os nematódeos gastrintestinais, cuja infecção é considerada o principal problema sanitário enfrentado na ovinocultura em diferentes regiões do mundo (MELO, 2000; VIEIRA, 2008).

Praticamente 100% dos ruminantes domésticos são parasitados por no mínimo uma espécie de endoparasita (AMARANTE, 2004).

As infecções pelos nematódeos gastrintestinais podem causar diversos efeitos ao seu hospedeiro, estes vão variar de acordo com a idade, raça, estado fisiológico, carga parasitária e as espécies de parasitos envolvidos (SILVA et al., 2012).

Os ovinos (*Ovis aries*) constituem a espécie de animal doméstico mais acometida por estes parasitos, podendo levar à perda peso, diminuição do desenvolvimento corporal, baixa produção de carne, baixa produção de lã, diminuição da qualidade da lã, podendo levar o animal a óbito, além de gerar gastos indiretos na produção, como os custos com o tratamento (FURTADO, 2006).

A família Trichostrongylidae é a de maior impacto entre os nematódeos gastrintestinais de ovinos, estes se caracterizam por apresentarem duas fases distintas no seu desenvolvimento, uma livre, quando os ovos são eliminados juntamente com as fezes no ambiente, estes dão origem as larvas que evoluem até a forma infectante, a larva de terceiro estágio (L3), esta é ingerida pelo hospedeiro, onde irá ocorrer a fase parasitária, culminando na presença do adulto no sistema digestório.

Dentre os nematoides gastrointestinais de ovinos, *Haemonchus contortus* é a principal espécie, seguido pelo *Trichostrongylus colubriformis* e outros gêneros, como *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Strongyloides*, *Trichuris*, *Teladorsagia* e *Nematodirus*. A importância de cada gênero de nematoide varia de acordo com a região geográfica, clima, consorciação com outros animais, tipo de manejo, dentre outros fatores regionais (AMARANTE et al., 1992).

O nematódeo *H. contortus* apresenta-se como o mais patogênico e prevalente, ocorrendo muitas vezes em infecções mistas (KRECEK & WALLER, 2006). Os ovinos são altamente susceptíveis, apresentando altas taxas de infecção e as fêmeas deste parasito possuem um grande potencial biótico, eliminando entre 5000 a 10000 ovos/dia (JACQUIET et al., 1998). Tem como órgão de eleição o abomaso de ruminantes, fazem hematofagia, o que vai levar a seu principal sinal clínico que é a anemia, além de perdas de proteínas e lesões na mucosa gástrica (STRAIN & STEAR, 2001). Também, o parasitismo por *H. contortus* acarreta alteração da função ruminal, gerando elevação do pH, diminuição do nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis. (DOYLE; KAHN; MCCLURE, 2011).

O animal parasitado com *H. contortus* mostra um comprometimento em torno de 15% na sua produção, direcionando os nutrientes para o seu sistema imune, na

tentativa de controlar a infecção. Além disto, há perdas devido a anemia, diminuição do apetite, alterações ruminais e menor eficiência na digestão dos alimentos (GREER, 2008).

O nematódeo *T. colubriformis* por sua vez, é o segundo mais prevalente (AMARANTE, 2004). Parasitam o intestino delgado, provocam exsudação de proteínas séricas para o lúmen intestinal, isso se deve a grave enterite causada pelo parasitismo, que provoca inúmeras lesões e alterações na mucosa e epitélio intestinal, animais muito parasitados apresentam como sinais clínicos anorexia e diarreia (FURTADO, 2006; TAYLOR et al., 2002). Quando em altas infecções, pode levar a uma diminuição da absorção e digestão dos nutrientes (CANTACESSI et al., 2010).

2.3 Anti-helmínticos

O controle das parasitoses gastrintestinais de ovinos é realizado basicamente com o uso de anti-helmínticos, estes são aplicados pelos produtores em várias períodos durante o ano e muitas vezes com alta rotatividade do princípio ativo utilizado, o que acaba acarretando na diminuição da eficácia do produto (BORGES, 2003). Essa diminuição de eficácia, caracteriza a resistência anti-helmíntica pode ser definida como um aumento da habilidade das cepas de parasitos em resistir ou sobreviver aos mecanismos de ação de uma determinada droga que poderia ser letal para populações susceptíveis (VIEIRA, 2008; TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008).

O primeiro relato de resistência aos anti-helmíntico foi descrito por Drudge et al. (1964) em Kentucky, Estados Unidos, onde foram testados diferentes princípios ativos frente aos nematódeos gastrintestinais, apresentando a resistência do *H. contortus* ao Tiabendazol.

No Brasil, o primeiro relato de resistência do *H. contortus* ocorreu frente a este mesmo princípio ativo no estado do Rio Grande do Sul (SANTOS & GONÇALVES, 1967).

A resistência anti-helmíntica simultânea a diversos princípios ativos vem sendo documentada. Rosalinski-Moraes et al. (2007) constataram, em rebanhos ovinos do estado do Paraná, resistência anti-helmíntica a diferentes princípios ativos: oxfendazol, levamisole, tetramisol, ivermectina, moxidectina, closantel e também detectaram resistências em associações entre os anti-helmínticos tetramisol e disofenol e entre oxfendazol e closantel.

Resistência anti-helmíntica múltipla também foi diagnosticada por Almeida et al. (2010) ao avaliarem os princípios ativos moxidectina, closantel, triclorfon, fosfato de levamisole, albendazole e ivermectina frente a isolados de *H. contortus* e *T. colubriformes*.

No Rio Grande do Sul, Cezar et al. (2010), utilizando os princípios ativos levamisol, moxidectina, albendazol, ivermectina, nitroxinil, disofenol, triclorfon, closantel e a associação ivermectina com levamisol e albendazol, em ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, observaram não haver a redução do OPG a nenhum destes fármacos testados, demonstrando resistência anti-helmíntica múltipla.

Os anti-helmínticos comerciais utilizados no controle destes nematódeos se restringiram por muitos anos a três classes de fármacos: benzimidazóis, Imidotiazóis/hidropirimidinas e lactonas macrocíclicas, porém devido ao longo tempo de uso de maneira indiscriminada a resistência anti-helmíntica está disseminada em todas as regiões de produção de ovinos.

Ultimamente, houve o lançamento de novas drogas no mercado com alta eficiência, monepantel, derquantel e emodepside, porém estas por sua vez apresentam custos muito elevados para o produtor. Sendo assim, os casos de resistência anti-helmíntica podem transpor o surgimento de novas drogas, sendo esta considerada atualmente a maior ameaça à produção de ovinos (BUTTLE et al., 2011; EL-ABDELLATI et al., 2010). Porém, já tem sido relatado resistência ao monepantel (MEDEROS, RAMOS & BANCHERO, 2014; VAN DEN BROM et al., 2015).

O controle de forma efetiva dos nematódeos gastrintestinais deve abordar o aumento da resiliência, resistência, redução da carga parasitária no hospedeiro e a diminuição do número de larvas infectantes nas pastagens (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008).

É necessário que o manejo seja um aliado no controle dos parasitos, junto com o uso alternado de medicamentos, com o objetivo de quebrar o ciclo de vida do parasito, diminuindo a quantidade de aplicações e gastos com mão-de-obra (GOOD et al., 2006).

2.4 Plantas medicinais

Para a preservação da eficácia dos anti-helmínticos comerciais são necessárias à implantação de estratégias de controle integrado das parasitoses, unindo o uso estratégico destas drogas e métodos não farmacológicos (WALLER & TRANSBERG, 2004).

Uma excelente alternativa para auxiliar no controle as parasitoses é a detecção de substâncias ativas em extratos de plantas, atuando em conjunto com as drogas comerciais e assim prolongando a vida útil dos anti-helmínticos, além de diminuir o risco de resíduos químicos nos produtos de origem animal, constituindo em uma prática sustentável e ambientalmente aceita (CHAGAS, 2008; COSTA et al., 2008).

As plantas vêm sendo utilizadas no tratamento inúmeras doenças, muito empregadas pelas civilizações, quando ainda não havia o desenvolvimento de produtos farmacêuticos avançados, devido a isso o uso de produtos naturais derivados de plantas, minerais e animais foram por muito tempo a principal fonte de drogas. O estudo de plantas utilizadas na cultura popular e o seu reconhecimento como fitoterápico, aliado a necessidade de desenvolvimento de novas drogas, acarretaram no aumento do número de pesquisas e publicações na área. Porém, para que os medicamentos derivados destas plantas possam ser aceitos e utilizados estes precisam ser comprovadamente eficazes, seguros e com o mesmo controle de qualidade a que os produtos sintéticos são submetidos (RATES, 2001).

Para comprovar a eficácia desejada, o produto oriundo da planta deve ser avaliado em várias etapas. Os testes *in vitro* tem papel importante na triagem de plantas, visto que estes participam da seleção de plantas que possuem melhor atividade, e a partir desta etapa sigam no processo, evitando que testes mais caros sejam realizados, assim diminuindo gastos, perda de tempo e principalmente a utilização desnecessária de animais (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Inúmeros extratos e óleos essenciais de plantas já foram testados *in vitro* e *in vivo* contra diversas fases de vida dos nematódeos gastrintestinais de ovinos. O teste *in vitro* de inibição da eclosão de ovos foi desenvolvido por Coles (1992), para a avaliação da resistência anti-helmíntica em nematódeos gastrintestinais, sendo hoje muito utilizado para avaliação da eficiência anti-helmíntica das plantas. A inibição da eclodibilidade dos ovos teste também utilizado nas avaliações de plantas e já utilizado frente ao óleo essencial de alfavaca (*Ocimum gratissimum*) (PESSOA et al., 2002) e

também o extrato aquoso e hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgares*) contra ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos (DIAS DE CASTRO et al., 2013).

O óleo essencial e o extrato hidroalcoólico de manjeriço (*Ocimum basilicum*), apresentaram atividade na inibição da eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos, tendo o óleo uma atividade de 100% nas maiores concentrações (CASTRO, 2017).

Os testes realizados com larvas, teste de inibição da motilidade larval e teste de desenvolvimento larval são técnicas modificadas a partir de Hubert & Kerbouef (1992). Os produtos com atuação em larvas podem ser absorvidos de duas maneiras diferentes pelo parasito: Nas larvas L1 e L2 estes podem ser ingeridos juntamente com os micro-organismos, dos quais estas larvas se alimentam ou através de sua cutícula única; Nas L3 estes são mais dificilmente absorvidos, pois estas não se alimentam e possuem cutícula dupla o que lhes oferece maior proteção (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Frente as larvas, Assis et al. (2003) obtiveram bons resultados com os extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico de arapabaca (*Spigelia anthelmia*) inibindo o desenvolvimento larval de *H. contortus*.

No teste de inibição da migração larval, Alonso-Díaz et al., (2008) relatou a eficácia dos extratos de acácia (*Acacia pennatula*), tamarindo selvagem (*Lisyloma latisiliquum*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) na inibição da migração das L3.

Dentre os testes *in vivo*, o mais utilizado é o teste de redução da contagem de ovos nas fezes, sendo este preconizado também para a avaliação da resistência dos parasitos aos anti-helmínticos comerciais disponíveis (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Para a obtenção do resultado, deve ser feita a contagem do OPG antes e depois da administração do tratamento (TAYLOR et al., 2002).

Nestes moldes, Vieira et al. (1999), testaram melão de São Caetano (*Momordica charantia*), fruta-do-conde (*Annona squamosa*) apresentando efeito de redução da liberação de ovos e diminuição da carga parasitária de *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum columbianum*.

O problema de resistência anti-helmíntica é grave, necessitando urgente de novas alternativa no controle dos nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. Dentre as alternativas têm-se resultados promissores com utilização de plantas, o que motivou este estudo para avaliação de diferentes plantas sobre os nematódeos gastrintestinais de ovinos.

2.4.1 *Cuminum cyminum*

A planta *Cuminum cyminum*, popularmente conhecida como cominho, pertencente à família Apiaceae, é uma planta aromática, cultivada principalmente na Índia, China, Arábia e nos países adjacentes ao Mar Mediterrâneo (HAJLAOUI et al., 2010). É considerada a segunda especiaria mais popular do mundo, é muito utilizada na culinária como tempero.

Na cultura popular do Irã é utilizada a mais de duzentos anos no tratamento de diarreia, dor de dente e epilepsia. Estudos que buscam comprovar as ações medicinais de *C. cyminum* vem sendo realizados.

PAJOHI et al. (2011) comprovou o efeito bactericida do óleo essencial contra *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* em alimentos.

Outra função conhecida do cominho é sua ação anti-diabetes, foram desenvolvidos por Patil et al. (2013), que comprovaram a ação do cuminaldehyde, um dos principais constituintes extraídos do óleo, em reduzir glicose sanguínea sem causar hipoglicemia.

Além destas utilizações este já apresentou ação antioxidante (BETTAIEB et al., 2010), antifúngica e antiaflatoxinas (KEDIA et al., 2014).



Figura 1: Sementes de *Cuminum cyminum*.

Fonte: www.webspices.com.br/produto/cominho-em-sementes/



Figura 2: Planta de *Cuminum cyminum*.

Fonte: <https://www.naturalcura.com.br/planta-cominho/>

2.4.2 *Anethum graveolens*

O *Anethum graveolens*, chamado popularmente de endro, pertencente à família Apiaceae, é originária dos Países Mediterrâneos e do sudeste da Europa. Tem como característica ser uma erva aromática, devido a isso, é muito utilizada como tempero para diversos alimentos.

Além de seu uso na culinária, é conhecido por suas atividades na medicina popular como diurético, contra problemas intestinais como cólicas e flatulências (HOSSEINZADEH, 2002). Além disso, também é utilizado tradicionalmente para promover o aumento da produção de leite e como promotor da menstruação em mulheres (MONSEFI, GHASEMI & BAHAODDINI, 2006).

Diversos estudos com esta planta, seus extratos e óleos estão sendo realizados. ISBILIR & SAGIROGLU (2011), utilizaram extrações de endro em diversos solventes como, água, etanol e acetona para comprovar sua ação antioxidante. Monsefi et al. (2011) usou sementes de endro na produção de extratos aquosos e etanólicos e comprovou a diminuição na fertilidade de ratos.

A. graveolens teve seu uso como antiparasitário testado por Sahib et al. (2014), que utilizou o extrato aquoso no tratamento de crianças com giárdia, obtendo a redução do parasitismo após o tratamento. O óleo essencial por sua vez apresentou ação contra fungos deterioradores de tomates (TIAN et al., 2011).



Figura 3: Sementes de *Anethum graveolens*.

Fonte: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/all/anethum-graveolens/>



Figura 4: Planta de *Anethum graveolens*.

Fonte: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/all/anethum-graveolens/>

2.4.3 *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris, popularmente conhecido como tomilho, pertencente à família Lamiaceae, é uma planta aromática, nativa da área do mediterrâneo ocidental de grande importância econômica para a América do Norte, Europa, Norte da África e Ásia. Sua utilização é muito conhecida como especiaria e popularmente para tratamento de problemas respiratórios, como asma, bronquite, resfriado, gripe e pneumonia, além de propriedades anti-helmínticas e diuréticas.

Pesquisas já comprovaram algumas de suas atividades cientificamente. Kohiyama et al. (2015) utilizou o óleo essencial de *T. vulgaris* no controle de *Aspergillus flavus*, comprovando sua ação antifúngica e antiaflatoxinas.



Figura 5: Sementes de *Thymus vulgaris*.

Fonte: <http://portuguese.alibaba.com/product-detail/Thyme-seed-138006990.html>



Figura 6: Planta de *Thymus vulgaris*.

Fonte: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/all/thymus-vulgaris/>

3 Artigos

3.1 Artigo 1

***Anethum graveolens* essential oil anti-helminthic action on *Haemonchus contortus* eggs and larvae**

Leonardo Mortagua de Castro; Natália Berne Pinto; Micaele Quintana de Moura; Rogério Antonio Freitag; Gabriela de Almeida Capella; Tairan Ourique Motta; Marcos Marreiro Villela; Maria Elisabeth Aires Berne.

Aceito para publicação na revista Brazilian Journal of Biology

**ANTIHELMINTHIC ACTION OF THE *ANETHUM GRAVEOLENS* ESSENTIAL OIL
ON *HAEMONCHUS CONTORTUS* EGGS AND LARVAE**

Running Title: Antihelminthic action of the *Anethum graveolens*

de Castro, L.M. ^a, Pinto, N. B. ^{*b}, de Moura, M. Q. ^c, Villela, M. M. ^d, Capella, G. A. ^e, Freitag, R. A. ^f, Berne, M. E. A. ^g.

^a Orcid: 0000-0002-5705-6748. Laboratory of Parasitology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900.

^b Orcid: 0000-0001-6822-501X. Laboratory of Parasitology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900.

^c Orcid: 0000-0002-2900-8300. Laboratory of Parasitology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900.

^d Orcid: 0000-0002-1614-8865. Laboratory of Parasitology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900.

^e Orcid: 0000-0002-0907-2233. Laboratory of Parasitology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900.

^f Orcid: 0000-0003-3714-2080. Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900.

^g Orcid: 0000-0003-4444-1134. Laboratory of Parasitology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900.

*** Corresponding author:** Natália Berne Pinto - Campus Universitário s/n Capão do Leão – Institute of Biology, Building 25 Rom. 12. CEP 96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brazil, Phone: 55 (53) 3275-7381 e-mail: nbernevet@gmail.com

Número de Tabelas: 01

Número de Figuras: 00

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes are responsible for great economic losses in sheep raising, and their control has long been carried out almost exclusively by the administration of anthelmintics, which have led to serious resistance problems. In the search for alternative control measures, phytotherapeutic research is highlighted. The aim of this study was to evaluate the action of *Anethum graveolens* (dill) essential oil on different stages of *Haemonchus contortus* life cycle, as well its cytotoxicity MDBK (Madin-Darby bovine kidney) cells. *H. contortus* larvae and eggs were obtained from infected sheep feces, and essential oil extracted from plant seeds through the Clevenger apparatus. 9.4, 4.7, 2.35, 1.17, 0.58 and 0.29 mg/mL concentrations were evaluated. The Egg Hatch Inhibition (HI), Larval Development Inhibition (LDI) and Larval Migration Inhibition (LMI) techniques were used. Thybendazole 0.025 mg/mL in HI and Levamisole 0.02 mg/mL in the LDI and LMI tests were used as positive controls, while distilled water and a Tween 80 solution were used as positive negative controls. The inhibition results obtained for the highest oil concentration were: HI 100%, LDI 98.58% and LMI 63.7%, differing ($p<0.05$) from negative controls. Main *A. graveolens* oil components present in 95.93% of the total oil were Dihydrocarvone (39.1%), Carvone (22.24%), D-Limonene (16.84%), Apiol (10.49%) and Trans-dihydrocarvone (7.26%). Minimum *A. graveolens* essential oil concentrations required to inhibit 50% (IC₅₀) of egg hatching, larval development and larval migration were 0.006 mg/mL, 2.536 mg/mL and 3.963 mg/mL, respectively. Cell viability in MDBK (Madin-Darby bovine kidney) cells, when incubated with *A. graveolens* essential oil, was 86% for the highest (9.4 mg/mL) and 99% for the lowest concentration (0.29 mg/mL). *A. graveolens* essential oil, according to the results obtained in this study, is a promising alternative in sheep gastrointestinal nematode control.

Keywords: Essential oil, dill, nematodes, sheep

**AÇÃO ANTI-HELMÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ANETHUM GRAVEOLENS*
SOBRE OVOS E LARVAS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*.**

Resumo

Os nematoides gastrintestinais são responsáveis por grandes perdas econômicas na ovinocultura, e seu controle tem sido realizado quase exclusivamente pela administração de anti-helmínticos, que levaram a sérios problemas de resistência. Na busca de medidas alternativas de controle, destaca-se a pesquisa fitoterápica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do óleo essencial de *Anethum graveolens* (endro) em diferentes estágios de *Haemonchus contortus*, bem como testar a viabilidade celular para o óleo. Larvas e ovos de *H. contortus* foram obtidos de fezes de ovinos infectados e óleo essencial extraído de sementes de plantas através do aparelho de Clevenger. As concentrações avaliadas foram 9.4, 4.7, 2.35, 1.17, 0.58 e 0.29 mg/mL. Verificou-se a Inibição de eclosão dos ovos (IE), Inibição de Desenvolvimento Larval (IDL) e Inibição de Migração Larval (IML). Tiabendazol 0.025 mg/mL em IE e Levamisole 0.02 mg/mL nos testes IDL e IML foram usados como controles positivos, enquanto água destilada e uma solução Tween 80 foram usados como controles negativos. Os resultados de inibição obtidos para a maior concentração de óleo foram: IE 100%, IDL 98.58% e IML 63.7%, diferindo ($p < 0.05$) dos controles negativos. Os principais componentes presentes em 95.93% do óleo total de *A. graveolens* foram Di-hidrocarvona (39.1%), Carvona (22.24%), D-Limoneno (16.84%), Apiol (10.49%) e Trans-di-hidrocarvona (7.26%). As concentrações mínimas de óleo essencial de *A. graveolens* necessárias para inibir 50% (IC₅₀) de eclosão dos ovos, desenvolvimento larval e migração larval foram de 0.006 mg/mL, 2.536 mg/mL e 3.963 mg/mL, respectivamente. A viabilidade celular nas células MDBK (rim bovino Madin-Darby), quando incubadas com o óleo essencial de *A. graveolens*, foi de 86% para a maior (9.4 mg/mL)

e 99% para a menor concentração (0.29 mg / mL). O óleo essencial de *A. graveolens* mostrou ser uma alternativa promissora no controle de nematoides gastrintestinais de ovinos.

Palavras-chave: óleo essencial, endro, nematódeos, ovelha

Introduction:

Sheep gastrointestinal nematodes are thought to be a major health problem faced by these animals around the world, and infections caused by these parasites are responsible for great losses in sheep raising (Acharya et al., 2014).

The control of these parasites has been carried out for decades, and has been mostly done by the administration of commercial anthelmintics; however, major ruminant nematodes are resistant to many of the available active principles, which is an obstacle to sheep farming (Cezar et al., 2010). Thus, different control approaches are necessary, either through parasite-resistant animals, the use of probiotics (Pinto et al., 2017) or the use of herbal medicine (Carvalho et al., 2012; Coêlho et al., 2017).

Studies making use of different plants have shown the anthelmintic potential on small ruminant nematodes (Acharya et al., 2014, Katiki, et al., 2017). *Anethum graveolens* (dill), of the Apiaceae family, is an aromatic plant originally from Mediterranean countries which has been widely used as seasoning in the preparation of different foods (Slupski et al., 2005). It has also been used in traditional herbal medicine as a diuretic and gastrointestinal disorder treatment (Hosseinzadeh et al., 2002). Studies have shown that *A. graveolens* acts against bacteria (Kaur and Arora 2009), fungi (Kumarasingha et al., 2016; Vieira et al., 2019), protozoa (Sahib et al., 2014) and insects (Khani and Basavand, 2013), although for the latter group their pollen grains may be used to feed certain orders (D'ávila et al., 2016).

The present study aimed to evaluate the action of *A. graveolens* essential oil against against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. In addition, *in vitro* cytotoxicity was also verified.

Material and methods:

Essential oil collection and chemical analysis

The plant used in the experiment, *A. graveolens* (dill), was purchased from a commercial distributor, having quality and origin certification (ET - 006/*Anethum graveolens* - Semente, LuarSulAlimentos®). To obtain the essential oil, seeds were subjected to steam extraction in a Clevenger apparatus for 4h. Afterwards, the oil obtained was dried with sodium sulfate, sodium p.a. anhydrous, stored in an amber flask and maintained at -18° C until use. For chemical analysis, the *A. graveolens* essential oil was subjected to gas chromatographic analysis together with mass spectrometry model GC/MS-QP 2010SE (Shimadzu, Japão). The sample was submitted an initial temperature of 40 °C, with a heating temperature of 5 °C/min to 280 °C, maximum temperature of 58 °C, the injector temperature being 58 °C and the interface 200 °C.

Cytotoxicity test

The cytotoxic effect of *A. graveolens* was determined by the MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) assay, as described by Mosmann (1983), by using Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells. This test was performed using the *A. graveolens* essential oil at the concentrations 9.4 mg/mL; 4.7 mg/mL; 2.35 mg/mL; 1.17 mg/mL; 0.58 mg/mL and 0.29 mg/mL, with the control using cell culture media MEM (Minimum Essential Media). All assays were in duplicated and cytotoxicity was evaluated by absorbance on the 540nm mass spectrophotometer.

Gastrointestinal nematode eggs

In order to obtain the eggs, six experimentally infected sheep with *Haemonchus contortus* showing EPG above 2000 eggs per gram of feces (Gordon and Whitlock, 1939) were used and kept indoors at the Federal University of Pelotas. Feces collected directly from the animals' rectal ampulla were processed according to Hubert and Kerboeuf's technique (1992) to separate eggs from fecal matter impurities. Briefly, the samples passed through four mesh sieves the size

1 mm, 105 µm, 55 µm and 25 µm. The first three were intended to retain the largest particles, and the last for egg retention.

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas – UFPel, under number 3897.

Gastrointestinal nematode larvae

To perform the tests, it was necessary to obtain 1st (L1) and 3rd stage (L3) larvae. L1 were retrieved by incubating feces containing *H. contortus* eggs in an incubator at 28°C and 80% relative humidity. After 24h incubation, the flasks containing the feces were covered with water and inverted, and L1 were collected after 4 hours, while L3 was obtained by using Roberts and O'Sullivan's technique (1950); after being retrieved, the parasites were identified and separated.

Egg Hatch Inhibition Test

The hatch test was based on the methodology as described by Coles et al. (1992), for which 24-well microculture plates were used. In each well, 150 *H. contortus* eggs were added together with *A. graveolens*, essential oil at six different concentrations (9.4, 4.7, 2.35, 1.17, 0.58 and 0.29 mg/mL); distilled water was used as negative control, and Tiabendazole 0.025 mg/mL and Tween 80 (1% of the final solution) were used as positive control; the latter was used to emulsify the oils in their dilutions. After 48 hours, Lugol was added for the purpose of interrupting hatching, and eggs and larvae were counted using an inverted microscope. Each treatment was performed in four replicates. Hatchability inhibition means for each treatment were determined according to the equation as described by Camurça-Vasconcelos et al. (2007), namely % Hatchability Inhibition = number of larvae / (number of larvae + number of eggs) X 100.

Larval development inhibition test

The larval development test was performed according to the method as described by Roberts and O'Sullivan (1950), adapted. For each treatment, a 1 mL aliquot (containing 250 1st

stage larvae) was used, which was then incubated for 6 days with 2 g feces from a gastrointestinal nematode-free animal, together with 1 mL *A. graveolens* essential oils at 9.4, 4.7, 2.35, 1.17, 0.58 and 0.29 mg/mL concentrations.

The negative control consisted of the culture treated with distilled water and with Tween 80 (1% of final solution), and the positive control by 0.02 mg/mL Levamisole, all with four replicates. Third stage larva was performed after culture larva collection, which was then added with Lugol and visualized under an inverted microscope. The inhibition percentage was given by the following formula: % larval development inhibition = (number of larvae in the control - number of larvae in treatment) / number of larvae in control x 100.

Larval migration inhibition test

To perform the technique, third stage larvae were placed in six-well polyethylene plates and allowed in a 25 µm mesh sieve to migrate for an hour so as viable larvae could be selected. After this initial selection, L3 larvae were added with a 0.6% sodium hypochlorite solution for approximately 20 min. so that the larvae exsheathment could occur. Following, three washes with distilled water, centrifugation at 203g for 2 min were performed and the final volume suitability of 150 larvae in 100 µL water was obtained (Demeler et al., 2010). These were incubated with 900 µL *A. graveolens* essential oil at 9.4, 4.7, 2.35, 1.17, 0.58 and 0.29 mg/mL and kept in an incubator at 28 °C for 24 hours in two replicates.

Distilled water and Tween 80 (1% of final solution) were used as negative control, whereas positive control was performed with 0.02 mg/mL Levamisole. After the incubation period, the contents of each well containing L3 were transferred to 25 µm mesh sieves and re-incubated at 28°C for 24 hours. The sieves were then removed and washed with distilled water to wash away retained contents, followed by counting larvae that migrated and those retained by the sieves under an inverted microscope. The larval migration inhibition means for each treatment were

calculated using the equation: % larval migration inhibition = Number of larvae that did not migrate / (Number of larvae that did not migrate + Number of larvae that migrated) X 100.

Statistical analysis

Analysis of Variance (ANOVA), followed by multiple comparison Tukey's test, was applied at a 5% probability level using the GraphPad Prism version 7.0 software. The 50% inhibitory concentration (IC50) capable of inhibiting 50% of egg hatch, larval development and larval migration was determined from the concentration-response curve, with a 95% confidence interval by means of the GraphPad Prism software version 5.0 for Windows.

Results:

A. graveolens essential oil yield, according to the methodology used in the extraction, was 1.3 mL/100g seed. Gas chromatography associated with mass spectrometry showed 5 major *A. graveolens* oil components which were present in 95.93% of the total oil: 39.1% Dihydrocarvone, 22.24% Carvone, 16.84% D -Limonene, 10.49% Apiol and 7.26% Trans-dihydrocarvone.

Table 1 shows the results of *A. graveolens* essential oil activity at different *H. contortus* development stages (eggs, first stage larvae - L1 and infective larvae - L3). In the egg hatch inhibition test, it could be observed that only the lowest concentration (0.29 mg/mL) was statistically different from the anthelmintic control. In the larval development inhibition test, only the two highest concentrations (9.4 and 4.7 mg/mL) showed no statistical differences from the control with anthelmintic, whereas in the larval migration inhibition test only the highest concentration (9.4 mg/mL) was statistically similar to anthelmintic control results.

In the evaluation of *A. graveolens* essential oil cytotoxicity in MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cells, cell viability (%) at the different concentrations tested was:

9.4 mg/mL (86%); 4.7 mg/mL (89%); 2.35 mg/mL (96%); 1.17 mg/mL (96%); 0.58 mg/mL (96%) and 0.29 mg/mL (99%).

The minimum *A. graveolens* essential oil concentration necessary to inhibit 50% egg hatchability (IC₅₀) was 0.006 mg/mL, while the IC₅₀ for larval development inhibition and larval migration were 2.536 mg/mL and 3.963 mg/mL, respectively.

Discussion:

The use of plants has proved to be a promising alternative in the control of small ruminant nematodes. In addition to showing anthelmintic activity, it is a sustainable practice, since it reduces the risk of chemical residues in animal products and in the environment (Chagas et al., 2008). In this study, the results of *A. graveolens* essential oil action against *H. contortus* eggs were promising, with 100% hatch inhibition (HI) at the highest concentration (9.4 mg/mL), not differing much ($p < 0.05$) from the 0.58 mg/mL concentration (98.57%). These results were similar to those found by an *Ocimum basilicum* essential oil study, which found a 100% *H. contortus* HI at a 0.5 mg/mL concentration (Castro et al., 2017), as well as for *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils, which inhibited 98% of *H. contortus* egg hatching at 1.25 mg/mL (Camurça-Vasconcelos et al., 2007), and 5.3 mg/mL *Eucalipypus citriodora*, which showed a 98.8% hatch inhibition (Macedo et al., 2009). Although studies with essential oils from different plants have shown their efficacy in *H. contortus* egg HI, this has only been reached at much higher concentrations than those obtained by the present study. Macedo et al. (2009), using *Eucalipypus globulus* essential oil, obtained 99.3% HI at the 21.75 mg/mL, and Pessoa et al. (2002), upon evaluating *Ocimum gratissimum*, found a 100% HI at 50 mg/mL concentration. Although some plants may present common components, these differ in concentration levels; also, the anthelmintic action can be potentiated by a synergistic effect between different components (Katiki et al., 2017; Ma et al., 2015).

Larval development inhibition (LDI) showed 98.58% efficacy at its highest concentration (9.4 mg/mL) - similar to that of anthelmintic treatment - inactivating the development of the infectious phase (L3). The results obtained in the present study were similar to those obtained by Macedo et al. (2009) with *Eucalyptus globulus* essential oil, with 98.7% LDI at a 21.75 mg/mL concentration, which was also observed by Camurça-Vasconcelos et al. (2007) with *Lippia sidoides* essential oil, who obtained 94.5% LDI at a 20 mg/mL concentration. These results, however, were obtained using concentrations much higher than those evaluated in this study, which may indicate a higher *A. graveolens* essential oil anthelmintic potential.

In the larval migration inhibition test (LMI), the 9.4 mg/mL concentration obtained 63.7% efficacy; a similar study carried out by Yoshihara et al. (2014), who tested condensed tannins extracted from *Acacia mearnsii*, found that the 12.5 mg/mL concentration showed 56.3% inhibition, and only reaching 97.1% at the highest concentration used - 100 mg/mL, thus demonstrating that better results can be obtained with a concentration increase. When analyzing the results of *A. graveolens* essential oil action in the different *H. contortus* development phases, L3 was found to be the most resistant, which can be attributed to the presence of the double cuticle at this larval stage as well as to the lower metabolic activity that occurs at this stage, a fact which was also mentioned by Amarante et al. (2014).

Essential oils comprise a complex combination of volatile substances extracted from plants containing several tens or even hundreds of substances with diverse chemical composition. However, most often one or more substances prevail, determining the major components that characterize the plant species under analysis and its properties (Bakkali et al., 2008). The major components identified in *A. graveolens* oil in this study were also present in other investigations (Singh et al., 2005; Orhan et al., 2013; Sintim et al., 2015), though their compound concentration differs, showing that these are dependent on several factors such as the area where

the plant was raised, type of crop, and the extraction technique it was submitted (Chahal et al., 2017).

Another important factor that has been detected is the synergistic action of *A. graveolens* essential oil components, as observed by Ma et al. (2015) who, upon evaluating the activity of this oil against the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, found that two of its main components, carvone and limonene, synergistically inhibited the growth of this fungus. Limonene is found in oils from different plants with anthelmintic activity, such as *Lippia sidoides*, *Cymbopogon martinii*, *Mentha piperita* and *Eucalyptus staigeriana* (Katiki et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Ribeiro et al., 2013). In agreement with this finding, it has been found that limonene accounts for 96% of *Citrus sinensis* essential oil composition, causing 100% *in vitro* inhibition of *H. contortus* eggs and larvae in most concentrations tested (Gaínza et al., 2015). It is possible that these two compounds present in *A. graveolens* essential oil may also be the major components of the anthelmintic action on *H. contortus* observed in the present study.

For a product to be considered a good infection control agent, causing no harm to the host is as important as the deleterious effect of phytotherapeutic on the parasite. Although the toxic effect of some plants that have already been described, other studies have already shown an opposite effect, a protection against the toxicity of other chemicals (Boriollo et al., 2018). In a study with *A. graveolens* leaf extract containing silver nanoparticles, Kalangi et al. (2016) performed the same cell viability assay and observed at the highest concentration of 100 mg a viability of 82%. Even using concentrations much lower than these, the present study obtained a similar, satisfactory cell viability (86%) at the highest concentration.

As to *A. graveolens* essential oil IC₅₀ evaluation, this was higher for larval migration (3.963 mg/mL); this result was inferior to the parameters established by Adamu et al. (2013), in which a plant extract showing an EC₅₀ below 6 mg/mL presented a great anthelmintic potential, corroborating the present finding.

Conclusion:

The study of plants through their essential oils with action on gastrointestinal nematodes has the potential to obtain molecules with anthelmintic activity and, in this context, and even aware of the importance of in vivo testing, the results presented here show that the *A. graveolens* essential oil is a promising source of biomolecules with proven anthelmintic activity from the techniques employed.

TABLE 1: PERCENTAGE OF ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *ANETHUM GRAVEOLENS* IN THE DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT OF *HAEMONCHUS CONTORTUS*.

Treatment	Egg hatch inhibition (%)	Larval development inhibition (%)	Larval migration inhibition (%)
Control	3.4 ^d	0 ^c	6.3 ^e
Tween 80	7.05 ^c	2.12 ^c	10.8 ^e
AH	100 ^a	99.50 ^a	82.05 ^a
9.4 mg/mL	100 ^{ab}	98.58 ^a	63.7 ^{ab}
4.7 mg/mL	99.30 ^{ab}	83.16 ^{ab}	46.75 ^{bc}
2.35 mg/mL	99.35 ^{ab}	30.88 ^{bc}	47.05 ^{bc}
1.17 mg/mL	98.90 ^{ab}	25.40 ^c	37.1 ^{cd}
0.58 mg/mL	98.57 ^{ab}	19.11 ^c	18.75 ^{de}
0.29 mg/mL	96.40 ^b	0.49 ^c	13.00 ^{de}

Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

AH: anthelmintic.

References:

ACHARYA, J., HILDRETH, M.B., REESE, R.N., 2014. In vitro screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, vol. 201, n.1-2, p. 75-81. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.01.008.

ADAMU, M., NAIDO, O.V., ELOFF, J.N., 2013. Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethno veterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *BMC veterinary research*, vol. 9, n.1, p. 38. doi: 10.1186/1746-6148-9-38.

AMARANTE, A.F.T.D., RAGOZO, A., SILVA, B.F.D., 2014 *Os parasitas de ovinos*. São Paulo; Editora Unesp Digital.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, vol. 46, n.2, p. 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.

BORIOLLO, M. F. G., SILVA, T. A., RODRIGUES-NETTO, M. F., SILVA, J. J., MARQUES, M. B., DIAS, C. T. S., OLIVEIRA, N. M. S., 2018. Reduction of doxorubicin-induced genotoxicity by *Handroanthus impetiginosus* in mouse bone marrow revealed by micronucleus assay. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 78, n 1, p. 1-12. doi: 10.1590/1519-6984.18515

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., BEVILAQUA, C.M.L., MORAIS, S.M., MACIEL, M.V., COSTA, C.T., MACEDO, I.T., OLIVEIRA, L.M., BRAGA, R.R., SILVA, R.A., VIEIRA, L.S., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, vol.148, n.3-4, p. 288-294. doi:10.1016/j.vetpar.2007.06.012.

CARVALHO, C.O., CHAGAS, A.C.S., COTINGUIBA, F., FURLAN, M., BRITO, L.G., CHAVES, F.C., AMARANTE, A.F., 2012. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary parasitology*, vol. 183, n.3-4, p. 260-268. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.051.

CASTRO, L.M, PINTO, N.B, MOTA, T.O., MOURA, M.Q., DIAS DE CASTRO, L.L., MADRID, I.M; FREITAG, R.A., BERNE, M.E.A., 2017. Atividade ovicida do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de *Ocimum basilicum* sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. *Science And Animal Health*, vol. 5, n. 2, p. 138-150. doi: <http://dx.doi.org/10.15210/sah.v5i2.10726>

CEZAR, A.S., TOSCAN, G., CAMILLO, G., SANGIONI, L.A., RIBAS, H.O., VOGEL, F.S.F., 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary parasitology*, vol. 173, n.1-2, p. 157-160. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.013.

CHAGAS, A.C.S., VIEIRA, L.S., FREITAS, A.R., ARAÚJO, M.R.A., ARAÚJO-FILHO, J.A., ARAGUAO, W.R., & NAVARRO, A.M.C., 2008. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes® in Morada Nova sheep. *Veterinary Parasitology*, vol. 151, n. 1, p. 68-73. doi:10.1016/j.vetpar.2007.10.003

CHAHAL K.K., MONIKA, KUMAR A., BHARDWAJ U., KAUR R., 2017. Chemistry and biological activities of *Anethum graveolens* L. (dill) essential oil: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 6, n. 2, p. 295-306. E-ISSN: 2278-4136 P-ISSN: 2349-8234.

COÊLHO, M.D.G., XAVIER, T.B., COSTA, J.F.D., MACIEL, L.T.R., BOZO, L.S.O., COÊLHO, F.A.D.S., AKISUE, G., 2017. Evaluation of plant extracts to control haemonchosis in naturally infected sheep. *Revista Ambiente & Água*, vol. 12, n. 2, p. 331-339. doi:10.4136/ambi-agua.2020.

COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H.M., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M.A., WALLER, P.J., 1992. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, vol. 44, p. 35-44. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U).

D'ÁVILA, V.A., AGUIAR-MENEZES, E.L., GONÇALVES-ESTEVEZ, V., MENDONÇA, C.B., PEREIRA, R.N., SANTOS, T.M., 2016. Morphological characterization of pollens from three Apiaceae species and their ingestion by twelve-spotted lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Brazilian Journal of Biology*, vol. 76, n. 3, p. 796-803. doi: 10.1590/1519-6984.07615. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.07615>.

DEMELER J, KÜTTLER U, EL-ABDELLATI A, STAFFORD K, RYDZIK A, VARADY M, et al. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to

ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. *Vet Parasitol* 2010; 174(1-2): 58-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.020>. PMID:20850930.

GAÍNZA, Y.A., DOMINGUES, L.F., PEREZ, O.P., RABELO, M.D., LÓPEZ, E.R., DE SOUZA CHAGAS, A.C., 2015. Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Industrial Crops and Products*, vol. 76, p. 647-652. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.056>.

GORDON, H.M., WHITLOCK, H.V.A., 1939. New technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, vol.12, p.50-52.

HOSSEINZADEH, H., KARIMI, G., AMERI, M., 2002. Effects of *Anethum graveolens* L. seed extracts on experimental gastric irritation models in mice. *BMC pharmacology*, vol. 2, n.1, p. 21. doi: 10.1186/1471-2210-2-21.

HUBERT, J., KERBOEUF, D.A., 1992. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Research*, v. 130, n. 20, p. 442-446. doi :10.1136/vr.130.20.442.

KALANGI, S. K., DAYAKAR, A., GANGAPPA, D., SATHYAVATHI, R., MAURYA, R. S., RAO, D. N., 2016. Biocompatible silver nanoparticles reduced from *Anethum graveolens* leaf extract augments the antileishmanial efficacy of miltefosine. *Experimental parasitology*, v. 170, p. 184-192. doi: 10.1016/j.exppara.2016.09.002.

KATI KI, L.M., BARBIERI, A.M.E., ARAUJO, R.C., VERÍSSIMO, C.J., LOUVANDINI, H., FERREIRA, J.F.S., 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*. Vol. 243, p. 47-51. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.06.008.

KATI KI, L.M., CHAGAS, A.C.S., BIZZO, H.R., FERREIRA, J.F.S., AMARANTE, A. F.T.D., 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. *Veterinary Parasitology*, vol. 183, n. 1-2, p. 103-108. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.001.

KAUR, G.J., ARORA, D.S., 2009. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 9, n. 1, p. 30. doi: 10.1186/1472-6882-9-30.

KHANI, A., BASAVAND, F., 2013. Chemical composition and insecticide activity of essential oil from dill seeds. *International Journal of Agriculture*, vol. 3, n. 3, p. 489. ISSN: 2228-7973.

KUMARASINGHA, R., PRESTON, S., YEO, T.C., LIM, D.S.L., TU, C.L., PALOMBO, E.A., SHAW, J.M., GASSER, R.B., BOAG, P.R., 2016. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, vol. 9, p. 187-193. doi:10.1186/s13071-016-1458-9.

MA, B., BAN, X., HUANG, B., HE, J., TIAN, J., ZENG, H., WANG, Y., 2015. Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing Sclerotinia rot of rapeseed. *PloS one*, vol. 10, n. 7, e0131733. doi: 10.1371/journal.pone.0131733.

MACEDO, I.T.F., BEVILAQUA, C.M.L., OLIVEIRA, L.M.B., CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., VIEIRA, L.S., OLIVEIRA, F.R., QUEIROZ-JUNIOR, E.M., PORTELA, B.G., BARROS, R.S., CHAGAS, A.C.S., 2009. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 18, p. 62–66. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01803011>.

MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, p. 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

ORHAN, I.E., SENOL, F.S., OZTURK, N., CELIK, S.A., PULUR, A., KAN, Y., 2013. Phytochemical contents and enzyme inhibitory and antioxidant properties of *i graveolens* L.(dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions. *Food and chemical toxicology*, vol. 59, p. 96-103. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.053.

PESSOA, L.M., MORAIS, S.M., BEVILAQUA, C.M.L., LUCIANO, J.H.S., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, vol. 1-2, p. 59-63. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00253-4.

PINTO, N.B., DE CASTRO, L.M., DE ALMEIDA CAPELLA, G., MOTTA, T.O., DE MOURA, M.Q., BERNE, M.E.A., LEITE, F.P.L., 2017. Controlling gastrointestinal nematodes in cattle by *Bacillus* species. *Veterinary parasitology*, vol. 245, p. 1-4. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.08.004.

RIBEIRO, W.L.C., MACEDO, I.T.F., DOS SANTOS, J.M.L., DE OLIVEIRA, E.F., CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., DE PAULA, H.C.B., BEVILAQUA, C.M.L., 2013. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Experimental parasitology*, vol. 135, n. 1, p. 24-29. doi: 10.1016/j.exppara.2013.05.014.

ROBERTS, F.H.S., O'SULLIVAN, S.P., 1950. Methods for egg counts and larvae cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, vol. 1, p. 99-102. <https://doi.org/10.1071/AR9500099>.

SAHIB, A.S., MOHAMMED, I.H., SLOO, S.A., 2014. Antigiardial effect of *Anethum graveolens* aqueous extract in children. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, vol. 3, n. 3, p. 109. doi: 10.5455/jice.20140523104104.

SINGH, G., MAURYA, S., DE LAMPASONA, M.P., CATALAN, C., 2005. Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: Part 52. *Journal of food science*, vol. 70, n. 4, p. M208-M215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07190.x>

SINTIM, H.Y., BURKHARDT, A., GAWDE, A., CANTRELL, C.L., ASTATKIE, T., OBOUR, A.E., ZHELJAZKOV, V.D., SCHLEGEL, V., 2015. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. *Industrial Crops and Products*, vol. 63, n. 9, p. 190-196. doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.058.

SŁUPSKI, J., LISIEWSKA, Z., KMIĘCIK, W., 2005. Contents of macro and microelements in fresh and frozen dill (*Anethum graveolens* L.). *Food Chemistry*, vol. 91, n. 4, p. 737-743. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.046.

VIEIRA, J.N., GONÇALVES, C.L., VILLARREAL, J.P.V., GONÇALVES, V.M., LUND, R.G., FREITAG, R.A., SILVA, A.F., NASCENTE, P.S., 2019. Chemical composition of essential oils from the apiaceae family, cytotoxicity, and their antifungal activity in vitro against *Candida* species from oral cavity. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 79, n. 3, p. 432-437. doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.182206>.

YOSHIHARA, E., MINHO, A.P., CARDIM, S.T., TABACOW, V.B.D., YAMAMURA, M.H., 2014. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of condensed tannins on gastrointestinal nematode infestations in sheep (*Ovis aries*). *Semina Cienc Agrar*, vol. 35, n. 6, p. 3173-3180. doi:10.5433/1679-0359.2014v35n6p3173.

3.2 Artigo 2

Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Cuminum cyminum* contra *Haemonchus contortus*

Leonardo Mortagua de Castro; Natália Berne Pinto; Micaele Quintana de Moura; Rogério Antonio Freitag; Gabriela de Almeida Capella; Tairan Ourique Motta; Maria Elisabeth Aires Berne

Submetido à revista Science and Animal Health

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cuminum cyminum* CONTRA
Haemonchus contortus DE OVINOS**

CASTRO, Leonardo Mortagua de^{1*};

PINTO, Natália Berne²;

MOTTA, Tairan Ourique³;

MOURA, Micaele Quintana de²;

CAPELLA, Gabriela de Almeida²;

TERTO, Wesley Douglas da Silva²;

FREITAG, Rogério Antonio⁴;

BERNE, Maria Elizabeth Aires⁵

¹*Doutorando do Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, UFPel;*

²*Doutoranda do Programa de pós-graduação em Parasitologia, UFPel;*

³*Acadêmico da faculdade de Veterinária, UFPel;*

⁴*Professor, Instituto de Química e Geociências, UFPel;*

⁵*Professora, Instituto de Biologia, UFPel.*

*Autor correspondente: Leonardo Mortagua de Castro
Universidade Federal de Pelotas, UFPel
Campus Capão do Leão S/N
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
leonardomortagua@gmail.com*

Resumo

O *Haemonchus contortus* é o principal causador de perdas econômicas na produção de ovinos, devido sua ação hematófoga causa altas taxas de morbidade e mortalidade. A utilização intensa de anti-helmínticos no controle destes parasitos induziu a instalação de resistência a praticamente todos os princípios ativos disponíveis. Esse estudo teve como objetivos avaliar o óleo essencial de *Cuminum cyminum*, *in vitro*, contra ovos e larvas *H. contortus*, identificar os principais constituintes e determinar a concentração mínima para mortalidade de 50% da população (CI 50). O óleo foi extraído de sementes através do aparelho de cleveger e para determinar os principais constituintes foi realizada a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os ovos foram obtidos através da coleta de fezes de ovinos infectados e as larvas recuperadas através de cultura de fezes. As avaliações foram realizadas através dos testes de inibição da eclosão de ovos (IEO), inibição da migração larval (IML) e inibição do desenvolvimento larval (IDL). As concentrações utilizadas do óleo foram: 9.4; 4.7; 2.35; 1.17; 0.58 mg/mL, todos os testes acompanhados de controles com anti-helmíntico comercial, água destilada e Tween. Os resultados obtidos na maior concentração (9.4mg/mL) foram de 98.62% para IEO, 69.12% para IDL e 23.45% para IML. O constituinte encontrado em maior concentração foi o Cumaldehyde representando 27.39% da totalidade do óleo, a CI 50 foi 0.0012 mg/mL sobre a IML, 3.70 mg/mL para IDL e 104.34 mg/mL para IML. Assim, é possível concluir que o óleo essencial apresentou resultados promissores, que podem acrescentar futuramente no controle destes parasitos.

Palavras-chave: parasitose; cominho; anti-helmíntico; plantas, bioprospecção.

INTRODUÇÃO

Os nematódeos gastrintestinais são conhecidos mundialmente como os maiores determinantes de prejuízo econômico na produção de pequenos ruminantes (CALVETE et al., 2014; COOP; KYRIAZAKIS 2001), sendo o nematódeo *Haemonchus contortus*, parasito hematófago, a principal espécie que acomete ovinos. (AMARANTE et al., 1992; KUMARASINGHA et al., 2016),

O controle destes parasitos se fundamenta na utilização de anti-helmínticos comerciais, aos quais, devido ao uso intenso já não possuem a ação esperada, com uma ampla presença de resistência a estes fármacos em rebanhos ovinos (RAMOS et al., 2002). Isto aliado a exigência cada vez maior de produzir produtos sem resíduos químicos, mostra a necessidade de novas alternativas a serem incorporadas contra estes parasitos.

São diversas as linhas de pesquisa buscando novas opções para o controle destes parasitos, dentre essas destacam-se os estudos com fitoterápicos. Os óleos essenciais (O.E.) que fazem parte desta categoria, são misturas complexas produtos do metabolismo secundário de plantas. Estes contêm derivados terpenóides, sendo os monoterpenos, os sesquiterpenos, principais responsáveis pelas atividades biológicas destes óleos (SANTOS et al., 2010; MARTINEZ - VELASQUEZ et al., 2011).

Estudos com óleos essenciais de diferentes plantas têm indicado atividades anti-helmínticas sobre distintas fases de desenvolvimento de *H. contortus*, como frente a *Opuntia ficus-indica* (FÉBOLI et al., 2016); *Eucalyptus globulus* (MACEDO et al., 2009); *Ocimum basilicum* (CASTRO et al., 2017) e *Melaleuca alternifolia* (GRANDO et al., 2016).

A planta *Cuminum cyminum* pertence à família Apiaceae (Umbelíferas) de caule e ramos estriados, que apresentam folhas alternas, verde-escuras e flores alvas em umbrelas terminais. Os seus frutos também são denominados de sementes (frutos secos contendo a semente), com aproximadamente meio centímetro de comprimento de coloração cinza-amarelados e cobertos por uma fina penugem de onde é extraído o óleo essencial (VIEIRA, 1992). O óleo essencial de *C. cyminum* possui atividade biológica com ação sobre bactérias (LACOBELLIS et al., 2005), fungos (MOHAMMADPOUR et al. 2012), insetos (YEOM et al., 2012) e ácaros (VILLARREAL et al., 2017).

Estes resultados motivaram o desenvolvimento deste estudo, que teve como objetivo avaliar a ação *in vitro* do óleo essencial de *C. cyminum* sobre ovos e larvas de *H. contortus*, bem como

determinar seus principais constituintes e obter a concentração inibitória de 50% de sua população (CI50).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e análise química do óleo essencial

Foram utilizadas no experimento, sementes de *Cuminum cyminum* (cominho), adquirida de distribuidor comercial (Luar Sul®) com certificação de qualidade e origem. As sementes foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger, durante 4h. Após, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro P.A., armazenado em frasco âmbar e mantido a 18°C até a utilização. Foi realizada a análise química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Obtenção dos ovos de nematódeos gastrintestinais

Ovinos naturalmente infectados, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, foram utilizados para coleta de fezes diretamente da ampola retal destes animais. Foi quantificada a infecção parasitária com a utilização da técnica de Gordon & Whitlock (1939). Amostras de fezes acima de 2000 ovos por grama de fezes foram processadas para separação dos ovos das sujidades do material fecal através da técnica de Hubert e Kerboeuf (1992), com modificações.

Obtenção de larvas de nematódeos gastrintestinais

Para a realização do teste de desenvolvimento larval foram utilizadas larvas de primeiro estágio (L1), as quais foram recuperadas a partir da incubação por 24h em estufa B.O.D com temperatura de 28°C e umidade relativa de 80%, dos ovos obtidos nas amostras positivas. Já no teste de inibição da migração larval foram utilizadas L3, obtidas através da técnica de Roberts e O'Sullivan (1950).

Teste de Inibição da eclodibilidade

Foi realizado através da metodologia descrita por Coles et al. (1992), utilizando placas de microcultivo de 24 poços. Aproximadamente 150 de ovos foram adicionados em cada poço, juntamente com o O.E. de *C. cyminum*, nas concentrações (9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58 mg/mL), controle negativo foi água destilada, controle positivo Tiabendazol 0,025 mg/mL e o controle com Tween 80 (1% da solução final), para emulsificação do óleo nas diferentes diluições. Após 48 horas foi realizada a contagem de ovos e larvas. Todos os tratamentos foram realizados em 4 repetições. As médias da inibição da eclodibilidade foram determinadas conforme a equação descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007): % de Inibição da Eclodibilidade = número de larvas / número de larvas mais número de ovos X 100.

Teste de inibição do desenvolvimento larval

Realizado conforme descrito por Roberts e O'Sullivan (1950) com modificações. Uma alíquota, contendo aproximadamente 250 L1, foi incubada durante seis dias com 2 g de fezes provenientes de um animal livre de nematoides gastrintestinais, juntamente com do O.E. de *C. cyminum* nas concentrações de 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58 mg/mL. O controle negativo foi constituído pela cultura tratada com água destilada, controle com Tween 80 (1% da solução final) e o controle positivo por 0,02 mg/mL de Levamisol, todos em quatro repetições. A contagem das larvas de 3º estágio foi realizada após coleta das larvas da cultura, acrescido de Lugol, seguindo-se a visualização ao microscópio invertido. O percentual de inibição foi dado através da seguinte fórmula: % de inibição do desenvolvimento larval = (número de larvas no controle – número de larvas no tratamento) / (número de larvas no controle) x 100.

Teste de Inibição da migração larval

Primeiramente, larvas de 3º estágio de *H. contortus* viáveis foram colocadas em contato com solução de hipoclorito de sódio 0,6%, por aproximadamente 20min, para que houvesse o desembainhamento das larvas. Seguindo-se três lavagens através de centrifugação, a 3000rpm por 2min com água destilada e a adequação final para concentração de 150 larvas em 100µL. Após, foram adicionadas, em placas de cultura de polietileno de 24 orifícios, 900µL

do óleo essencial nas concentrações de 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58 mg/mL, e mantidas por 24 horas em estufa a 28 °C. Foram utilizados controle negativo com água destilada, controle com Tween 80 (1% da solução final) e como positivo por 0,02 mg/mL de Levamisol. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço contendo L3 foi transferido para tamises com malha de abertura de 25µm e acondicionadas novamente em estufa a 28 °C por 24 horas. Após este período os tamises foram removidos e lavados com água destilada para retirar o conteúdo retido, seguindo-se a contagem em microscópio invertido das larvas que migraram e das larvas que ficaram retidas nos tamises. As médias de inibição da migração larval para cada tratamento foram calculadas através da equação: % inibição da migração larval = Número de larvas que não migraram / (Número de larvas que não migraram + Número de larvas que migraram) X 100.

Análise estatística

Para a realização da análise estatística foi utilizado o software Statistix 9.0, ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Na determinação da concentração inibitória 50 (CI50), concentração capaz de inibir 50% da eclosão, migração e desenvolvimento larval, foi determinada a partir da curva dose-resposta, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa GraphPadPrism para Windows, versão 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter inúmeros compostos em diferentes concentrações, geralmente os componentes majoritários determinam a ação biológica do óleo (SINTIM et al., 2015). A atividade anti-helmíntica de diferentes extratos de plantas em nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes tem sido amplamente estudada (GITHIORI et al., 2006; MACIEL et al., 2006; EGUALE & GIDAY, 2009 MORENO-GONZALO et al., 2013; ENGSTRÖM et al., 2016). Contudo, esta ação depende dos constituintes, os quais diferem conforme a família botânica da planta, a sua proveniência, porção utilizada, fase de crescimento e até mesmo a época do ano. A análise da composição química do O.E. *Cuminum cyminum* mostrou como principal constituinte o Cumaldehyde,

representando 27,39% (Tabela 1). Resultado esse também relatado por Hajlaoui et al. (2010), Wanner et al., (2010), Chaudhry et al, (2012) e Rihawy et al. (2014).

Tabela1: Constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *Cuminum cyminum* obtidos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Compostos	%
Beta pinene	10.75
Cymene	5.56
Gamma-terpinem	15.24
Cumaldehyde	27.39
2-Caren-10-al	3.76
1-Phenyl-1-butanol	19.47

No presente estudo, o óleo essencial dos frutos de *C. cyminum* mostrou rendimento de 2.5%, semelhante ao verificado por Chaudhry et al. (2012) e Rana (2014), que obtiveram rendimento de 3%.

A eficácia do óleo essencial de *C. cyminum* nas diferentes metodologias utilizadas está apresentada na Tabela 2. O teste de inibição da eclosão foi o que apresentou melhores resultados, sendo que na concentração de 9.4 mg/mL a eficácia foi de 98.62%, não diferindo estatisticamente do controle com anti-helmíntico.

Tabela 2: Porcentagem de eficácia do óleo essencial de *Cuminum cyminum* sobre ovos e larvas (L1 e L3) de *Haemonchus contortus*.

Tratamento	Inibição da eclosão (%)	Inibição do desenvolvimento (%)	Inibição da migração (%)
Controle	3.4 ^c	0 ^a	6.3 ^{bc}
Tween 80	7.05 ^c	2.12 ^a	10.8 ^{bc}
AH	100 ^a	99.50 ^d	82.05 ^a
9,4 mg/mL	98.62 ^a	69.12 ^{bc}	23.45 ^b
4,7 mg/mL	94.27 ^b	54.57 ^{ab}	17.25 ^{bc}
2,35 mg/mL	97.22 ^{ab}	49.50 ^{bc}	15.55 ^{bc}
1,17 mg/mL	94.67 ^b	21.56 ^{ab}	11.1 ^{bc}
0,58 mg/mL	93.95 ^b	4.90 ^a	10.8 ^{bc}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (P < 0.05).

AH: anti-helmíntico.

Já na análise em larvas de primeiro (L1) e de terceiro estágio (L3) a eficácia foi de 69,12% e de 23,45%, respectivamente.

Do mesmo modo, Castro et al. (2017) encontraram resultados semelhantes ao deste estudo na inibição da eclosão dos ovos, quando utilizaram o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, que mostrou ação sobre os ovos em todas as concentrações avaliadas (0.25 mg/mL a 32 mg/mL). Também, Grando et al. (2016), ao testarem o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* obtiveram 100% no teste da inibição da eclosão, já na avaliação sobre a inibição da migração de larvas, observaram 88% de atividade somente na concentração de 56 mg/mL.

Abbas et al. (2009) utilizaram extrato aquoso de *C. cyminum* no combate a larvas de nematódeos parasitos de plantas e observaram, assim como no presente estudo, que os ovos foram mais sensíveis quando comparados com as larvas. Na avaliação da viabilidade das larvas, na maior concentração, foi verificado 30% de mortalidade, enquanto a mesma concentração em contato com os ovos obteve 100% de inibição da eclodibilidade, resultado muito semelhante do observado no presente estudo, porém em menores concentrações. Também foi avaliado o efeito dose resposta, que foi comprovado, visto que nas análises utilizando a concentração de 50% foi atingido a inibição de 83% dos ovos e ao dobrar a concentração observou-se 100% de inibição da eclodibilidade.

Os estudos da avaliação do O.E. de *C. cyminum* também mostraram resultados promissores sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com 100% de mortalidade de larvas em concentrações semelhantes a utilizadas no presente estudo, 20%, 10%, 5%, 2.5% e 1.25% (MARTINEZ VELAZQUEZ et al., 2011). Entretanto, este mesmo óleo quando avaliado em fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, somente obteve 100% de mortalidade na concentração de 200mg/mL (VILLARREAL et al., 2017). É provável que as fases mais desenvolvidas do parasito tenham maior capacidade de resistir as adversidades, o que leva a necessitarem de maiores concentrações do óleo para serem mortas. Nossos resultados, aqui apresentados também mostraram a maior eficácia do óleo sobre ovos, seguido de L1 e menor eficácia, frente às larvas infectantes de *H. contortus*. Esta maior atividade sobre os ovos, foi mencionada por Perry, (2002), quando observou a ação de polifenóis em ligarem-se a lipoproteínas presentes na casca do ovo, as quais poderiam alterar a permeabilidade e inibir a liberação de enzimas de eclosão e conseqüentemente inviabilizando a eclosão destes parasitos.

A maior resistência das L3 provavelmente seja devido a presença de dupla cutícula (MOLAN et al., 2002) dificultando a penetração dos compostos ativos do O.E. de *C. cyminum*. Já as L1 por não apresentarem essa dupla cutícula seriam mais suscetíveis a ação do óleo. Este então,

poderia agir sobre a faringe e/ou sobre a camada muscular do parasito, levando a paralisia (MOLAN et al., 2002).

A redução de eclosão e do desenvolvimento dos estágios de vida livre de nematódeos gastrintestinais poderá ter uma importância epidemiológica, visto a diminuição da contaminação das pastagens utilizadas por ruminantes (MAX, 2010). A determinação da concentração inibitória 50% (CI 50%), que indica a dose do óleo essencial de *C. cyminum* capaz de inibir 50% da população de parasitos submetida ao tratamento, mostrou que são necessários 0,0012 mg/mL para a inibição de 50% da eclodibilidade, 3.70 mg/mL para inibição do desenvolvimento e 104.34 mg/mL para inibição da migração larval. Já Castro et al. (2017), que avaliaram ação do O.E. de *O. basilicum* também sobre *H. contortus*, a CI50 para inibição da eclodibilidade foi de 2123 mg/mL, dose esta 176 vezes maior do que a apresentada neste estudo, demonstrando o potencial anti-helmíntico do óleo essencial de *C. cyminum*.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, mostram que o óleo essencial de *C. cyminum* apresenta ação anti-helmíntica, sobretudo na inibição da eclosão dos ovos de *H. contortus*, estes dados são importantes, mostrando seu potencial para dar continuidade ao estudo através de testes *in vivo*, para controle dos nematódeos gastrintestinais de ovinos.

IN VITRO ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Cuminum cyminum* AGAINST *Haemonchus contortus*

ABSTRACT

Haemonchus contortus is the main cause of economic losses in sheep production due to its haematopoietic action causing high rates of morbidity and mortality. The intense use of anthelmintics in the control of these parasites induced the installation of resistance to practically all active principles available. The objective of this study was to evaluate the essential oil of *Cuminum cyminum* *in vitro* against *H. contortus* eggs and larvae, to identify the main constituents and to determine the minimum concentration for mortality of 50% of the population (CI 50). The oil was extracted from seeds through the cleverger apparatus and to determine the main constituents was performed the gas chromatography coupled to mass spectrometry. The eggs were obtained by collecting feces from infected sheep and the recovered larvae through feces culture. Evaluations were performed through egg hatch inhibition (IEO) tests, inhibition of larval migration (IML) and inhibition of larval development (IDL). The used concentrations of the oil were: 9.4; 4.7; 2.35; 1.17; 0.58 mg / mL, all tests accompanied by controls with commercial anthelmintic, distilled water and Tween. The results obtained in the highest concentration (9.4 mg / mL) were 98.62% for IEO, 69.12% for IDL and 23.45% for IML. The most important constituent was Cumaldehyde representing 27.39% of the total oil, CI 50 was 0.0012 mg / mL for IML, 3.70 mg / mL for IDL, and 104.34 mg /mL for IML. Thus, it is possible to conclude that the essential oil presented promising results, which may add to the control of these parasites in the future.

Keywords: Cumin. Anthelmintic. Plants. Bioprospecting.

ACTIVIDAD IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cuminum cyminum* CONTRA *Haemonchus contortus*

RESUMEN

Haemonchus contortus es la principal causa de pérdidas económicas en la producción ovina debido a su acción hematopoyética que causa altos índices de morbilidad y mortalidad. El uso intenso de los antihelmínticos en el control de estos parásitos indujo la instalación de resistencia a prácticamente todos los principios activos disponibles. El objetivo de este estudio fue evaluar el aceite esencial de *Cuminum cyminum* *in vitro* contra los huevos y larvas de *H. contortus*, identificar los constituyentes principales y determinar la concentración mínima de mortalidad del 50% de la población (IC 50). El aceite se extrajo de las semillas a través del aparato experto y para determinar los constituyentes principales se realizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los huevos se obtuvieron recolectando heces de ovejas infectadas y las larvas recuperadas a través del cultivo de heces. Las evaluaciones se realizaron mediante pruebas de inhibición de la eclosión de los huevos (IEO), inhibición de la migración de las larvas (IML) e inhibición del desarrollo de las larvas (IDL). Las concentraciones de aceite utilizadas fueron: 9.4; 4.7; 2,35; 1,17; 0,58 mg / ml, todas las pruebas acompañadas de controles con antihelmínticos comerciales, agua destilada y Tween. Los resultados obtenidos en la concentración más alta (9,4 mg / ml) fueron 98,62% para IEO, 69,12% para IDL y 23,45% para IML. El constituyente más importante fue el cumaldehído que representa el 27.39% del aceite total, el CI 50 fue de 0.0012 mg / mL para IML, 3.70 mg / mL para IDL y 104.34 mg / mL para IML. Por lo tanto, es posible concluir que el aceite esencial presentó resultados prometedores, que pueden contribuir al control de estos parásitos en el futuro.

Palabras clave: Comino. Anti-helmíntico. Plantas. Bioprospección.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S.; DAWAR, S. H.; TARIQ, M. A.; ZAKI, M. J. Nematicidal activity of spices against *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 2625-2632, 2009.
- AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G.; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, p. 31-38, 1992.
- CALVETE, C.; FERRER, L. M.; LACASTA, D.; CALAVIA, R.; RAMOS, J. J.; RUIZ-DE-ARCAUTE, M.; URIARTE, J. Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 16, p. 102-113, 2014.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T.; MACEDO, I. T.; OLIVEIRA, L. M.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippiasidooides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288-294, 2007.
- CASTRO, L. M.; PINTO, N. B.; MOTA, T. O.; MOURA, M. Q.; DIAS DE CASTRO, L. L.; MADRID, I. M.; FREITAG, R. A.; BERNE, M. E. A. ATIVIDADE OVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Ocimum basilicum* SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS. **Science and Animal Health**, v. 5, n. 2, p. 138-150, 2017.
- CHAUDHRY, A. H.; TANVEER, A.; SHAR, A.; AKHTAR, M. S.; SHAHID, M. K.; ASHFAQ, K. M.; MALIK, T. A.; SIDDIQUI, R. H. Physicochemical investigation and antimicrobial activity of essential oil of *Cuminum cyminum*. **World Applied Sciences Journal**, v. 19, p. 330-333, 2012.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.
- COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 325-330, 2001.
- EGUALE, T.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 3, p. 29- 34. 2009.
- ENGSTRÖM, M.T.; KARONEN, M.; AHERN, J. R.; BAERT, N.; PAYRÉ, B.; HOSTE, H.; SALMINEN, J. P. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching motility of *Haemonchus contortus* Nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 840-851, 2016.
- FÉBOLI, A.; LAURENTIZ, A. C.; SOARES, S. C.; AUGUSTO, J. G.; ANJOS, L. A.; MAGALHÃES, L. G.; FILARDI, R. S.; LAURENTIZ, R. S. Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica*

against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 65-68. 2016.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSDORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 308-320, 2006.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.

GRANDO, T. H.; SÁ, M. F.; BALDISSERA, M. D.; OLIVEIRA, C. B.; SOUZA, M. E.; RAFFI, R. P.; SANTOS, R. C. V.; DOMINGUES, R.; MINHO, A. P.; LEAL, M. L. R.; MONTEIRO, S. G. 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, p. 377-382, 2016.

HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; TRABELSI, N.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: a high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2186-2192, 2010.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Research**, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

KUMARASINGHA, R.; PRESTON, S.; YEO, T. C.; LIM, D. S. L.; TU, C. L.; 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, p. 187-193, 2016.

LACOBELLIS, N. S.; CANTORE, P. L.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 57-61, 2005.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Atividade ovicida e larvicida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 62-66. 2009.

MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; COSTA, C. T. C.; CASTRO, C. M. S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 98-104. 2006.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; CASTILLO-HERRERA, G. A.; ROSARIO-CRUZ, R.; FLORES-FERNANDEZ, J. M.; LOPEZ-RAMIREZ, J.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; LUGO-CERVANTES, E. C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum*

cuminum, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 108, p. 481-487, 2011.

MAX, R. A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 138-143, 2010.

MOHAMMADPOUR, H.; MOGHIMIPOUR, E.; RASOOLI, I.; FAKOOR, H. M.; ASTANEH, S. A.; MOOSAIE, S. S.; JALILI, Z. Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum* L. essential oil From Alborz Mountain against *Aspergillus* species. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**; v. 7, p. 50-55, 2012.

MOLAN, A. L.; WAGHORN, G. C.; MCNABB, W. C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. **Veterinary Record**, v. 150, p. 65-69, 2002.

MORENO-GONZALO, J.; MANOLARAKI, F.; FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; CELAYA, R.; OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L. M.; HOSTE, H.; FERRE, I. In vitro effect of heather (Ericaceae) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. v. 197, n. 235–243, 2013.

PERRY, R. N. Hatching. In: DONALD, L. (Ed.), TAYLOR AND FRANCIS, **The Biology of Nematodes**. London and New York, p. 147–169. 2002.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Ciência Rural**, v. 32, n. 3, 2002.

RANA, V. S.; Chemical Composition of the Essential Oil of *Cuminum cyminum* L. Seeds from Western India. **Journal of Medicinal Plants and By-products**, v. 2, p. 207-210, 2014.

RIHAWY, M. S.; BAKRAJI, E. H.; ODEH, A. PIXE and GC-MS investigation for the determination of the chemical composition of Syrian *Cuminum cyminum* L. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 86, p. 118-125, 2014.

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

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.P. MOYNA, P. Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 154–159, 2010.

SINTIM, H. Y.; BURKHARDT, A.; GAWDE, A.; CANTRELL, C. L.; ASTATKIE, T.; OBOUR, A. E.; ZHELJAZKOV, V. D.; SCHLEGEL, V. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. **Industrial Crops and Products**, v. 63, n. 9, p. 190-196, 2015.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das plantas Mediciniais** (A Farmácia de Deus). 2ª ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA, 1992, 120p.

VILLARREAL J. P. V.; SANTOS, P. R.; SILVA, M. A. M. P.; AZAMBUJA, R. H. M.; GONÇALVES, C. L.; ESCAREÑO, J. J. H.; SANTOS, T. R. B.; PEREIRA, C. M. P.; FREITAG, R. A.; NASCENTE, P. S. Evaluation of phytotherapy alternatives for controlling *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vitro. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 299-306, 2017.

WANNER, J.; BAIL, S.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; GOCHEV, V.; GIROVA, T.; ATANASOVA, T.; STOYANOVA, A. Chemical composition and antimicrobial activity of cumin oil (*Cuminum cyminum*, Apiaceae). **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1355-1358, 2010.

YEOM, H. J.; KANG, J. S.; KIM, G. H.; PARK, I. K. Insecticidal and Acetylcholine esterase inhibition activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of german cockroach (*Blattellagermanica*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7194–7203, 2012.

3.3 Artigo 3

Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Thymus vulgaris* contra ovos e larvas de *Haemonchus contortus*

Leonardo Mortagua de Castro; Natália Berne Pinto; Micaele Quintana de Moura; Rogério Antonio Freitag; Gabriela de Almeida Capella; Tairan Ourique Motta; Maria Elisabeth Aires Berne

Será submetido a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1 **Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) contra ovos e larvas de**
2 ***Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae)**

3
4 **In vitro effect of *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) essential oil against *Haemonchus***
5 ***contortus* eggs and larvae (Nematoda: Trichostrongylidae)**

6
7 **Leonardo Mortagua de Castro*¹**

8 **Natália Berne Pinto²**

9 **Micaele Quintana de Moura³**

10 **Marcos Marreiro Villela⁴**

11 **Gabriela de Almeida Capella⁵**

12 **Rogério Antonio Freitag⁶**

13 **Maria Elisabeth Aires Berne⁷**

14
15 ¹ Orcid: 0000-0002-5705-6748. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia
16 e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio
17 Grande do Sul, Brasil. Cep 96010-900.

18 ² Orcid: 0000-0001-6822-501X. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia
19 e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio
20 Grande do Sul, Brasil. Cep 96010-900.

21 ³ Orcid: 0000-0002-2900-8300. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia
22 e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio
23 Grande do Sul, Brasil. Cep 96010-900.

24 ⁴ Orcid: 0000-0002-1614-8865. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia
25 e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio
26 Grande do Sul, Brasil. Cep 96010-900.

27 ⁵ Orcid: 0000-0002-0907-2233. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia e
28 Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio
29 Grande do Sul, Brasil. Cep 96010-900.

30 ⁶ Orcid: 0000-0003-3714-2080. Laboratório de Química Orgânica, Departamento de Química,
31 Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Cep 96010-900.

32 ⁷ Orcid: 0000-0003-4444-1134. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia
33 e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, Rio
34 Grande do Sul, Brasil. Cep 96010-900.

35
36
37
38
39
40

41 **Resumo**

42 O parasito maior importância para a ovinocultura é o *Haemonchus contortus*, sendo o controle
43 deste parasito dificultado pela resistência anti-helmíntica aos princípios ativos existentes, com
44 isso, a necessidade por novos métodos de controle é eminente, dentre estes, surgem as plantas
45 e seus óleos essenciais. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação *in vitro* do óleo
46 essencial (OE) de *Thymus vulgaris* contra ovos e larvas de *H. contortus*. O OE foi testado nas
47 concentrações: 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58; 0,29 mg/mL. Para o teste de inibição da eclodibilidade
48 (IE) foram utilizados ovos, recuperados a partir da coleta de fezes. No teste de inibição do
49 desenvolvimento larval (IDL) foram utilizadas L1, as larvas recuperadas foram incubadas com
50 1 mL das diferentes diluições do óleo. Para a inibição da migração larval (IML) foram utilizadas
51 L3, incubadas nas diferentes diluições do óleo. O OE apresentou alta eficiência, atingindo 100%
52 na IE, 100% na IDL e 95,30% no teste de IML. O constituinte majoritário identificado foi o
53 endo-Borneol (30,48%). A partir dos resultados apresentados, conclui-se, *T. vulgaris*
54 demonstrou potencial anti-helmíntico e é uma alternativa promissora para prosseguir os
55 estudos, através de avaliações *in vivo*, no controle destes parasitos em ovinos.

56
57 **Palavras chave:** Fitoterápicos; tomilho; ruminantes; bioprospecção.

59 **Abstract**

60 The most important parasite for sheep breeding is *Haemonchus contortus*, being the control of
61 this parasite hindered by the anthelmintic resistance to the existing active principles, therefore,
62 the need for new control methods is eminent, among them, the plants and their oils essentials
63 arise. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* action of *Thymus vulgaris* essential
64 oil (OE) against *H. contortus* eggs and larvae. The EO was tested at concentrations: 9.4; 4.7;
65 2.35; 1.17; 0.58; 0.29 mg / mL. For the hatchability inhibition test (IE) eggs were recovered
66 from the stool samples. In the larval development inhibition test (IDL) L1 were used, the
67 recovered larvae were incubated with 1 mL of the different oil dilutions. For inhibition of larval
68 migration (IML) L3 were used, incubated at different oil dilutions. The EO showed high
69 efficiency, reaching 100% in the IE, 100% in the IDL and 95.30% in the IML test. The major
70 constituent identified was endo-Borneol (30.48%). From the results presented, it was concluded
71 that *T. vulgaris* has demonstrated anthelmintic potential and is a promising alternative for
72 further studies through *in vivo* evaluations in the control of these parasites in sheep.

73
74 **Keywords:** Herbal medicines; thyme; ruminants; bioprospecting.

76 **Introdução**

77 Os nematódeos gastrintestinais são conhecidos como os maiores responsáveis pelas
78 perdas na ovinocultura, sendo o *Haemonchus contortus* o destaque como o principal parasito,
79 pois é o de maior prevalência e patogenicidade no Brasil (SOUZA et al., 2013). As perdas
80 ocasionadas por este parasito, se devem a grande ingestão de sangue, gerando anemia, fraqueza,
81 deficiência nutricional, perda de peso, perda na produtividade, podendo acarretar até a morte
82 dos animais (AROSEMEN et al., 1999; ROEBER et al., 2013).

83 O controle destes parasitos é realizado tradicionalmente com o uso de anti-helmínticos
84 comerciais, porém estes como passar do tempo tem demonstrado uma diminuição de sua
85 eficiência devido ao desenvolvimento da resistência nas populações destes parasitos (MILLER
86 et al., 2012).

87 Devido a esta dificuldade de controle com os tratamentos tradicionais, inúmeros estudos
88 estão sendo realizados em diversos países, e estes vêm demonstrando que componentes obtidos
89 de diversas espécies de plantas possuem eficiência na redução da carga parasitária de ovinos,
90 podendo se tornar uma nova alternativa para o controle desses nematódeos (GITHIORI et al.,
91 2006).

92 A família Lamiacea, na qual a espécie *Thymus vulgaris*, popularmente conhecida como
93 tomilho, está inserida, apresenta inúmeros gêneros de plantas com ação comprovada contra
94 nematódeos gastrintestinais de ovinos e bovinos (PESSOA et al., 2002; DIAS DE CASTRO et
95 al., 2013). A partir disso, este estudo tem como objetivo avaliar a ação do óleo essencial de *T.*
96 *vulgaris* na inibição da eclosão dos ovos, inibição do desenvolvimento larval e inibição da
97 migração de larvas de *Haemonchus contortus*.

98

99 **Material e métodos**

100

101 Obtenção do óleo essencial

102 As sementes de *Thymus vulgaris* (tomilho), foram adquiridas de distribuidor comercial,
103 com certificação de qualidade e origem. As sementes foram submetidas à extração com arraste
104 de vapor em aparelho Clevenger, durante 4h. Após, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio
105 anidro P.A., armazenado em frasco âmbar e mantido a -18°C até a sua utilização. Uma amostra
106 foi retirada para análise química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa,
107 para descrição dos constituintes químicos.

108

109 Teste de Inibição da eclosão

110 Foram coletadas fezes de ovinos provenientes do Biotério da Universidade Federal de
111 Pelotas e realizada a técnica de Gordon & Whitlock (1939), para quantificar sua carga
112 parasitária. As amostras com mais de 2000 ovos por grama de fezes foram processadas de
113 acordo com a técnica de Hubert e Kerboeuf (1992) com modificações, com o objetivo de separar
114 os ovos das sujidades do material fecal.

115 O teste de eclosão de ovos foi baseado na metodologia descrita por Coles et al. (1992).

116 Foram adicionados 150 ovos por poço de placas de microcultivo, juntamente com o óleo de *T.*

117 *vulgaris*, em seis concentrações (9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58; 0,29 mg/mL), o controle negativo
118 foi realizado utilizando água destilada, o controle positivo com Tiabendazol 0,025 mg/mL e
119 também foi realizado o controle com Tween 80 (1% da solução final). Após 48 h, foi
120 acrescentado Lugol com o objetivo de interromper a eclosão das larvas e realizada a contagem
121 de ovos e larvas com a utilização de um microscópio invertido. Os tratamentos foram realizados
122 em quatro repetições. As médias da inibição da eclodibilidade para cada tratamento foi
123 determinada conforme a equação descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007): % de
124 Inibição da Eclodibilidade = número de larvas / número de larvas mais número de ovos X 100.

125

126 Teste de inibição do desenvolvimento larval

127 Para obtenção das L1, os ovos foram incubados em estufa B.O.D com temperatura de
128 27°C e umidade relativa de 80% por 24 h. O teste de desenvolvimento larval foi realizado
129 conforme método descrito por Roberts e O'Sullivan (1950) modificado. Para cada tratamento
130 foi utilizado uma alíquota de 1 mL, contendo aproximadamente 250 L1, foram incubadas
131 durante 6 dias com 2 g de fezes provenientes de um animal não parasitado por nematódeos
132 gastrintestinais, juntamente com 1 mL dos óleos essenciais de, *T. vulgaris* nas concentrações
133 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58; 0,29 mg/mL. O controle negativo foi constituído pela cultura tratada
134 com água destilada, controle com Tween 80% (1% da solução final) e o positivo por 0,02
135 mg/mL de Levamisol, todos em três repetições. A contagem das larvas de 3º estágio foi
136 realizada após 24h a partir da coleta das larvas da cultura, acrescido de Lugol, seguindo-se a
137 visualização ao microscópio invertido. O percentual de inibição foi dado através da seguinte
138 fórmula: % de inibição do desenvolvimento larval = (número de larvas no controle – número
139 de larvas no tratamento) / número de larvas no controle) x 100.

140

141

142 Teste de Inibição da migração larval

143 Para a realização da técnica as larvas de 3º estágio obtidas através da técnica de Roberts
144 e O'Sullivan (1950), foram colocadas para migrar por uma hora em placas de polietileno de
145 seis poços, com o objetivo de selecionar as larvas viáveis, após essa seleção inicial, as L3 foram
146 colocadas em contato com solução de hipoclorito de sódio 0,6%, por aproximadamente 20
147 minutos, para que houvesse o desembainhamento das larvas. Seguindo-se de três lavagens
148 através de centrifugação, a 3000rpm por 2 minutos, com água destilada e a adequação final para
149 concentração de 150 larvas em 100µL. Estas foram incubadas com 900µL do óleo essencial de

150 *T. vulgaris* nas concentrações de 9,4; 4,7; 2,035; 1,17; 0,58; 0,29 mg/mL, por 24 horas em
151 estufa a 28 °C. Como controle negativo foi utilizada água destilada, controle com Tween 80%
152 (1% da solução final) e o positivo por 0,02 mg/mL de Levamisol, todos os tratamentos foram
153 realizados em duas repetições.

154 Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço contendo as L3 foi transferido
155 para tamises com malha de abertura de 25µm e acondicionadas novamente em estufa a 28 °C
156 por 24 h. Após este período, os tamises foram removidos e lavados com água destilada para
157 retirar o conteúdo retido, seguindo-se a contagem em microscópio invertido das larvas que
158 migraram e das larvas que ficaram retidas nos tamises. As médias de inibição da migração
159 larval para cada tratamento foram calculadas através da equação: % inibição da migração larval
160 = Número de larvas que não migraram / (Número de larvas que não migraram + Número de
161 larvas que migraram) X 100.

162

163 Teste de Citotoxicidade

164 O efeito citotóxico de *T. vulgaris* foi determinado através do ensaio de MTT (brometo
165 tiazoli azul de tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983) com modificações, no ensaio
166 foram utilizadas células de rim bovino Madin-Darby (MDBK).

167

168 Análise estatística

169 Para a realização da análise estatística foi utilizado o software Statistix 9.0, ANOVA e
170 comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

171 A concentração inibitória 50% (CI50), concentração capaz de inibir 50% da eclosão, foi
172 determinada a partir da curva dose-resposta. Com intervalo de confiança de 95%, utilizando o
173 programa GraphPad Prism para Windows, versão 7.0.

174

175 Resultados

176 O óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou ação sobre os ovos de *H. contortus*, em todas
177 as concentrações testadas, não diferindo estatisticamente do controle com anti-helmíntico até a
178 concentração de 1,17mg/mL, quando atingiu 93,40% de inibição de eclosão (Tab. 1). Na
179 Inibição do desenvolvimento larval e inibição da migração larval mostrou maior ação nas
180 concentrações de 9,4mg/mL, (100%) e (95,30%) e 4,7mg/mL, (92,48%) e (95,85%),
181 respectivamente.

182

183 Tabela 1: Percentual de ação do óleo essencial de *Thymus vulgaris* contra ovos e larvas de
 184 *Haemonchus contortus*.

Tratamento	Inibição da eclosão	Inibição do desenvolvimento	Inibição da migração
H ₂ O	3,4 ^d	0 ^a	6,3 ^d
Tween	7,05 ^d	2,12 ^a	10,8 ^d
AH	100 ^a	99,50 ^c	82,05 ^{ab}
9,4 mg/mL	100 ^a	100 ^c	95,30 ^{ab}
4,7 mg/mL	100 ^a	92,48 ^{bc}	95,85 ^a
2,35 mg/mL	98,72 ^{ab}	65,68 ^{bc}	81,05 ^{ab}
1,17 mg/mL	95,40 ^{ab}	42,97 ^{abc}	69,60 ^{abc}
0,58 mg/mL	93,27 ^b	45,75 ^{abc}	43,95 ^{bcd}
0,29 mg/mL	77,60 ^c	36,43 ^{ab}	22,35 ^{cd}

185 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0.05).

186

187 Em relação à citotoxicidade em células de rim bovino, a porcentagem de células viáveis,
 188 após o teste de MTT com o óleo essencial de *T. vulgaris* foi de 50 e 51% nas concentrações de
 189 9,4 a 2,35 mg/mL (Tab. 2).

190

191

192

193 Tabela 2: Percentual de viabilidade de células MDBK após incubação com óleo essencial de
 194 *T. vulgaris*.

Viabilidade Celular (%)						
Tratamento	9,4	4,7	2,35	1,17	0,58	0,29
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
%	50	51	50	46	47	46

195

196 A CI 50 para inibição da eclodibilidade foi de 0,1373 mg/mL, inibição do
 197 desenvolvimento larval 0,8056 mg/mL e na inibição da migração larval 0,7253 mg/mL.

198 Os constituintes químicos majoritários detectados na cromatografia gasosa acoplada a
 199 espectrometria de massa foram endo-Borneol (30,48%), alpha-terpineol (28,56%), Thymol
 200 (11,95%) e Carvacrol (9,03%) (tabela 3).

201 Tabela 3: Constituintes químicos do óleo essencial de *T. vulgaris* após análise em cromatografia
 202 gasosa acoplada a espectrometria de massa.
 203

Compostos	%
alpha.-Pinene	2,40
Camphene	4.86
Cymene	1.12
beta-Linalool	1.87
endo-Borneol	30.48
4-terpinenol	1.50
alpha-terpineol	28.56
thymol methyl eter	1.09
Bornyl acetate	2.30
Carvacrol	9.03
Thymol	11.95
Caryophyllene	3.66
Caryophyllene oxide	1.17

204

205

206 **Discussão**

207 Este estudo visou avaliar a ação do óleo essencial de *T. vulgais* contra ovos, L1 e L3 de
 208 *H. contortus*. Com isso, observamos excelentes resultados que demonstraram a alta eficiência
 209 deste óleo. Foram utilizadas metodologias *in vitro* contra as diferentes formas evolutivas do
 210 ciclo de vida deste nematódeo, visando assim determinar em quais fases é possível interromper
 211 o desenvolvimento do *H. contortus* e ainda realizar uma triagem de compostos para futuros
 212 testes *in vivo*. A realização de testes *in vitro* prévios se mostra de grande importância por
 213 diminuir o número de animais de experimentação, diminuir custos e também reduzir o tempo
 214 do experimento, tornando possível a avaliação destes compostos anti-helmínticos (DEMELER
 215 et al., 2013).

216 Pode-se observar que em todas as metodologias propostas os resultados das maiores
 217 concentrações do óleo não diferiram estatisticamente do resultado observado na ação do
 218 controle com anti-helmínticos comerciais, tiabendazol para os ovos e levamisol para as larvas.
 219 Além disso, foi observada a relação dose/dependente, ou seja, conforme a diminuição da
 220 concentração do óleo essencial de *T. vulgaris*, menor foi sua eficiência sobre ovos e larvas de
 221 *H. contortus*.

222 O efeito demonstrado na inibição da eclosão larval, que nas concentrações de 9,4 e 4,7
 223 mg/mL alcançou 100% de eficácia, pode ser comparado ao encontrado por Ferreira et al.
 224 (2016), onde alcançou o mesmo resultado com o óleo essencial *T. vulgaris* na concentração 50
 225 mg/mL. O mesmo estudo, encontrou como maior constituinte deste óleo o Thymol,

226 representando 50,22% da amostra. Este constituinte isolado também foi testado frente ao
227 parasito, chegando a 100% na concentração 25 mg/mL. Podemos perceber a diferença no
228 percentual existente desta molécula, entre os dois óleos, visto que neste estudo o Thymol
229 representou apenas 11,95%. Acredita-se que isso deve-se ao óleo essencial do presente estudo
230 ser obtido de sementes de *T. vulgaris*, enquanto no estudo realizado por Ferreira et al. (2016)
231 foram utilizadas as folhas. O fato de serem duas partes diferentes da planta, pode alterar os seus
232 principais constituintes, porém cabe ressaltar o potencial apresentado pelos dois óleos na
233 inibição da eclosão.

234 *T. vulgaris* é uma planta aromática pertence à família Lamiacea, sendo esta conhecida
235 na cultura popular por possuir diversos gêneros de plantas com atividades medicinais. Contra
236 nematódeos gastrintestinais, a atividade dos óleos e extratos de planta da mesma família vem
237 sendo objetivo de estudos de diversos autores, demonstrado resultados promissores como o
238 encontrado neste estudo. Castro et al. (2017) testaram o óleo essencial e o extrato hidroalcoólico
239 de *Ocimum basilicum* contra nematódeos gastrintestinais de ovinos, chegando a 100% de
240 eficiência com os dois tipos de extrações. Pessoa et al. (2002) avaliaram a ação do óleo essencial
241 de *Ocimum gratissimum* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*, atingindo
242 100% na maior concentração que utilizou 1% do óleo. Em testes com nematódeos de bovinos,
243 Dias de Castro et al. (2013) utilizaram o extrato aquoso e o extrato hidroalcoólico de *Origanum*
244 *vulgare* na inibição da eclodibilidade de ovos, chegando a 96,7% de atividade na concentração
245 de 80 mg/mL do extrato hidroalcoólico. Tais resultados demonstram o potencial das plantas
246 dessa família, e que conforme o gênero da planta, a porção da planta utilizada e o método de
247 extração, podemos ter uma grande variação de eficácia.

248 Com relação ao teste de inibição do desenvolvimento larval, a alta eficiência do
249 resultado alcançado, 100% de ação na concentração 9,4 mg/mL, demonstra o potencial de *T.*
250 *vulgaris* contra a larva de primeiro estágio do nematódeo.

251 O teste de inibição da migração larval, realizado com as larvas infectantes, por sua vez
252 apresentou 95,3% de eficiência na maior concentração, sendo superior ao controle com anti-
253 helmíntico comercial levamisol, que atingiu 82,05%, este fato vem ao encontro do atual
254 panorama mundial da resistência anti-helmíntica, como relatado por Cezar et al. (2010), que
255 observou a ineficácia de inúmeros princípios ativos, incluindo o levamisol, em ovinos
256 naturalmente infectados no Rio Grande do Sul.

257 A CI 50 obtida, demonstra baixa dose necessária para a inibição de 50% dos parasitos,
258 sendo contra os ovos o maior potencial, onde 0,1373 mg/mL foram suficientes. Ferreira et al.

259 (2016) em seu estudo com o óleo de *T. vulgaris* encontrou uma CI50 de 0,436 mg/mL,
260 confirmando o potencial desta planta como anti-helmíntica.

261 A resposta obtida pelo óleo essencial de *T. vulgaris* ante *H. contortus*, demonstra que
262 este é uma possibilidade de uso para o controle de parasitos. E além das utilizações terapêuticas
263 conhecidas pela cultura popular, esta planta também tem sua ação comprovada contra outros
264 microrganismos, como a ação antifúngica e contra aflatoxinas demonstrada por Kohiyama et
265 al. (2015).

266

267 **Conclusão**

268 A partir do estudo realizado e dos resultados obtidos, podemos avaliar que o óleo
269 essencial de *T. vulgaris* nas concentrações em que foi testado teve uma excelente atuação frente
270 aos ovos e larvas de *H. contortus*, e demonstra ser uma excelente alternativa para auxiliar no
271 controle destes parasitos.

272

273 **Referências**

274

275 AROSOMEN, N. A. E.; BEVILAQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L.; GIRÃO, M. D. Seasonal
276 variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. *Revue*
277 *de Medecine Veterinaire*, São Paulo, v. 150, p. 11-14, 1999.

278

279 CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L. et al. Validação
280 de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s.
281 *Botucatu*, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

282

283 CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M. et al.
284 Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary*
285 *Parasitology*, v.148, n.3-4, p.288-294, 2007.

286

287 CASTRO, L. M.; PINTO, N. B.; MOTA, T. O. et al. Atividade ovicida do óleo essencial e do
288 extrato hidroalcoólico de *Ocimum basilicum* sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos.
289 *Science And Animal Health*. V.5 N.2 P. 138-150. 2017.

290

- 291 CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G. et al. Multiple resistance of gastrointestinal
292 nematodes to nine different drugs in sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*,
293 Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 157-160, 2010.
- 294
- 295 COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M. et al. World Association for the
296 advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic
297 resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.44, p.35-44, 1992.
- 298
- 299 DEMELER, J.; GILL, J. H.; HIMMELSTJERNA, G. V. S.; SANGSTER, N. C. The in vitro
300 assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids.
301 *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 3, 109-118. 2013.
- 302
- 303 DIAS DE CASTRO, L. L; MADRID, I. M; AGUIAR, C. L. G. et al. *Origanum vulgare*
304 (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. *Ciência Animal*
305 Brasileira., Goiânia, v.14, n.4, p. 508-513,. 2013.
- 306
- 307 FERREIRA, L. E.; BENINCASA, B. I.; FACHIN, A. L. et al. *Thymus vulgaris* L. essential oil
308 and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from
309 sheep. *Veterinary Parasitology*. 2016.
- 310
- 311 GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in
312 sheep faeces. *Journal Council Science Industrial Research*. V. 12, p. 50-52, 1939.
- 313
- 314 HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of
315 anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, v. 130, p. 442-446, 1992.
- 316
- 317 KOHIYAMA, C. Y.; RIBEIRO, M, M, Y.; MOSSINI, S. A. G. et al. Antifungal properties and
318 inhibitory effects up on aflatoxin production oh *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus*.
319 *Food Chemistry*. 173. 1006-1010. 2015.
- 320
- 321 MILLER, C. M.; WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M. et al. The production cost of
322 anthelmintic resistance in lambs. *Veterinary Parasitology*. 186 (3-4): 376-381. 2012.
- 323

- 324 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to
325 proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63, 1983.
326
- 327 PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. Anthelmintic
328 activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. And eugenol against *Haemonchus*
329 *contortus*. *Veterinary Parasitology*. V.109, p.59–63. 2002.
330
- 331 ROBERTS, F. H. S.; O’SULLIVAN, S. P.; Methods for egg counts and larvae cultures for
332 strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural*
333 *Research*, v.1, p.99-102, 1950.
334
- 335 ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal
336 nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology*
337 *Advances*. 31, 1135-1152. 2013.
338
- 339 SOUZA, M. F.; PIMENTEL, M. N. O.; PINHO, A. L. et al. Seasonal distribution of
340 gastrointestinal nematode infections in sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. *Revista*
341 *Brasileira de Parasitologia Veterinária*; 22(3): 351-359. 2013. [http://dx.doi.org/10.1590/S1984-](http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300006)
342 [29612013000300006](http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300006). PMID:24

4 Considerações Finais

Com os resultados obtidos nos estudos realizados podemos concluir que os óleos essenciais de *Anethum graveolens*, *Cuminum cyminum* e *Thymus vulgaris*, nas condições em que foram testados, apresentaram ação anti-helmíntica sobre os ovos e larvas de *Haemonchus contortus*, mostrando que estas plantas, assim como as moléculas delas originadas podem vir a ser grandes aliados no controle deste nematódeo, causador de tantos problemas para a ovinocultura brasileira e mundial. A possível utilização destas plantas no futuro como auxiliar aos métodos tradicionais já estabelecidos, além do impacto sanitário, terá ao seu lado o fato da população consumidora preocupada com a origem dos medicamentos utilizados, dando suporte e alavancando a pesquisa e o uso de fitoterápicos e produtos orgânicos.

Referências

ABBAS, S.; DAWAR, S. H.; TARIQ, M. A.; ZAKI, M. J. Nematicidal activity of spices against *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 2625-2632, 2009.

ACHARYA, J.; HILDRETH, M. B.; REESE, R. N. *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 201, 75–81, 2014.

ADAMU, M.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N.; Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **BMC Veterinary Research**, 9, 01–08, 2013.

ALMEIDA F.A., GARCIA K.C., TORGERSON P.R. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, V.59, p. 622-625, 2010.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; AGUILARCABALLERO, A. J.; HOSTE, H. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 3-4, p. 313-319, 2008.

AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G.; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 29: 31-38, 1992.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, p. 91-106, 2004.

AMARANTE, A. F. T. D.; RAGOZO, A.; SILVA, B.F.D. Os parasitas de ovinos. São Paulo; Editora Unesp Digital. 2014.

AROSOMEN, N. A. E.; BEVILAQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L.; GIRÃO, M. D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revue de Medecine Veterinaire**, São Paulo, v. 150, p. 11-14, 1999.

ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S.; COSTA, C. T.; SOUZA, J. A. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.1-2, p.43-9, 2003.

BAKER, L.B.; The Practical Veterinarian. **Veterinary Parasitology**, Butterworth–Heinemann, 225 Wildwood Avenue, Woburn, MA, pp. 10–324(01801-2041), 2001.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BETTAIEB, I.; BOURGOU, S.; WANNES, W. A.; HAMROUNI, I.; LIMAM, F., MARZOUK, B. Essential oils, phenolics, and antioxidant activities of different parts of cumin (*Cuminum cyminum* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, 58(19), 10410-10418, 2010.

BISHOP, S.C.; STEAR, M.J. Inheritance of faecal egg counts during early lactation in Scottish Blackface ewes facing mixed natural nematode infections. **Animal Science Journal**, 73, 389–395, 2001.

BORGES, C. C. L. Atividade in vitro de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitologia Latinoamericana**, v. 58, p.142-147, 2003.

BORIOLLO, M. F. G.; SILVA, T. A.; RODRIGUES-NETTO, M. F.; SILVA, J. J.; MARQUES, M. B.; DIAS, C. T. S.; OLIVEIRA, N. M. S. Reduction of doxorubicin-induced genotoxicity by *Handroanthus impetiginosus* in mouse bone marrow revealed by micronucleus assay. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 78, n 1, p. 1-12. 2018. doi: 10.1590/1519-6984.18515.

BUTTLE, D; BEHNKE, J. M; BARTLEY, Y; ELSHEIKHA, H. M; BARTLEY, D. J; GARNETT, M. C; DONNAN, A.A; JACKSON, F; LOWE, A; DUCE, L.R. Oral dosing with papaya látex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Parasite Vector**, 4 (36), 1-11, 2011.

CALVETE, C.; FERRER, L. M.; LACASTA, D.; CALAVIA, R.; RAMOS, J. J.; RUIZ-DE-ARCAUTE, M.; URIARTE, J. Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. **Veterinary Parasitology**, 16, 203(1-2):102-13. 2014. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.002. Epub 2014.

CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P. Interaction between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea). **Journal of Helminthology**, 82, 337–341, 2008.

CAMPOS, L. Aspectos benéficos do leite de ovelha e seus derivados. Bento Gonçalves, 2011. Disponível em:<http://www.casadaovelha.com.br/files/pesquisa_tecno_cientifica.pdf> acessado em 01 de julho de 2018.

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 Mediciniais**, Botucatu, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T.; MACEDO, I. T.; OLIVEIRA, L. M.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3-4, p.288-294, 2007.

CANTACESSI, C.; MITREVA, M.; CAMPBELL, B. E.; HALL, R. S.; YOUNG, N. D.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. First transcriptomic analysis of the economically important parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using a next-generation sequencing approach. **Infection, Genetics and Evolution**, 10(8), 1199-1207, 2010.

CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C. S. F., COTINGUIBA, A. C. S. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*, **Veterinary Parasitology**, vol.183, no. 3-4, pp. 260–268, 2012.

CASTRO, L. M; PINTO, N. B; MOTA, T. O; MOURA, M. Q; DIAS DE CASTRO, L. L; MADRID, I. M; FREITAG, R. A; BERNE, M. E. A. Atividade ovicida do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de *Ocimum basilicum* sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Science And Animal Health**, V.5 N.2 P. 138-150, 2017.

CHAHAL, K. K.; MONIKA.; KUMAR, A.; BHARDWAJ, U., KAUR, R. Chemistry and biological activities of *Anethum graveolens* L. (dill) essential oil: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, vol. 6, n. 2, p. 295-306. E-ISSN: 2278-4136 P-ISSN: 2349-8234, 2017.

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

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S. Natural antiparasitics have potential to extend product life. **Animal Pharm**, Londres, p. 12-13, 2008.

CHAUDHRY, A. H.; TANVEER, A.; SHAR, A.; AKHTAR, M. S.; SHAHID, M. K.; ASHFAQ, K. M.; MALIK, T. A.; SIDDIQUI, R. H. Physicochemical investigation and antimicrobial activity of essential oil of *Cuminum cyminum* L. **World Applied Sciences Journal**, 19:330-333, 2012.

COELHO, M. D. G.; XAVIER, T. B.; COSTA, J. F. D.; MACIEL, L. T. R.; BOZO, L. S. O.; COELHO, F. A. D. S.; AKISUE, G. 2017. Evaluation of plant extracts to control haemonchosis in naturally infected sheep. **Revista Ambiente & Água**, vol. 12, n. 2, p. 331-339, 2017. doi:10.4136/ambi-agua.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.35-44, 1992.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **Trends in Parasitology**, 17 (7), 325–330, 2001.

COSTA, C. T. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; CASTRO, C. M. S.; OLIVEIRA, L. M. B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 284-287. 2008.

DAOUK, R. K.; DAGHER, S.M.; SATTOUT, E.J. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. **Journal of Food Protection**, n.10, p.1059-1064, 1995.

D'ÁVILA, V. A.; AGUIAR-MENEZES, E. L.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V.; MENDONÇA, C. B.; PEREIRA, R. N.; SANTOS, T. M. Morphological characterization of pollens from three Apiaceae species and their ingestion by twelve-spotted lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 76, n. 3, p. 796-803. 2016. doi: 10.1590/1519-6984.07615. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.07615>.

DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A.; STAFFORD, K.; RYDZIK, A.; VARADY, M. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, 174(1-2): 58-64, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.020>. PMID:20850930.

DEMELER, J.; GILL, J. H.; HIMMELSTJERNA, G. V. S.; SANGSTER, N. C. The in vitro assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 3, 109-118, 2013.

DIAS DE CASTRO, L. L.; MADRID, I. M.; AGUIAR, C. L. G.; CASTRO, L. M.; CLEFF, M. B.; BERNE, M. E. A. A.; LEITE, F. P. L. *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.4, p. 508-513, 2013.

DOYLE, E.K.; KAHN, L.P.; MCCLURE, S.J. Rumen function and digestion of Merino sheep divergently selected for genetic difference in resistance to *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 130–6, 2011.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N.; ELAM, G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 25, n. 1, p. 1512-1518, 1964.

EGUALE, T.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*. **International Journal of Green Pharmacy**. 3(1), 29- 34, 2009. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-8258.49371>.

EL-ABDELLATI, A; CHARLIER, J; GELDHOF, P; LEVECKE, B; DEMELER, J; VON SAMSON- HIMMELSTJERNA, G; CLAEREBOUT, E; VERCRUYSSSE, J. The use of a simplified faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy on Belgian and German cattle farms. **Veterinary Parasitology**, 169, 352-357. 2010.

ENGSTRÖM, M.T.; KARONEN, M.; AHERN, J. R.; BAERT, N.; PAYRÉ, B.; HOSTE, H.; SALMINEN, J. P. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their in vitro activity against egg hatching motility of *Haemonchus contortus* Nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64, 840–851. 2016.

FÉBOLI, A.; LAURENTIZ, A. C.; SOARES, S. C.; AUGUSTO, J. G.; ANJOS, L. A.; MAGALHÃES, L. G.; FILARDI, R. S.; LAURENTIZ, R. S. Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, 226, 65-68, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.030>.

FERREIRA, L. E.; BENINCASA, B. I.; FACHIN, A. L.; FRANCA, S. C.; CONTINI, S. S. H. T.; CHAGAS, A. C. S.; BELEBONI, R. O. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, 2016.

FURTADO, K.S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 147f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 2006.

GAÍNZA, Y. A.; DOMINGUES, L. F.; PEREZ, O. P.; RABELO, M. D.; LÓPEZ, E. R.; CHAGAS, A. C. S. Anthelmintic activity *in vitro* of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. **Industrial Crops and Products**, 76:647–52, 2015.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSDORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**. 139(4): 308-20, 2006. PMID:16725262.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>

GOOD, B.; HANRAHAN, J.P.; CROWLEY, B.A.; MULCAHY, G. Texel sheep are more resistant to natural nematode challenge than Suffolk sheep based on faecal egg count and nematode burden. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.317-327. 2006.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

GRANDO, T.H; AS, M.F; BALDISSERA, M.D; OLIVEIRA, C.B; SOUZA, M.E;RAFFI, R.P; SANTOS, R.C.V; DOMINGUES, R;MINHO, A.P; LEAL, M.L.R; MONTEIRO, S.G. *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**, 90, 377–382, 2016. doi:10.1017/S0022149X15000401.

GREER, A.W. Trade-offs and benefits: implications of promoting a strong immunity to gastrointestinal parasites in sheep. **Parasite Immunology**, 30, 123–32, 2008.

HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; TRABELSI, N.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: a high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. **Food and Chemical Toxicology**; 48(8/9): 2186-2192, 2010.

HOSSEINZADEH, H.; KARIMI, G. R.; AMERI, M. Effects of *Anethum graveolens* L. seed extracts on experimental gastric irritation models in mice. **BMC Pharmacology**, 2, 21–27. 2002.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 130, p. 442-446, 1992.

IBGE. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>> acessado em 07 de junho de 2018.

ISBILIR, S. S; SAGIROGLU, A. Antioxidant potential of different dill (*Anethum graveolens* L.) Leaf extracts. **International Journal of Food Properties**, 14:894–902, 2011.

JACQUIET, P. et al. Host range and the maintenance of *Haemonchus* spp. In naive adverse arid climate. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 2, p.253-261, 1998.

KALANGI, S. K.; DAYAKAR, A.; GANGAPPA, D.; SATHYAVATHI, R.; MAURYA, R. S.; RAO, D. N. Biocompatible silver nanoparticles reduced from *Anethum graveolens* leaf extract augments the antileishmanial efficacy of miltefosine. **Experimental parasitology**, v. 170, p. 184-192, 2016. doi: 10.1016/j.exppara.2016.09.002.

KATIKI, L. M.; BARBIERI, A. M. E.; ARAUJO, R. C.; VERISSIMO, C. J.; LOUVANDINI, H.; FERREIRA, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, 2017.

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C. S.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, 183:103–8. 2011.

KAUR, G. J.; ARORA, D. S.; Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. **BMC complementary and alternative medicine**, vol. 9, n. 1, p. 30. 2009. doi: 10.1186/1472-6882-9-30.

KEDIA, A; PRAKASH, B; MISHRA, P. K; DUBEY, N.K. Antifungal and anti-aflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology** 168–169, 2014.

KHANI, A., BASAVAND, F. Chemical composition and insecticide activity of essential oil from dill seeds. **International Journal of Agriculture**, vol. 3, n. 3, p. 489. ISSN: 2228-7973. 2013.

KOHIYAMA, C. Y.; RIBEIRO, M, M, Y.; MOSSINI, S. A. G.; BANDO, E.; BOMFIM, N. S.; NERILO, S. B.; ROCHA, G. H. O.; GRESPAN, R.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINSKI, J. R. M. Antifungal properties and inhibitory effects up on aflatoxin production oh *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**. 173. 1006-1010. 2015.

KRECEK, R.C.; WALLER, P.J. Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. **Veterinary Parasitology**, v.139, p.270–282, 2006.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; KUMAR, A.; SHARMA, A.K. Antifungal efficacy of plant essential oils against stored grain fungi of *Fusarium* spp. **Journal of Food Science and Technology** Oct; 53 (10):3725-3734, 2016.

KUMARASINGHA, R.; PRESTON, S.; YEO, T. C.; LIM, D. S. L.; TU, C. L.; 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**, V9, P. 187-193, 2016.

LACOBELLIS, N. S.; CANTORE, P. L.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53:57-61, 2005.

MA, B.; BAN, X.; HUANG, B.; HE, J.; TIAN, J.; ZENG, H.; WANG, Y. Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing Sclerotinia rot of rapeseed. **PloS one**, vol. 10, n. 7, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0131733.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Atividade ovicida e larvicida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 18, 62–66, 2009.

MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; COSTA, C. T. C.; CASTRO, C. M. S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. 140(1-2): 98-104. PMID:16621294, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.007>.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. [on line] Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 21 de janeiro de 2013.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; CASTILLO-HERRERA, G. A.; ROSARIO-CRUZ, R.; FLORES-FERNANDEZ, J. M.; LOPEZ-RAMIREZ, J.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; LUGO-CERVANTES, E. C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. 108(2): 481-487. PMID:20865426, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2069-6>.

MAX, R. A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 138-143, 2010.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors**, v.7, p.598, 2014.

MELO, E. P. **Disponibilidade, composição química e contaminação por helmintos, de forrageiras com diferentes hábitos de crescimento, pastejadas por ovinos**. Maringá, 2000. 61p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, 2000.

MILLER, C. M.; WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; CANDY, P. M.; OLIVER, A. M. B.; WATSON, T. G. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. **Veterinary Parasitology**, 186(3-4), 376-381, 2012.

MOHAMMADPOUR, H.; MOGHIMIPOUR, E.; RASOOLI, I.; FAKOOR, H. M.; ASTANEH, S. A.; MOOSAIE, S. S.; JALILI, Z. Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum* L. essential oil From Alborz Mountain against *Aspergillus* species. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, 7, 50-55, 2012.

MOLAN, A. L.; WAGHORN, G. C.; MCNABB, W. C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. **Veterinary Record**, v. 150, p. 65-69, 2002.

MONSEFI, M.; ZAHMATI, M.; MASOUDI, M.; JAVIDNIA, K. Effects of *Anethum graveolens* L. on fertility in male rats. **The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care**, 16, 488–497, December. 2011.

MONSEFI, M.; GHASEMI, M.; BAHAODDINI, A. The effects of *Anethum graveolens* L. on female reproductive system. **Phytotherapy Research**, 20, 865-868, 2006.

MORENO-GONZALO, J.; MANOLARAKI, F.; FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; CELAYA, R.; OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L. M.; HOSTE, H.; FERRE, I. In vitro effect of heather (Ericaceae) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 197, 235–243. 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

ORHAN, I. E.; SENOL, F. S.; OZTURK, N.; CELIK, S. A.; PULUR, A.; KAN, Y. Phytochemical contents and enzyme inhibitory and antioxidant properties of *Foeniculum vulgare* L. (dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions. **Food and chemical toxicology**, vol. 59, p. 96-103. 2013. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.053.

PAJOHI, M.R; TAJIK, H; FARSHID, A. A; HADIAN, M. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. **Journal of Applied Microbiology**, 110, 943–951, 2011.

PATIL, S. B; TAKALIKAR, S. S; JOGLEKAR, M. M; HALDAVNEKAR, V. S; ARVINDEKAR, A. U. Insulinotropic and b-cell protective action of cuminaldehyde, cuminol and an inhibitor isolated from *Cuminum cyminum* in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, 110, 1434–1443. 2013.

PERRY, R. N. Hatching. In: DONALD, L. (Ed.), TAYLOR AND FRANCIS, **The Biology of Nematodes**, London and New York, p. 147–169. 2002.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, V.109, p.59–63. 2002.

PINTO, N. B.; CASTRO, L. M.; CAPELLA, G. A.; MOTTA, T. O.; MOURA, M. Q.; BERNE, M. E. A.; LEITE, F. P. L. Controlling gastrointestinal nematodes in cattle by *Bacillus* species. **Veterinary parasitology**, vol. 245, p. 1-4. 2017. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.08.004.

RAJESWARI, V. D. Anthelmintic activity of plants: a review. **Research Journal of Phytochemistry**, 8, 57–63. 2014.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Ciência Rural**, v. 32, n.3, 2002.

RANA, V. S.; Chemical Composition of the Essential Oil of *Cuminum cyminum* L. Seeds from Western India. **Journal of Medicinal Plants and By-products**, 2, 207-210, 2014.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; SANTOS, J.M.L.; OLIVEIRA, E.F.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; PAULA, H.C. B.; BEVILAQUA, C. M. L. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, 135:24–9. 2013.

RIHAWY, M. S.; BAKRAJI, E. H.; ODEH, A. PIXE and GC-MS investigation for the determination of the chemical composition of Syrian *Cuminum cyminum* L. **Applied Radiation and Isotopes**, 86, 118-125, 2014.

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

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. **Biotechnology Advances**, 31, 1135-1152. 2013.

ROSALINSKI-MORAES, F.; MORETTO, L. H.; BRESOLIN, W. S.; GABRIELLI, I.; KAFER, L.; ZANCHET, I. K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do alto irani (amai), oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 559-565, jul./set. 2007.

SAHIB, A.S.; MOHAMMED, I.H.; SLOO, S.A. Antigiardial effect of *Anethum graveolens* aqueous extract in children. **Journal of intercultural Ethnopharmacology**, 3(3), 109. 2014.

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

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; P. MOYNA, P. Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 154–159, 2010.

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

SILVA, B. F. **Epidemiologia das infestações por *Oestrus ovis* em ovinos criados em Botucatu e influência da raça no parasitismo**, 2012. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

SINGH, G.; MAURYA, S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: Part 52. **Journal of Food Science**, vol. 70, n. 4, p. M208-M215, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07190.x>.

SINTIM, H. Y.; BURKHARDT, A.; GAWDE, A.; CANTRELL, C. L.; ASTATKIE, T.; OBOUR, A. E.; ZHELJAZKOV, V. D.; SCHLEGEL, V. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. **Industrial Crops and Products**, v. 63, n. 9, p. 190-196, 2015.

SLUPSKI, J.; LISIEWSKA, Z.; KMIĘCIK, W. Contents of macro and microelements in fresh and frozen dill (*Anethum graveolens* L.). **Food Chemistry**, 91, 737–743. 2005.

SOUZA, M. F.; PIMENTEL, M. N. O.; PINHO, A. L.; SILVA, R. M.; FARIAS, A. C. B.; GUIMARÃES, M. P. Seasonal distribution of gastrointestinal nematode infections in sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 22(3): 351-359. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300006>. PMID: 24.

STRAIN, S. A. J.; STEAR, M. J. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 23, p. 527-531, 2001.

SUAREZ, V. H.; CRISTEL, S. L.; BUSETTI, M. R. Epidemiology and effects of gastrointestinal nematode infection on milk productions of dairy ewes. **Parasite**, 16, 141–14. 2009.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 183–194, 2002.

TIAN, J; XIAOQUAN, B; ZENG, H; HUANG, B; HE, J; WANG, Y. In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, 1992-1999. 2011.

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

VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.209, 278–280, 2015.

VIEIRA, L. S. Cominho. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das plantas Medicinais** (A Farmácia de Deus). 2ª ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres L.T.D.A., 1992. 120 p.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciências Agropecuárias**, v. 2, n. 2, p. 49-56, 2008.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; PEREIRA, M. F.; DANTAS, L. B.; XIMENES, L. J. F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará, North - East Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Medicine Veterinary**, Toulouse, v. 150, n. 5, p. 447-452, 1999.

VIEIRA, J. N.; GONÇALVES, C. L.; VILLARREAL, J. P. V.; GONÇALVES, V. M.; LUND, R. G.; FREITAG, R. A.; SILVA, A. F.; NASCENTE, P.S. Chemical composition of essential oils from the apiaceae family, cytotoxicity, and their antifungal activity in vitro against *Candida* species from oral cavity. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 79, n. 3, p. 432-437. 2019. doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.182206>.

VILLARREAL, J. P. V.; SANTOS, P. R.; SILVA, M. A. M. P.; AZAMBUJA, R. H. M.; GONÇALVES, C. L.; ESCAREÑO, J. J. H.; SANTOS, T. R. B.; PEREIRA, C. M. P.; FREITAG, R. A.; NASCENTE, P. S. Evaluation of phytotherapy alternatives for controlling *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vitro, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 299-306, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017052>

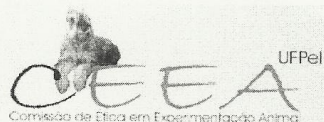
WALLER, P.J.; THAMSBORG, S.M. Nematode control in 'green' ruminant production systems. **Trends in Parasitology**, v.20, p.493-497, 2004.

WANNER, J.; BAIL, S.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; GOCHEV, V.; GIROVA, T.; ATANASOVA, T.; STOYANOVA, A. Chemical composition and antimicrobial activity of cumin oil (*Cuminum cyminum*, Apiaceae). **Natural Product Communications**, 5(9): 1355-1358, 2010.

YEOM, H. J.; KANG, J. S.; KIM, G. H.; PARK, I. K. Insecticidal and Acetylcholine Esterase Inhibition Activity of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against Adults of German Cockroach (*Blattella germanica*) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60 (29), pp 7194–7203, 2012. doi: 10.1021/jf302009w.

YOSHIHARA, E.; MINHO, A. P.; CARDIM, S. T.; TABACOW, V. B. D.; YAMAMURA, M. H. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of condensed tannins on gastrointestinal nematode infestations in sheep (*Ovis aries*). **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 35, núm. 6, p. 3173- 3178, 2014.

Anexos



Pelotas, 25 de abril de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professora Maria Elisabeth Aires Berne

Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Avaliação da atividade antihelmíntica de extratos vegetais em nematódeos gastrointestinais de ovinos**”, processo nº23110.003897/2012-23, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 3897).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 26 / 04 / 2012

Assinatura da Professora Responsável: