

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA**

**LUIS EDUARDO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS  
DE PLANTAS DAS FAMÍLIAS ASTERACEAE, LAMIACEAE E RUTACEAE CONTRA ISOLADO  
RESISTENTE DE *Haemonchus contortus*.**

**RIBEIRÃO PRETO  
ESTADO DE SÃO PAULO  
2016**

**LUIS EDUARDO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DAS FAMÍLIAS ASTERACEAE, LAMIACEAE E RUTACEAE CONTRA ISOLADO RESISTENTE DE *Haemonchus contortus*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. René de Oliveira Belebani

**Co-Orientador:** Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas

**RIBEIRÃO PRETO  
ESTADO DE SÃO PAULO  
2016**

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da  
Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto –

Ferreira, Luis Eduardo, 1985-  
F383a “Avaliação da atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* de óleos  
essenciais de plantas das famílias asteraceae, lamiaceae e rutaceae  
contra isolado resistente de *haemonchus contortus*.” / Luis Eduardo  
Ferreira. - - Ribeirão Preto, 2016.  
60 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. René Oliveira Beleboni.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2016.

1. Biotecnologia. 2. *H. contortus*. 3. Plantas medicinais. I. Título.

CDD 660

**LUIS EDUARDO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA IN VITRO E IN VIVO DE  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DAS FAMÍLIAS ASTERACEAE, LAMIACEAE  
E RUTACEAE CONTRA ISOLADO RESISTENTE DE *HAEMONCHUS  
CONTORTUS*.**

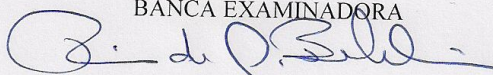
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade de  
Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

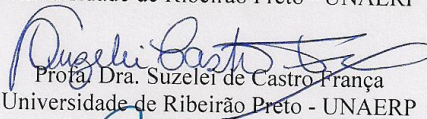
Data da defesa: 22 de março de 2016

Resultado: Aprovado

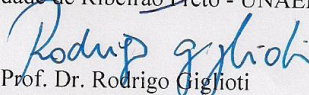
BANCA EXAMINADORA



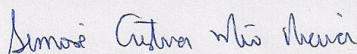
Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



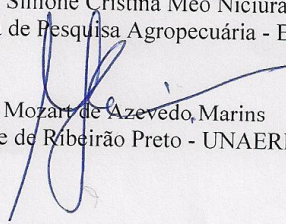
Profa. Dra. Suzelê de Castro França  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dr. Rodrigo Gigliotti  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP



Profa. Dra. Simone Cristina Meo Niciura  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa



Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO  
2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por te me concedido força, saúde, paz, paciência, esperança e persistência, ao longo destes três últimos anos de muito trabalho.

Durante toda minha vida, nunca perderei oportunidade de agradecer sempre a toda minha família, em especial meu pai Ailton e minha mãe Eni, pois sempre acreditaram em meu potencial e me deram toda força, apoio e paciência durante este período. Hoje com mais esta etapa de cumprida em minha vida, vejo o quanto eles são o alicerce de minha carreira, e sem todo esse carinho e atenção, eu não seria parte do que sou hoje, adoro e amo vocês, sempre serei grato por tudo.

Quero também fazer um agradecimento ao meu orientador Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni, que acreditou em meu potencial e me deu esta chance e oportunidade de fazer este trabalho, e também a todos os professores colaboradores e colegas do Departamento de Biotecnologia, que me ajudaram e deram o apoio técnico e científico necessário durante este período. Além disso, quero também agradecer pelo suporte financeiro dado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo Nº 2012/17405-0) que sem essa ajuda de custo nada deste trabalho seria realizado.

A todos vocês, que pessoas tão valiosas, importantes e especiais em minha vida meu muito obrigado!

Luis Eduardo Ferreira

## RESUMO

Nos últimos anos a ovinocultura se destacou no setor pecuário. Isto foi motivado pelo forte interesse na obtenção de seus derivados, apresentando grande superávit de mercado no Brasil e no mundo. No entanto, o setor ainda enfrenta sérios problemas sanitários e zootécnicos agravados pela resistência anti-helmíntica, o que dificulta o controle das doenças gastrintestinais causadas principalmente pela espécie parasitária *Haemonchus contortus*. A busca por novos agentes anti-helmínticos que ajam em diferentes fases do ciclo de vida do parasita tem sido uma das alternativas perseguidas pelo mercado veterinário. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de plantas das famílias Asteraceae, Lamiaceae e Rutaceae, através de ensaios *in vitro* e *in vivo* envolvendo ovinos infectados artificialmente com o isolado resistente do parasita *H. contortus* (Embrapa2010). Nos ensaios *in vitro*, foram realizados ensaios de inibição da eclosão de ovos, motilidade larvar e viabilidade dos parasitas adultos, com exposição direta dos óleos essenciais contra as diferentes fases evolutivas do *H. contortus*. Os resultados *in vitro* mostraram que o óleo essencial de *T. vulgaris* (“tomilho”) foi o que apresentou melhor desempenho na atividade anti-helmíntica em comparação com os demais óleos testados. Apesar da ineficácia relativa do óleo de *T. vulgaris* no ensaio *in vivo*, o que se deve ser corrigido através do melhoramento de sua biodisponibilidade, os resultados *in vitro* validam o uso popular do óleo de *T. vulgaris* como anti-helmíntico, ao menos contra o *H. contortus*. De fato, tanto o óleo essencial de *T. vulgaris* quanto o timol, que representa 50,22% da composição do óleo, foram efetivos contra o *H. contortus* nas suas principais fases de vida. Tanto o óleo quanto o timol foram capazes de inibir a eclosão dos ovos entre 96,4 a 100% e a motilidade larvar entre 97,0% a 100%. Tanto óleo quanto timol bloquearam completamente a motilidade de parasitas adultos de *H. contortus* dentro das primeiras 6 horas de experimento, equiparando-se ao controle positivo. Dado fato de o timol replicar em grande proximidade os resultados anti-helmínticos apresentados pelo óleo e de ser este composto o principal constituinte do mesmo, é natural assumir que o timol seja o único responsável direto pela ação anti-helmíntica de *T. vulgaris*. Estes resultados apresentam importância etnofarmacológica, sendo de valia para o desenvolvimento de novos fármacos e mesmo da fitoterapia, aumentando a oferta de opções para o mercado veterinário.

**Palavras-Chave:** Anti-helmínticos. Biotecnologia. *H. contortus*. Óleos essenciais. Ovinocultura. Plantas medicinais.

## ABSTRACT

Recently sheep farming has gained attention in the livestock sector due to a rising interest in its derivate, showing a huge surplus in Brazil and worldwide. However, the sector is still facing sanitary and zootechnical problems, which are aggravated by the anthelmintic resistance. It promotes several problems to the control of gastrointestinal diseases caused mainly by the parasite specie *Haemonchus contortus*. The search for new anthelmintic agents with action at the different stages of the parasite life cycle have been the main goal pursued by the veterinary market. The aim of this work was to evaluate the anthelmintic activity of essential oils from plants of *Asteraceae*, *Laminaceae* and *Rutaceae* families, through *in vitro* and *in vivo* assays involving artificially infected sheep with the isolate resistant parasite *H. contortus* (Embrapa2010). The *in vitro* assays were performed by use of inhibition hatching eggs tests, inhibition of larval motility and viability of adult parasites tests, by exposing the essential oils directly against the different evolutionary stages of the *H. contortus*. The *in vitro* results showed that the essential oil of *Thymus vulgaris* (Tomilho) presented the best anthelmintic activity performance compared with the other oils tested. Despite the relative inefficiency of the *T. vulgaris* essential oil at the *in vivo* assay, which must be corrected by developing its bioavailability, the *in vitro* results validated the popular use of the *T. vulgaris* oil as an anthelmintic, at least against *H. contortus*. Indeed, both the *T. vulgaris* essential oil as thymol, which represents 50,22% of the oil composition, were effective against *H. contortus* in its main stages of life. Both *T. vulgaris* essential oil as thymol were able to inhibit the egg hatching (96,4 to 100%) and the larval motility (97,0 to 100%), as well as to completely blocked the motility of *H. contortus* adult parasites within the first 6 hours of the experiment, equating up to the positive control. Since thymol replicates in a very proximity the anthelmintic results provided by the oil and this last compound being its main constituent, is natural to assume that thymol is the only direct responsible for the anthelmintic action of *T. vulgaris*. These results have important ethnopharmacological value as well as for the development of new antihelmintics, increasing the supply of options for the veterinary market.

**Key words:** Anthelmintics. Biotechnology. *H. contortus*. Essential oil. Sheep breeding. Medicinal plants.

## LISTA DE FIGURAS

1	Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i> .....	16
2	Espécies vegetais elencadas para os experimentos deste trabalho .....	22
3	Estruturas moleculares .....	33
4	Efeito dos diferentes tratamentos com óleos essenciais na inibição da eclosão de ovos de <i>H. contortus</i> .....	34
5	Efeito dos diferentes tratamentos com óleos essenciais na inibição da motilidade de larvas L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....	36
6	Efeito dos diferentes tratamentos com óleos essenciais na inibição da viabilidade dos parasitas adultos de <i>H. contortus</i> .....	38
7	Efeito dos diferentes tratamentos de timol .....	40
8	Estruturas moleculares .....	42



## LISTA DE TABELAS

1	Análise dos constituintes químicos identificados por CG-EM .....	30
2	Concentração mínima inibitória de 50% (IC <sub>50</sub> ) dos diferentes óleos nos testes de eclodibilidade de ovos e motilidade larvar para cepas resistentes de <i>H. contortus</i> ...	39
3	Efeito dos diferentes tratamentos com óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> em ovinos artificialmente infetados pelo parasita <i>H. contortus</i> durante os ensaios <i>in vivo</i> ( $p < 0,05$ ) .....	43

## LISTA DE ABREVIACES

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SIDRA	Sistema IBGE de Recuperao Automática
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal
GluCl	Receptores de canais Cloro controlados por glutamato
GABA	Receptores cido Gama-Aminobutírico
L <sub>n</sub> <sup>o</sup>	Fase Larval do parasita <i>Haemonchus contortus</i>
C <sub>n</sub> <sup>o</sup>	Cadeia Carbnica
CG-EM	Cromatografia  Gás Acoplada a Espectrometria de Massas
OPG	Ovos Por Grama de Fezes
PBS	( <i>“Phosphate Buffered Saline”</i> ) Solução Tampão Fosfato-Salino
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária
IC <sub>50</sub>	( <i>“Inhibitory Concentration”</i> ) Concentração Inibitória de 50%
WAAVP	<i>World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology</i>
PEG	Polietileno Glicol
PV	Peso Vivo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. Ovinocultura: Situação sócio-econômica do setor pecuário e perspectivas do mercado .....	12
1.2. Entraves e desafios na pecuária ovina .....	14
1.2.1. <i>Haemonchus contortus</i> .....	15
1.3. Tratamento das parasitemias gastrintestinais .....	17
1.4. Seleção das espécies vegetais produtoras de óleos essenciais com potencial atividade anti-helmíntica para estudo neste trabalho .....	19
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>23</b>
2.1. Objetivo geral .....	23
2.2. Objetivos específicos .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1. Óleos essenciais .....	23
3.1.1. Coleta das plantas, identificação taxonômica e obtenção dos óleos e constituintes químicos .....	23
3.1.2. Análises dos constituintes químicos dos óleos por CG-EM .....	24
3.2. Aquisição e manutenção de animais infectados por <i>H. contortus</i> para os ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	25
3.2.1. Infecção artificial mono-específica com <i>H. contortus</i> .....	25
3.2.2. Manutenção do banco de larvas L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....	26
3.3. Ensaios <i>in vitro</i> .....	26
3.3.1. Ensaio de inibição da eclosão de ovos .....	26
3.3.2. Ensaio de inibição da motilidade larvar .....	27
3.3.3. Ensaio de viabilidade dos parasitas adultos .....	27
3.4. Ensaios <i>in vivo</i> .....	28
3.5. Análises estatísticas .....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>44</b>
APÊNDICE A .....	53
APÊNDICE B .....	58
APÊNDICE C .....	59
APÊNDICE D .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Ovinocultura: Situação sócio-econômica do setor pecuário e perspectivas do mercado

A ovinocultura tem como principais características a rusticidade dos animais e a boa capacidade de adaptação as diferentes condições de clima e ambiente. Por serem os ovinos um dos primeiros animais domesticados pelo homem, a criação vem sendo praticada desde um passado remoto por diversas civilizações como forma importante de subsistência. Com mais de 800 raças diferentes, o sistema de criação se mantém tradicional, exercendo grande importância econômica em diversas regiões do mundo (VIANA, 2008).

A exploração da pecuária ovina, seja do tipo extensivo ou intensivo, tem sido motivada pela demanda crescente de seus principais derivados como a carne e a lã. No Brasil, a criação de ovinos sempre esteve presente de forma tradicional, sendo praticada desde o período colonial em quase todas as regiões do país. Entretanto, nos últimos 30 anos foi possível observar a forte oscilação deste setor pecuário, como por exemplo, o declínio da criação de ovinos na região sul do país devido à retração das importações da indústria têxtil no mercado internacional. Em contrapartida, em meados da década de 90, a maior apreciação da carne ovina favoreceu o aumento da criação de animais nas regiões sudeste e centro-oeste, direcionando a maior parte do rebanho para a produção e beneficiamento deste derivado (MARSIGILIO, 2012; ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014). É exatamente neste cenário que o aquecimento da criação ovina foi retomado, com demanda crescente da produção e consumo da carne, havendo, portanto, uma consolidação e fortalecimento deste setor como uma alternativa de alta lucratividade nos últimos anos (ÁVILA et al., 2013).

Segundo dados computados pelo Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA), no ano de 2013 foram contabilizados cerca de 17,2 milhões de cabeças de ovinos no Brasil, mostrando a importância da ovinocultura para o agronegócio nacional. No entanto, o dado ainda aponta que nem todo o plantel de ovinos se encontra distribuído de forma uniforme em todo nosso território, havendo também diferenças quanto às características de criação e técnicas de manejo dos animais em cada região brasileira (OJIMA; BEZERRA; OLIVEIRA, 2006; SIDRA, 2013).

Com efeito, o nordeste brasileiro possui a maior representatividade em número de animais neste setor pecuário, sendo por isso, classificado como a primeira região criadora do país. Nesta região, a ovinocultura é praticada de forma tradicional sob regime de pecuária extensiva, exercendo grande importância socioeconômica para população. As práticas de manejo são ainda rudimentares e do tipo subsistencialista, sendo os derivados da produção destinados ao consumo próprio de pequenos criadores espalhados na região (FARIAS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014).

Apesar das oscilações e no sul do país, a presença da indústria têxtil também fez com que a ovinocultura agregasse muita importância, sendo por este motivo, a segunda maior região criadora de ovinos do Brasil segundo dados do SIDRA nos últimos anos. Atualmente, além da lã, que sofre grandes oscilações de mercado de tempos em tempos, a criação de ovinos está mais

recentemente direcionada também para a obtenção da carne, sendo observado aumento significativo na venda dos produtos nos açougues e redes de supermercados da região. Isto tem tornado a prática de mercado mais estável do que nas últimas décadas (GUSE; DÖRR; ROSSATO, 2013; UCHA, 2011; SILVA et al., 2013).

Já nas regiões sudeste e centro-oeste, o número de animais é ainda aparentemente baixo, mas bem semelhantes entre si, variando entre 0,7 a 1 milhão de cabeças em cada uma destas regiões. Apesar desse dado, o plantel de animais está em franco crescimento, e em se tratando das práticas de manejo do rebanho, são aplicados métodos mais sofisticados como o uso de tecnologias destinadas a melhoria da qualidade da criação. Nestas regiões, o rebanho é classificado como sendo de corte, totalmente direcionado para a produção de carne, oferecendo cortes comerciais com altos valores agregados (LARA et al., 2009).

Portanto, o aumento da demanda para a obtenção da carne ovina, tem exigido cada vez mais do setor para a criação de animais com boa composição corporal. Este cenário favorece o manejo da criação de ovinos na forma de pecuária intensiva, com aplicação de grandes investimentos financeiros, com técnicas baseadas em pesquisas de biotecnologia animal envolvendo melhoramento genético e inseminação artificial. Além disso, a prática da criação deve envolver condições de alto potencial zootécnico, com rigoroso padrão de limpeza e higiene no confinamento dos animais, controle de parições pelas matrizes, alimentação balanceada e rica em nutrientes, alto padrão genético dos animais, e boa gestão administrativa das unidades produtivas (OJIMA; BEZERRA; OLIVEIRA, 2006; JORIS; VILPOUX, 2013; ZUNDT et al., 2014).

Muitos fatores relacionados à qualidade da carne ovina tem justificado o aumento da procura e do consumo pelo mercado. Entre eles, são levados em consideração o sabor e a maciez da carne, além também da qualidade nutricional dos cortes como baixo teor de gorduras e alto teor proteico. Por este motivo, na indústria pecuarista, muitos frigoríficos já oferecem diversos tipos de cortes comerciais destinados para cada finalidade gastronômica, sempre voltada para consumidores de alta exigência (SANTHANNA, 2010). Neste cenário, considerando os aspectos culturais, tradição e religião, o perfil de consumo da carne ovina pode variar drasticamente entre muitos países, fazendo com que a média mundial de consumo ao ano chegue a 2 kg/habitante. No Brasil, e apesar do crescimento recente, a média do consumo da carne ovina está entre 0,7 e 1 kg por habitante ao ano, mas em países como Mongólia e Nova Zelândia o consumo da carne ovina pode chegar a até 34 kg por habitante/ano (VIANA, 2008; MARSIGILIO, 2012).

O plantel de ovinos encontra-se mais recentemente em ascensão tanto no agronegócio brasileiro como mundial, atingindo a expectativa de crescimento anual de 2,1% (MARSIGILIO, 2012). Por este motivo, tendo a pecuária ovina se mostrado cada vez mais promissora, o mercado encontra-se ainda em desenvolvimento gradativo, e para que alcance resultados ainda melhores, o setor deve superar grandes entraves e desafios, principalmente aqueles relacionados ao manejo dos animais no rebanho. Atualmente, uns dos mais graves problemas enfrentados por este setor

pecuário estão relacionados às doenças parasitárias gastrintestinais e, sobretudo, as dificuldades no controle e combate dos agentes parasitários (YONEYA, 2011).

## 1.2. Entraves e desafios na pecuária ovina

Em geral, as dificuldades encontradas pelos criadores na pecuária ovina são originadas a partir de diversos problemas envolvidos na criação dos animais. Dentre eles, podemos destacar a carência de informações técnicas e preparo no manejo dos animais; vermifugações com erros de dosagens, administrações e aplicações; além da ausência estratégica no controle das vermifugações associadas à estação climática do ano (NOVA et al., 2014; WANG et al., 2014). Neste contexto, podemos citar ainda a presença de vários criadouros e abatedouros em situação de clandestinidade, baixa adesão a eventuais programas de apoio governamental, o uso de pouca tecnologia que alternativamente visam baratear os custos de produção, e confinamento de um número muito grande de animais por piquetes. Todas estas condições citadas ampliam as chances de contágio e proliferação de doenças parasitárias gastrintestinais, também chamadas de verminoses ou helmintíases (SOUZA et al., 2013).

Os entraves sanitários e zootécnicos deixam, pois, em evidência, a atual situação do setor pecuário, implicando em perdas diretas e indiretas para o criador. No rebanho, as doenças parasitárias gastrointestinais levam às deficiências nutricionais, emagrecimento e déficits no crescimento animal, queda na produção de carne e leite, aumento das taxas de mortalidade, e, sobretudo, aumento dos custos para efeito do controle das infecções (VIEIRA et al., 2014).

A proliferação das infecções gastrintestinais, com destaque para a espécie *Haemonchus contortus*, considerada a de maior importância, é uma das principais causas de prejuízos econômicos e quedas na produtividade (VIEIRA et al., 2014). A resistência anti-helmíntica do parasita *H. contortus* consiste também em um fator limitante para o controle da doença no rebanho, pois resulta na ineficácia dos medicamentos anti-helmínticos utilizados para o seu controle (GILLEARD, 2013; ALBA-HURTADO; MUÑOZ-GUZMÁN, 2013).

No rebanho, os primeiros sinais de resistência anti-helmíntica são notados em animais que mantêm os sintomas da doença mesmo após a constante administração de vermífugo. A carência de informações técnicas em relação ao manejo do plantel sem o acompanhamento veterinário favoreceu a administração dos antiparasitários em esquema de subdosagem e periodicidade inadequada (WALLER et al., 1997; CHAGAS et al., 2013). No campo, tais práticas de manejo fizeram selecionar linhagens resistentes do parasita *H. contortus* aos anti-helmínticos, estabelecendo no final, uma vasta população de parasitas resistentes aos anti-helmínticos disponíveis atualmente no mercado. Na realidade, este problema se torna ainda mais evidente com o constante tráfego de animais entre as propriedades criadoras em decorrência do grande mercado de animais, favorecendo ainda mais a dispersão espacial da resistência anti-helmíntica (MELO; BEVILAQUA, 2005; BACHAYA et al., 2009; VERÍSSIMO et al., 2012).

No Brasil, os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica no rebanho tiveram início há mais de quatro décadas, sendo confirmada praticamente em todas as regiões brasileiras como na região nordeste (RODRIGUES et al., 2007), centro-oeste (SCZESNY-MORAES et al., 2010), sul (CEZAR et al., 2010), e sudeste (CRUZ et al., 2010; COSTA et al., 2011). No mundo a problemática alcançou gravidade alarmante, colocando em risco o rebanho de muitos países, com destaque para os localizados nas regiões tropicais e subtropicais, onde o clima favorece o desenvolvimento do ciclo parasitário. Dessa forma, o entrave já foi registrado em países como Estados Unidos (PARAUD; CHARTIER, 2003), Eslováquia (CERNANSKA et al., 2008), Bangladesh (AMIN et al., 2009), Índia (TARIQ; CHISHTI; AHMAD, 2010), Holanda (BORGSTEEDE et al., 2010), Noruega (DOMKE et al., 2011), Moçambique (CALA et al., 2012), Paquistão (AYAZ et al., 2013), e países como, França, Grécia e Itália (GEURDEN et al., 2014).

### 1.2.1. *Haemonchus contortus*

Na parasitologia veterinária, são conhecidas várias espécies de helmintos que causam danos à saúde animal e sérios agravos no rebanho ovino. Podemos citá-las principalmente como pertencentes aos gêneros: *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia* (*Teladorsagia*), *Nematodirus*, *Strongyloides*, *Moniezia*, *Cooperia*, *Oesophagostomum*, *Skrjabinema*, *Trichuris* e *Cysticercus* (MACIEL et al., 2014; CHINTOAN-UTA et al., 2014).

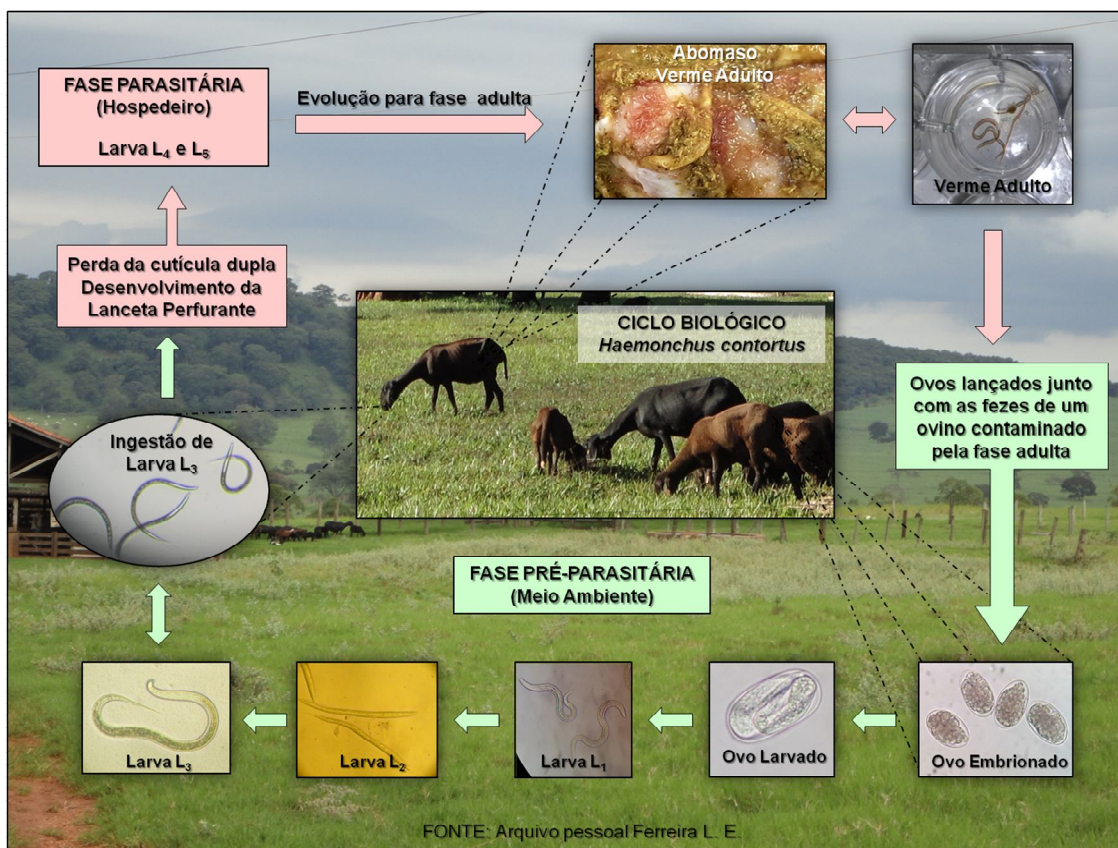
Com destaque, a espécie *H. contortus* é considerada como a de maior importância epidemiológica para o rebanho ovino e relevância patogênica para o animal. Esta espécie prevalece em cerca de 80% da carga parasitária dos animais infectados, quando consideradas as parasitemias gastrintestinais ou helmintíases (SORO et al., 2013). Além disso, possui alto poder patogênico e de reprodução no trato gastrintestinal do animal, com liberação farta de ovos e rápida adaptação e resistência ao meio ambiente (CHAGAS; VIEIRA, 2007). Por este motivo, é considerada a espécie de maior predominância, patogenicidade e, sobretudo, importância econômica, implicando em inúmeros prejuízos diretos e indiretos para o criador (AMARANTE, 2006).

Os danos patológicos causados pelo parasita *H. contortus* podem variar dependendo do grau de infecção do animal, e/ou sua integridade fisiológica, imunológica e condição nutricional, podendo levá-lo a uma infecção aguda e/ou crônica. Em geral, a sintomatologia da infecção pode ser manifestada clinicamente através da palidez na conjuntiva e mucosa oral, edema subcutâneo e submandibular, fraqueza e anorexia. No hospedeiro, o abomaso é o órgão de residência do parasita na forma adulta, que por ser hematófago, espolia a mucosa da parede intestinal causando inúmeras lesões gástricas chamadas coletivamente de gastrite verminótica (VIEIRA, 2008; MACIEL et al., 2006). Neste processo e nos casos de infecção aguda pode haver perdas de grande quantidade de sangue do hospedeiro durante a sucção do parasita seguida de exsudação proteica, levando o animal à severa anemia, hipoproteinemia e, até a morte. Já nos casos de infecções crônicas, a sintomatologia é expressa de forma indireta e em longo prazo, trazendo

como consequências para o animal, o retardo no crescimento, dificuldades no ganho de peso, e queda na produção de carne e leite, podendo ou não levar a morte (TAYLOR; COOP; WALL, 2010; MACIEL et al., 2014).

O ciclo do parasita (figura 1) ocorre de forma direta em um período completo de 28 a 30 dias. Todo processo é dividido em duas fases sendo uma de vida livre no meio ambiente e outra no hospedeiro (TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

**Figura 1:** Ciclo de vida de *Haemonchus contortus*.



**Fonte:** Arquivo pessoal: L.E. Ferreira.

Considerando a fase de vida livre como sendo o início do ciclo biológico, um ovo embrionado é lançado ao solo junto com as fezes de um ovino contaminado com a fase adulta do parasita. A diferença de temperatura entre o corpo do animal e o meio ambiente promove a ativação de genes responsáveis pelo o início da diferenciação dos ovos embrionados, de modo que, em até 48 horas, estes ovos evoluirão para ovos larvados. Destes últimos eclodirão as larvas rabditóides L<sub>1</sub> de vida livre. Dentro de um período de 5 dias, dependendo das condições do clima, umidade, temperatura, e irrigação do pasto, estas larvas L<sub>1</sub> evoluirão para larvas L<sub>2</sub> e posteriormente para as larvas L<sub>3</sub> infectantes. Nesta fase, tanto as larvas L<sub>1</sub> como as larvas L<sub>2</sub> possuem características morfológicas que as condicionam serem de vida livre (não parasitária), como abertura bucal bem desenvolvida, esôfago, e intestino estendido ao longo de todo corpo,



possuindo hábitos de se alimentarem de bactérias presentes nas próprias fezes dos animais. Já as larvas L<sub>3</sub> possuem estrutura bucal e intestino pouco desenvolvidos, além também de uma dupla cutícula que oferece proteção. Elas não se alimentam e consomem suas reservas energéticas acumuladas desde as fases L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>. A principal característica das larvas L<sub>3</sub> é possuir intensa motilidade que as fazem migrar das fezes para a vegetação no pasto, estando à espera da ingestão de um ovino durante o pastejo livre (URQUHART et al., 1998; MACHADO, 2008; TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

Considerando a ingestão das larvas L<sub>3</sub> por um ovino durante o pastejo, dentro de um período de 18 a 21 dias mudanças morfológicas ocorrerão, como a perda da cutícula externa promovida pela acidez do abomaso no hospedeiro. Isto levará ao desenvolvimento da lanceta perfurante, capacitando as larvas para início da espoliação do sangue da parede do trato gastrointestinal do animal. Com estas mudanças, as larvas L<sub>3</sub> se diferenciaram passando pelas fases L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, e evoluindo para a fase adulta com diferenças sexuais dimórficas, permitindo o acasalamento entre macho e fêmea, e posteriormente a postura de novos ovos que irão para o meio ambiente junto das fezes (URQUHART et al., 1998; MACHADO, 2008; TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

### **1.3. Tratamento das parasitemias gastrintestinais**

O tratamento clássico envolvendo a administração de medicamentos antiparasitários, na teoria, sempre foi a principal receita para combater as infecções parasitárias. No entanto, como já foi suscitado, seu uso de forma irregular e sem controle trouxe, na prática, a resistência anti-helmíntica (SCZESNY-MORAES et al., 2010). Neste seguimento, o uso racional dos antiparasitários, além de métodos não farmacológicos envolvendo boas práticas de manejo dos animais, quando bem compreendidos, devem ser executados para controlar o grau de infecção parasitária e evitar o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica, prolongando assim, a vida útil do medicamento no campo (SIMPRAGA et al., 2015). Para esta finalidade, medidas profiláticas são recomendadas por serem de valiosa importância e devem ser aplicadas em paralelo à administração do medicamento antiparasitário. Dentre elas, podemos citar a manutenção dos animais recém-adquiridos em quarentena; evitar a superlotação de animais na propriedade; e principalmente, evitar a super ou sub dosagem nas administrações dos medicamentos antiparasitários (BARROS, 2011).

Os custos que envolvem os impactos econômicos causados pelos parasitas gastrointestinais são contabilizados levando em consideração o número de animais no rebanho, produtividade, e nível de prevalência da doença em cada propriedade. Diante disso, as diferenças de cada propriedade, no geral, fazem com que as avaliações que envolvam os principais impactos econômicos sejam baseadas nos custos da diminuição dos lucros e aumento de gastos pelo criador para o controle das doenças gastrintestinais (VOORT et al., 2013). Na prática, os dados econômicos que mostram grande parte das despesas no campo são diretamente proporcionais à

aquisição comercial de vermífugos e de mão de obra com profissionais veterinários para o controle destas infecções (CARVALHO et al., 2010). Neste contexto, podemos verificar que na prática o comércio nacional de antiparasitários veterinários movimentou cerca de 989 milhões de reais no ano de 2013, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2013). No mundo, este valor chega à casa dos bilhões de dólares gastos anualmente no controle destas parasitemias (ZHU et al., 2013). Todo este panorama demonstra o elevado investimento no plantel de ovinos para erradicação deste entrave decorrente das doenças parasitárias.

De modo geral, as drogas anti-helmínticas oferecidas atualmente no mercado são classificadas em três classes bem distintas e tradicionais: Imidotiazóis compostos pelos fármacos tetramisol e levamisol; Benzimidazóis como tiabendazol, albendazol, febendazol, mebendazol, osfendazol e oxbandazol; e Lactonas Macrocíclicas que são representadas pelos fármacos do grupo das avermectinas como abamectina, doramectina, selemectina e ivermectinas, e do grupo das milbemicinas como a moxidectina (RODRIGUES et al., 2007; PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012; BYGARSKI; PRICHARD; ARDELLI, 2014).

Em relação ao mecanismo de ação de cada uma das classes de medicamentos citados, os imidotiazóis são fármacos agonistas de receptores nicotínicos de células musculares somáticas, causando paralisia de toda musculatura do parasita na fase larval e adulta (ALMEIDA et al., 2010). Já os benzimidazóis agem no impedimento da ligação da  $\beta$ -tubulina durante processo de polimerização de microtúbulos celulares, inibindo o processo de divisão celular, motilidade e secreção celular de neurotransmissores, além de interferirem na organização citoplasmática da célula, na absorção e transporte de nutrientes, metabolismo energético, e excreção de resíduos celulares tóxicos (MELO; BEVILAQUA; REIS, 2009). As lactonas macrocíclicas são fármacos agonistas de canais iônicos controlados por receptores de glutamato (GluCl<sub>s</sub>), agindo na hiperpolarização celular causada pelo aumento do influxo de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>). Isto resulta em inibições do desenvolvimento celular, da motilidade das larvas e parasitas adultos, além da paralisia da musculatura faríngea destes parasitas, o que impede a alimentação (FORRESTER et al., 2003; GLENDINNING et al., 2011; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; WOLSTENHOLME, 2012).

Recentemente, um novo medicamento veterinário foi lançado no mercado. Trata-se do monepantel, que pertence a uma nova classe de anti-helmínticos derivada do aminocetonitrilo. Apesar do seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, seu lançamento trouxe novas expectativas no controle das infecções parasitárias gastrintestinais de ovinos (RUFENER et al., 2009). No entanto, relatos de resistência anti-helmíntica em rebanhos localizados em propriedades do Uruguai já foram descritos na literatura, chamando novamente a atenção para a utilização racional dos medicamentos antiparasitários no campo (MEDEROS; RAMOS; BANCHERO, 2014).

Tendo em vista a inviabilização de muitos dos fármacos anti-helmínticos, a indústria farmacêutica investe em biotecnologia para o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários para o setor. A utilização de plantas medicinais como alternativa para o tratamento e prevenção de diversas doenças sempre foi aceita desde remotas épocas, e empregada por povos de diferentes culturas (PETROVSKA, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013). A fitoterapia pode ser compreendida como uma opção terapêutica a ser aplicada no campo (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, as plantas podem servir no fornecimento de novas substâncias bioativas de grande interesse farmacêutico. Estas novas substâncias podem servir de moléculas modelos na criação de novas classes farmacológicas úteis para o tratamento de diferentes doenças (SCHUSTER, 2001; WINK, 2012). Isto tem motivado inúmeros tipos de estudos no Brasil e no mundo para o melhor explorar da biodiversidade em busca de opções farmacológicas que atendam a diferentes setores econômicos, incluindo o pecuarista.

#### **1.4. Seleção das espécies vegetais produtoras de óleos essenciais com potencial atividade anti-helmíntica para estudo neste trabalho**

A escolha das espécies vegetais empregadas neste trabalho foi norteada por critérios etnofarmacológicos e quimiotaxonômicos bem definidos. Cumpre salientar que as plantas escolhidas para oferta de óleos essenciais para nossos testes estão em comum acordo com suas potenciais propriedades anti-helmínticas segundo relatos populares. Os critérios de seleção das espécies foram alicerçados com base nas informações da literatura científica justificando a escolha sem prejuízo da originalidade do trabalho, como caracterizações fitoquímicas preliminares, ação para outros tipos de parasitas que não o deste trabalho, análise do potencial anti-helmíntico de outros membros da família e gênero botânicos, além de ser creditada a planta escolhida a descrição de boa oferta de óleo essencial. Finalmente, de maneira estratégica, é importante destacar que as espécies vegetais selecionadas são amplamente distribuídas no território nacional e em nossa região, e não estão ameaçadas de extinção, o que proporciona facilidade quanto à localização e acesso, reduzindo os custos e o tempo na obtenção de boas quantidades do exemplar da planta e, com efeito, óleos essenciais. Como principais fontes de pesquisa para avaliação das informações etnofarmacológicas foram utilizados além dos artigos científicos citados abaixo, os seguintes sites: [www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br); [www.plantasquecuram.com.br](http://www.plantasquecuram.com.br); [www.curaplanta.com.br](http://www.curaplanta.com.br); [www.cantoverde.org](http://www.cantoverde.org), acessados no período de janeiro a junho de 2012.

Os óleos essenciais são constituídos de uma mistura rica em compostos de características voláteis, natureza lipofílica e forte odor. Os terpenos e terpenóides são os principais constituintes químicos presentes na composição dos óleos essenciais, diferindo entre si pela presença de um átomo de oxigênio nos terpenóides e um radical metila nos terpenos. No entanto, no metabolismo vegetal, a rota biossintética de ambos os constituintes tem como origem a condensação de unidades de isopreno, que são de estruturas simples formadas por cinco carbonos (C<sub>5</sub>). Por este

motivo, os terpenos são classificados de acordo com o número de isoprenos presentes na cadeia carbônica, podendo ser chamados de monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), entre outros. Para os monoterpenos, existem três subgrupos importantes: acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. A classificação de cada um destes subgrupos pode ser feita de acordo com a presença de hidrocarboneto insaturado, alcoóis, aldeídos ou cetonas, lactonas e tropolona (SIMÕES et al., 2004; SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

O conhecimento dos óleos essenciais pelo homem tem origem na era pré-cristã, sendo utilizados desde a medicina antiga até os tempos atuais, principalmente nas áreas de cosmética, aromaterapia, perfumaria, indústria alimentícia e farmacêutica, dada a relativa baixa toxicidade e grande aceitação de mercado (NTALLI et al., 2010; AKIN; AKTUMSEK; NOSTRO, 2010). Neste contexto, inúmeros óleos essenciais têm sido descritos na literatura científica por suas propriedades anti-helmínticas, inclusive contra *H. contortus*, como por exemplo, os óleos essenciais das espécies *Croton zehntneri* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007), *Eucalyptus staigeriana* (MACEDO et al., 2010), *Cymbopogon martinii* e *Mentha piperita* (KATIKI et al., 2012), e *Lippia sidoides* (CARVALHO et al., 2012).

Dentre as famílias botânicas tipicamente importantes como anti-helmínticas, estão as escolhidas no âmbito deste trabalho, que se destacam: Asteraceae, Lamiaceae e Rutaceae. Com destaque para a atividade anti-helmíntica contra o parasita *H. contortus*, na família Asteraceae podem ser citadas as espécies *Aster lanceolatus* (FURTADO et al., 2011), *Artemisia anunua* (SQUIRES et al., 2011) e *Cichorium intybus* (FOSTER; CASSIDA; TURNER, 2011); na família Lamiaceae, as espécies *Leonotis ocymifolia* e *Leucas martinnicensis* (EGUALE; TADESSE; GIDAYA, 2011) e *M. piperita* (KATIKI et al., 2011); e por fim na família Rutaceae as espécies *Zanthoxylum rhoifolium* (PENELUC et al., 2009) e *Zanthoxylum zanthoxyloides* (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005).

Os exemplos acima nos fazem cercar de indícios coerentes de que as famílias escolhidas sejam pródigas quanto à oferta de gêneros e espécies de plantas importantes como anti-helmínticos. Alicerçados na originalidade científica e considerando as famílias botânicas citadas, as plantas escolhidas como fontes de óleos essenciais para este trabalho foram às espécies: *Baccharis trimera* Less, e *Anthemis nobilis* L. da família Asteraceae; *Mentha viridis* (L.), *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt, e *Thymus vulgaris* L. da família Lamiaceae; *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. e *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle da família Rutaceae, para as quais, apesar da alta potencialidade como anti-helmínticas, nada tem sido relatado cientificamente contra o parasita *H. contortus* tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*.

*B. trimera* (Asteraceae), conhecida como “carqueja”, é uma espécie vegetal muito popular e facilmente encontrada no Brasil. Na medicina popular é utilizada no tratamento de várias doenças gastrintestinais e hepáticas, destacando-se também pelas suas propriedades anti-helmíntica, anti-inflamatória e diurética, auxiliando no emagrecimento e, principalmente no controle do diabetes. Estudos comprovam sua popularidade no controle do diabetes (TROJAN-

RODRIGUES et al., 2012), a atividade anti-inflamatória e antioxidante exercida por compostos fenólicos extraídos (OLIVEIRA et al., 2012), analgésica (GENE et al., 1996), imunomoduladora (PAUL et al., 2009), e anti-helmíntica através de ensaios *in vitro* do óleo essencial que mostrou atividade contra o parasita *Schistosoma mansoni* (OLIVEIRA et al., 2012). As hastes da planta são usadas popularmente como anti-helmíntico. Ainda na família Asteraceae, a espécie *Anthemis nobilis* (Sinônimo *Chamaemelum nobilis* (L.) All.) (CARNAT et al., 2004), conhecida popularmente como “camomila romana”, tem indicações para problemas digestivos em geral, contra parasitas gastrintestinais, espasmos, e pela ação cicatrizante. Sua atividade é destacada pela multiplicidade de sua ação farmacológica, sendo também indicada pela ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiespasmótica e sedativa, ações estas ligadas à presença de terpenóides e flavonoides (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2011), e ainda a antioxidante, antitumoral (GUIMARÃES et al., 2013) e hipoglicemiante (EDDOUKS et al., 2005).

A espécie *M. viridis* (Lamiaceae), popularmente conhecida como “levante”, é bastante conhecida na medicina popular dada as suas propriedades anti-helmíntica, calmante e antiespasmótica, principalmente pelo uso das folhas. Entretanto, na literatura científica, nada foi encontrado de forma a validar suas propriedades anti-helmínticas. Contudo, muitos trabalhos evidenciam diversas atividades farmacológicas utilizando óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Mentha sp*, tal como aqueles que mostram o óleo de *M. piperita* (42,5% de mentol) (KATIKI et al., 2011) e o extrato aquoso de *M. villosa* (MACEDO et al., 2010) como sendo efetivos contra as diferentes fases de vida do *H. contortus*. O gênero ainda é rico em plantas com atividades antimicrobianas (TOROGLU, 2011), larvicidas (GOVINDARAJAN et al., 2012), citotóxicas e anticarcinogênicas (JAIN et al., 2011).

A espécie *L. officinalis*, também da família Lamiaceae, é conhecida popularmente como “alfazema”. A planta possui óleo essencial utilizado tradicionalmente desde o período romano, na forma de aromatizante, para limpezas em geral e como curativo. Toda a planta constituída pelas folhas, flores e hastes é utilizada popularmente pelas suas propriedades analgésica, anti-anêmica, anticonvulsivante e anti-helmíntica. O óleo essencial da espécie é composto principalmente por cineol, cumarina, geranol, eucaliptol, cânfora, entre outros. Existem estudos *in vitro* aplicados para o combate de fungos, principalmente da espécie *Phytophthora infestans* que ataca plantações de tomate (SOYLU; SOYLU; KURT, 2006), aqueles de atividade larvicida contra a espécie *Aedes albopictus* (CONTI et al., 2010), os do efeito diurético pelo uso de infusão das flores (ELHAJILI et al., 2001), e da ação depressora do sistema nervoso central (HUANG et al., 2008), sem que entretanto, seja conhecida validação científica para a atividade anti-helmíntica. Finalmente na família Lamiaceae, a *T. vulgaris* popularmente conhecida como “tomilho”, é tradicionalmente utilizada como anti-helmíntico, antiespasmódico, antitérmico e antisséptico, sendo todas as partes da planta utilizadas. Em sua análise fitoquímica foram encontrados vários constituintes, sendo o óleo essencial rico em timol, carvacrol, *o*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, cariofileno (LI et al., 2011). Tais constituintes possuem atividades inseticida e larvicida (ZHU et al., 2006), antimicrobiana (ABU-

DARWISH et al., 2012), antifúngica (SEGVIC et al., 2007), e citotóxica (SERTEL et al., 2011), com destaque para o timol em relação à atividade anti-helmíntica contra *H. contortus* (CARVALHO et al., 2012).

Na família Rutaceae, *C. sinensis* e *C. aurantifolia* são conhecidas respectivamente pela população como “laranja-doce” e “limão-taití”. São tradicionalmente usadas na alimentação diretamente ou como condimento, produção de bebidas caseiras e industriais, e preparo de doces, possuindo por isso grande importância no mercado agrícola brasileiro. Na medicina popular são indicadas para o tratamento contra vermes gastrintestinais de seres humanos, como um nutracêutico da dieta alimentar dado o alto conteúdo de vitaminas, como bactericidas, anti-inflamatórios e antitérmicos, dentre outras indicações. Principalmente de seus frutos e folhas são extraídos óleos essenciais de grande importância, por serem, de uma forma geral, ricos em limoneno, 1,8-cineol,  $\beta$ -pineno e  $\gamma$ -terpineno. Neste sentido, estudos comprovam a ação antibacteriana (BOURGOU et al., 2011), inseticida (KUMAR et al., 2012), antioxidante (LOIZZO et al., 2012) e anticancerígena para as referidas plantas (MEIYANTO; HERMAWAN; ANINDYAJATI, 2012). Estudos recentes mostram atividade anti-helmíntica inibindo de 90 á 100% a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar do parasita *H. contortus* para *C. sinensis* (GAINZA et al., 2015).

**Figura 2:** Espécies vegetais elencadas para os experimentos deste trabalho:

A – *Baccharis trimera* (“carqueja”); B – *Anthemis nobile* (“camomila-romana”); C – *Mentha viridis* (“levante”); D – *Lavandula officinalis* (“alfazema”); E – *Thymus vulgaris* (“tomilho”); F – *Citrus sinensis* (“laranja-doce”); G – *Citrus aurantifolia* (“limão-taití”).



**Fonte:** Arquivo pessoal Luis Eduardo Ferreira; Imagem B: [www.plantasquecuram.com.br](http://www.plantasquecuram.com.br)

Finalmente e tendo por conta as argumentações acima, é pertinente reafirmar que as escolhas das plantas para oferta de óleos essenciais, tão bem como a escolha dos próprios óleos como entidades de estudo, se cercam de um arranjo estratégico geral bem definido, suportado principalmente por informações etnofarmacológicas e quimiotaxonômicas de relevância. Dado o fato das plantas escolhidas serem de grande importância, sobretudo no Brasil, é justificado o estudo de suas ações farmacológicas, inclusive aquelas anti-helmínticas de interesse humano ou ainda veterinário.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi o de avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de plantas das famílias Asteraceae (*Baccharis trimera*, e *Anthemis nobile*), Lamiaceae (*Mentha viridis*, *Lavandula officinalis* e *Thymus vulgaris*) e Rutaceae (*Citrus sinensis* e *Citrus aurantifolia*), bem como a realização da análise química completa dos mesmos para estabelecimento da relação entre constituição química e a atividade farmacológica observada.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar a análise química completa para identificação dos constituintes presentes através de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de todos os óleos essenciais das espécies vegetais elencadas para o trabalho;
- Avaliar através de ensaios *in vitro*, a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais na inibição da eclosão de ovos, inibição da motilidade larvar e inibição da viabilidade dos parasitas adultos do isolado resistente de *H. contortus* (Embrapa2010);
- Tendo como base a análise constitutiva de cada óleo essencial, adquirir comercialmente o constituinte majoritário do óleo de melhor desempenho farmacológico *in vitro* para realização de novos ensaios a fim de estabelecer uma relação da composição do óleo e atividade farmacológica observada;
- Com base na avaliação do desempenho farmacológico a partir dos resultados nos ensaios *in vitro*, selecionar o melhor óleo essencial para efetuar ensaios *in vivo* com ovinos infectados mono-especificamente com o isolado resistente *H. contortus* (Embrapa2010).

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Óleos essenciais

#### 3.1.1. Coleta das plantas, identificação taxonômica e obtenção dos óleos e constituintes químicos

Algumas das espécies vegetais foram coletadas na microrregião de Ribeirão Preto-SP, mais especificamente no Sítio Terra de Ismael, localizado no Município de Jurucê-SP (Latitude

21°04'12,5"; Longitude 47°04'08,0"; Altitude 545 metros), onde sob tutela da UNAERP, uma fazenda de plantas medicinais é mantida para uso de nossa Unidade de Biotecnologia. Exsiccatas de partes ou todo de cada uma das espécies de *B. trimera* e *M. viridis* foram preparadas para completa identificação botânica feita pela Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira (Unidade de Biotecnologia-UNAERP). Após os tombos, amostras de cada planta foram depositadas no herbanário da UNAERP para consulta pública sob vouchers nº 1715 (*B. trimera*) e 1784 (*M. viridis*). Para tais plantas, cujos óleos essenciais foram processados em nossa Unidade, folhas e hastes de *B. trimera* e folhas de *M. viridis* foram coletadas no período de março a maio de 2013. Para o método de extração por hidrodestilação foi utilizado um extrator em aço inox de proporção/escala semi-industrial da marca Linax, modelo D20-Gás, com capacidade para 10 kg de folhas secas, e dimensões 480 mm de diâmetro X 750 mm de altura. Foram utilizados 10 kg de cada um dos vegetais secos. As extrações foram divididas em partidas utilizado apenas 2 kg de cada vegetal por vez para obtenção de maior rendimento da extração. Após 5 horas de extração, os óleos essenciais foram coletados, e, após o remanescente aquoso ter sido removido manualmente, os mesmos foram armazenados em frascos lacrados/âmbares sob temperatura de -20°C até sua posterior utilização.

Alguns dos óleos essenciais foram adquiridos comercialmente da empresa “Kampo de Ervas” em quantidades já satisfatórias para execução de todo o trabalho experimental. Os óleos obtidos foram processados industrialmente por hidrodestilação a partir da flor de *A. nobile* e *L. officinalis*, folhas de *T. vulgaris*, e cascas de *C. sinensis* e *C. aurantifolia*. Os óleos foram adquiridos acompanhados de laudo técnico assinado pelo responsável agrônomo Ademar Mendez Jr (CREA 5060000803), contendo código de rastreabilidade do número de lote, certificado de pureza, data de extração e informações sobre as principais características físico-químicas (vide apêndice A).

Posteriormente, com base na análise constitutiva do óleo essencial de melhor desempenho nos ensaios *in vitro*, o timol foi adquirido comercialmente a fim de estabelecer uma relação entre composição do óleo de interesse e atividade farmacológica observada. Este composto foi adquirido em sua forma sólida orgânica da empresa Neon Comercial Ltda (São Paulo – SP, Brasil) ref. nº 3692, lote nº 18467 (vide apêndice B) para realização dos ensaios respeitando a proporcionalidade de sua concentração percentual identificada no óleo de interesse (*T. vulgaris*).

### **3.1.2. Análises dos constituintes químicos dos óleos por CG-EM**

Uma amostra de cada um dos óleos em estudo foi submetida à análise para identificação dos constituintes químicos através de Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), com a colaboração da Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini (Unidade de Biotecnologia – UNAERP). Brevemente, o equipamento utilizado foi da marca Varian, Saturn 2100T, nas seguintes condições de uso: Coluna capilar: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); Injetor: 240 0C; Detector: 230 0C; Impacto de Elétrons: 70 eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,0 mL/min.; Split: 1/20;



Programa de Temperatura: 60°C – 240°C, 3°C/minuto; Volume de Injeção: 1 µL de cada óleo separadamente. A identificação dos compostos presentes em cada óleo foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62 lib.) e índice de retenção de kovats (ADAMS, 1995).

### **3.2. Aquisição e manutenção de animais infectados por *H. contortus* para os ensaios *in vitro* e *in vivo***

Os animais utilizados para doação de fezes para os ensaios *in vitro* e aqueles usados nos ensaios *in vivo* foram ovinos machos, pertencentes à raça Santa Inês, com peso entre 20-30 kg, idade variando entre 4-6 meses, e adquiridos de propriedades rurais localizadas na microrregião da cidade de Ribeirão Preto – SP. Assim que obtidos, todos os animais foram vermifugados pelo uso do medicamento Zolvix® - Novartis Animal Health (Monepantel; 2,5 mg/kg PV), e, logo após, mantidos em uma baia (previamente limpa e higienizada) até a completa redução da carga parasitária, se anteriormente existente.

Os animais foram mantidos nas instalações específicas para ovinos da Fazenda Experimental da Unaerp (Ribeirão Preto-SP), estando disponíveis água e alimentação *ad libitum* composta por ração e feno durante dois períodos diários. O acompanhamento clínico e sanitário dos animais foi realizado pela veterinária e colaboradora Dra. Pamela Rodrigues Reina Moreira (CRMV 18769) (Á época dos experimentos: Veterinária Responsável pelo Biotério da Unidade de Biotecnologia – UNAERP). Todos os procedimentos experimentais envolvendo o uso destes animais foram aprovados junto ao Comitê de Ética da Unaerp protocolado sob número 042/2012 (vide apêndice C), seguindo legislação e recomendação de órgãos competentes para o uso de animais de laboratório.

#### **3.2.1. Infecção artificial mono-específica com *H. contortus***

A Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos-SP), através de colaboração estabelecida com a Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, gentilmente forneceu larvas L<sub>3</sub> do isolado resistente *H. contortus* Embrapa2010, para que a infecção artificial mono-específica dos animais fosse realizada, e um banco de larvas infectantes fosse mantido para todos os testes desse estudo. Assim, um único e específico tipo de cultura de helmintos foi utilizado em todos nossos experimentos, conforme recomendações da área. Segundo Chagas et al. (2013) esta cepa é resistente aos anti-helmínticos das classes dos benzimidazóis, lactonas macrocíclicas e imidotiazóis.

A infecção artificial mono-específica foi realizada pela inoculação oral de uma solução aquosa contendo aproximadamente 4000 larvas L<sub>3</sub> de cultura específica de *H. contortus* (Embrapa2010) nos ovinos previamente vermifugados. Após um período de incubação variando entre 28-30 dias da infecção artificial, os animais mantidos em baias preparadas e higienizadas foram submetidos a novos testes parasitológicos de contagem de ovos por gramas de fezes

(OPG), a fim de confirmar a infecção. Os animais considerados parasitologicamente eficientes como doadores de fezes para os ensaios *in vitro* e a serem usados nos ensaios *in vivo* foram aqueles que apresentaram OPGs variando entre 1500 a 5000 ovos/g de fezes.

### 3.2.2. Manutenção do banco de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*

Para a manutenção do banco de larvas L<sub>3</sub>, foram realizadas coproculturas rotineiramente, conforme metodologia descrita por Ueno e Gonçalves (1998). Brevemente, 20 gramas das fezes coletadas diretamente da ampola retal de ovino já infectado foram homogeneizadas em pó de maravalha estéril e umedecida. Após um período de sete dias, em condições ótimas de incubação ambiente, o material contido em um béquer foi invertido em placa de petri com quantidade suficiente de água morna (37°C). As larvas de *H. contortus* no terceiro estágio (L<sub>3</sub>) foram coletadas através de migração espontânea, e mantidas em frasco de cultura celular com ventilação e armazenadas em geladeira.

### 3.3. Ensaios *in vitro*

#### 3.3.1. Ensaio de inibição da eclosão de ovos

Seguindo a metodologia de Coles et al. (1992), aproximadamente 20 gramas de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de animal mono-parasitado por *H. contortus* (Embrapa2010). O material colhido foi macerado e filtrado em água corrente aquecida (40°C) por meio de um arranjo de tamises sobrepostos (500; 150; 90 e 20 µm). Os ovos retidos no último tamis foram lavados e centrifugados por 5 minutos a 1811xg com água destilada, e em seguida, recuperados com solução salina supersaturada, que permite a flutuação do conteúdo de ovos por meio de flotação simples. Após a recuperação, os ovos foram acondicionados no tamis de 20 µm para lavagem com água destilada abundante, de modo a gerar uma solução aquosa final de ovos. Suspensões aquosas (100 µL) contendo aproximadamente 100 ovos de *H. contortus* foram distribuídas em placas de cultura 24 poços e adicionados dos diferentes óleos essenciais em diferentes concentrações para formulação das curvas dose-resposta.

As faixas de concentrações dos óleos essenciais das espécies *C. aurantifolia*, *C. sinensis*, *A. nobile*, *T. vulgaris*, *L. officinalis*, *M. viridis*, e *B. trimera* seguiram diluições seriadas de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195; 0,097 mg/mL, utilizando uma solução aquosa de tween 80 (3%) como diluente. O volume final de cada poço foi o de 0,5 mL. Posteriormente, com base na avaliação dos resultados *in vitro* para a escolha do melhor óleo essencial, o timol foi identificado como constituinte majoritário do óleo de melhor desempenho anti-helmíntico *in vitro* (*T. vulgaris*) (50,22%), sendo testado nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195; 0,097; 0,048 mg/mL.

Após 24 horas de incubação (27°C) foram feitas as contagens de ovos e larvas de primeiro estágio (L<sub>1</sub>) em microscopia óptica invertida, conforme proposto pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.) e descrito detalhadamente em Powers et al.

(1982). O resultado final foi dado em porcentagem da média ponderada e desvio padrão de três réplicas experimentais independentes realizadas em quintuplicata para cada tratamento, acompanhadas pelos controles. O controle positivo foi tiabendazol 25 µg/mL e o negativo foi à solução aquosa de Tween 80 3% (v/v). Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da eclosão de ovos num comparado entre controles negativo, positivo e grupos experimentais.

### 3.3.2. Ensaio de inibição da motilidade larvar

Após a realização da coprocultura (UENO; GONÇALVES, 1998) e recuperação das larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>), suspensões aquosas (100 µL) contendo aproximadamente 100 larvas foram distribuídas em placas de micro-titulação e adicionadas dos diferentes óleos essenciais em diferentes concentrações para formulação das curvas dose-resposta. As faixas de concentrações de todos os óleos essenciais e do timol foram exatamente as mesmas do teste de eclodibilidade de ovos, num volume final de 0,2 mL/poço.

Após 24 horas de incubação (27°C) das larvas para cada um dos óleos essenciais e timol nas diferentes concentrações, foram feitas as contagens de larvas móveis e imóveis em microscopia comum. O resultado final foi dado em porcentagem da média ponderada e desvio padrão de três réplicas experimentais independentes realizadas em quintuplicata para cada tratamento, acompanhadas dos controles positivo com levamisol 2% (20 mg/mL) e negativo com solução aquosa de Tween 80 3% (v/v). Os dados foram expressos como porcentagem de larvas imóveis num comparado entre controle negativo, positivo e grupos experimentais.

### 3.3.3. Ensaio de viabilidade dos parasitas adultos

O ensaio foi desenvolvido segundo a metodologia proposta por Hounzangbe-Adote et al. (2005). Os parasitas adultos de *H. contortus* foram coletados manualmente e diretamente do abomaso de animais infectados mono-especificamente. Os animais foram necropsiados de acordo com o protocolo aprovado no Comitê de Ética de nossa Instituição (vide apêndice C). Carneiros apresentando valores de OPG elevados (> 3000 ovos/g de fezes) foram mantidos em jejum durante 24 horas antes do sacrifício, feito pelo método de sensibilização mecânica seguido de sangria. Imediatamente após a morte do animal, todo sistema digestivo foi removido para facilitar a localização do abomaso, que uma vez isolado e pinçado foi removido com o uso de tesoura cirúrgica. O órgão, devidamente mantido em caixa de isopor previamente preparada para o transporte, foi imediatamente conduzido ao nosso biotério e aberto em bandejas plásticas apropriadas. Em seguida, o órgão aberto foi lavado cuidadosamente com solução salina a 37°C para remoção do conteúdo intestinal remanescente e coleta manual dos parasitas adultos.

Após o término da recuperação de vermes e utilizando placas de 12 poços, 5 parasitas adultos foram inseridos em cada poço contendo 1 mL da diluição dos diferentes óleos essenciais ou timol em solução PBS + Antibiótico 4% (solução estabilizada penicilina-estreptomicina - Sigma P4333). Durante todo o experimento, as placas foram mantidas em estufa sob temperatura

controlada (37°C) e a contagem dos parasitas adultos móveis e imóveis foi realizada a cada intervalo de duas horas. O tempo total do experimento foi definido como sendo quando o controle negativo apresentasse morte considerável de parasitas (24 hs).

Apenas os óleos que tiveram melhor atividade anti-helmíntica nos ensaios de inibição de eclodibilidade de ovos e inibição da motilidade larvar foram escolhidos para os testes com vermes adultos. As faixas de concentrações dos óleos essenciais das espécies *C. aurantifolia*, *C. sinensis*, *A. nobile*, *T. vulgaris*, *L. officinalis* e *M. viridis*, definidas com base no desempenho de ação nos ensaios anteriores, foram 50; 5,0; e 0,5 mg/mL, utilizando como diluente uma solução PBS com tween 80 (2%, v/v) para um volume final de 1 mL em cada poço. As concentrações de timol foram 25; 2,5; 0,25 mg/mL.

O resultado final foi dado pela média ponderada e desvio padrão de três réplicas experimentais independentes realizadas em quintuplicata. O controle positivo foi levamisol 2% (20 mg/mL). Dois controles negativos foram utilizados, sendo um com solução PBS com penicilina e estreptomicina 4% + Tween 80 (2% v/v), e outro com solução PBS com penicilina e estreptomicina 4% na ausência de Tween 80 (2% v/v). Os dados foram expressos como porcentagem de parasitas viáveis num comparado entre controle negativo, positivo e grupos experimentais.

### **3.4. Ensaios *in vivo***

O ensaio foi realizado segundo técnicas de manejo validadas pelo Centro de Pesquisas Agropecuárias da EMBRAPA Pecuária Sudeste sob co-orientação da Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, e descritas em Domingues et al. (2013). Durante os experimentos, foram utilizados 30 carneiros com as mesmas características já apresentadas acima, mantidos na Fazenda Experimental da Unaerp (Ribeirão Preto-SP) estando disponíveis de alimentação composta por ração e feno durante um período diário e água "*ad libitum*". Conforme já descrito na metodologia, todos os animais foram previamente vermifugados, e em seguida, infectados mono-especificamente por *H. contortus*, de modo a obter um plantel de animais com carga parasitária homogênea. A confirmação da infecção dos animais pelo parasita *H. contortus* foi feita pelo método do OPG para o monitoramento da carga parasitária de todos os animais durante os três dias consecutivos anteriores ao início do experimento. Em seguida, os animais foram randomizados e distribuídos em grupos (n=6) baseados na carga parasitária e peso.

Todo experimento perdurou por 14 dias consecutivos, com exames de OPG sendo feitos em amostras de fezes coletadas dos animais nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14. Exames clínico-veterinários foram feitos diariamente avaliando parâmetros como mucosa conjuntiva (método Famacha), qualidade da pelagem, escore corporal, e análise comportamental de cada animal. Nos dias 0, 7, 14 foram avaliados os pesos de cada animal e amostras de sangue foram coletadas nos dias 0 e 14 para realização de exames laboratoriais completos de hemograma (contagem de hemácias, hematócrito, dosagem de hemoglobina e contagem de leucócitos), e série bioquímica

composta de dosagens de ureia, creatinina, ALT / TGP (transaminase glutâmico pirúvica), AST / TGO (transaminase glutâmico oxalacética) (vide apêndice D).

A escolha do óleo essencial para realização dos ensaios *in vivo* foi condicionada a avaliação dos resultados dos ensaios *in vitro*. Neste critério, o óleo essencial de *T. vulgaris* foi selecionado para ser avaliado nas dosagens 300; 150; e 75 mg/kg sendo administrados por via oral nos dias 0, 6 e 12 do experimento. Como controle positivo foi utilizado o medicamento anti-helmíntico comercial Zolvix® (monepantel; 2,5 mg/kg PV) e como controle negativo foi utilizada solução salina (1 mL/kg).

O resultado final foi dado pelas médias ponderadas das triplicatas dos resultados dos exames parasitológicos (OPG) de cada animal seguido das médias ponderadas dos animais de cada grupo e desvio padrão, num comparado entre controle negativo, positivo e grupos experimentais.

### 3.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas das médias ponderadas dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizadas utilizando o teste de ANOVA seguido do teste de média Tukey ( $p < 0,05$ ). O cálculo da concentração mínima para inibição de 50% ( $IC_{50}$ ) da eclodibilidade de ovos e motilidade larvar foi feito por meio de regressão não linear e distribuição logarítmica. Todas estas análises foram realizadas usando o Programa GraphPad PRISM 5.01 (EUA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção dos óleos essenciais das espécies vegetais escolhidas consistiu na fase inicial de nosso trabalho. Nesta etapa, o método de hidrodestilação com arraste a vapor foi o processo escolhido para extração dos óleos essenciais, por ser um método clássico. Sendo assim, os óleos essenciais das espécies *M. viridis* e *B. trimera* foram respectivamente obtidos com rendimentos de 43,38 gramas (55 mL), e 5,35 gramas (6 mL). Alternativamente, os óleos essenciais das espécies vegetais como *A. nobilis*, *L. officinalis*, *T. vulgaris*, *C. sinensis*, e *C. aurantifolia* foram adquiridos comercialmente, pois na prática, isso otimizou o processo experimental e permitiu a obtenção de quantidades suficientes dos óleos para realização de todos os ensaios propostos, evitando assim, sucessivas extrações e o uso de partidas diferentes de óleos essenciais em experimentos diferentes. A obtenção dos óleos essenciais das últimas plantas por meio de hidrodestilação em nossa Unidade se mostrou pouco efetiva e de baixo rendimento, apesar das inúmeras tentativas e esforços.

As análises dos constituintes químicos de cada um dos óleos essenciais foram realizadas pelo método de Cromatografia à Gás Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Os resultados estão apresentados abaixo na tabela 1, onde estão representadas as porcentagens relativas de cada um dos compostos voláteis identificados, bem como os respectivos índices de retenção (IR).

**Tabela 1:** Análise dos constituintes químicos identificados por Cromatografia à Gás Acoplada a Espectrometria de Massas: IR = Índice de Retenção

Valores em Porcentagem (%) dos Compostos Voláteis Identificados no CG-EM									
Compostos	IR Calculado	IR Literatura	<i>Baccharis trimera</i>	<i>Anthemis nobilis</i>	<i>Lavandula officinalis</i>	<i>Mentha viridis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>
Agarofurano <α->	1550	1550	0,90						
Agarospírol	1648	1648	1,25						
Amorfa-4,9-dien-2-ol	1692	1700	1,12						
Amorfeno <α->	1486	1484	1,23						
Amorfeno <γ->	1496	1495	2,12						
Amorfeno <δ->	1511	1512	1,41						
Acetato de amila	927	914		0,10					
Artemisia cetona	1063	1062		5,84					
Bisaboleno <β->	1505	1505							0,89
Borneol	1173	1169		0,18	2,14				
Bournoneno <β->	1380	1388				0,19			
Acetato de butila	813	811		1,11	0,80				
Cadalenol	1675	1676	1,17						
Cadina-1(6),4-dieno <cis->	1459	1463	0,33						
Cadina-1,4-dieno <trans->	1535	1534	0,29						
Cadineno <γ->	1517	1513	13,13						
Cadineno <δ->	1517	1523				0,27			
Cadinol <α->	1656	1654	1,65						
Calacoreno <α->	1540	1545	2,77						
Calacoreno <β->	1562	1565	1,09						
Calameno <trans->	1520	1522	0,30						
Calamenen-10-ol <trans->	1666	1669	0,32						
Camfeno	949	954		0,52	0,18				
Camfor	1148	1146			5,54		1,48		
Carotol	1594	1594				6,02			
Cariofila-4(12),8(13)-dien-5α-ol ou 5β-ol	1638	1640	0,70						
Cariofileno <(E)->	1416	1419	6,08		2,37	4,85			
Cariofileno <14-hidroxi-9-epi-(E)->	1672	1669	0,60						
Cariofileno oxido	1581	1583	6,87			0,46			
Cedrenal <1,7-diepi-α->	1635	1641	1,22						
Cineol <1,8->	1032	1031		3,97	4,87	0,21			
Copaeno <β->	1432	1432	0,98						
Corocaleno <α->	1617	1623	1,77						
Cubebeno <β->	1384	1388	0,61						
Cubenol	1645	1646	0,73						
Cubenol <1,10-di-epi>	1609	1619	2,03						
Ciclohexanona <3-metil->	936	952		0,62					
Ciclosativeno	1372	1371	2,22						
Cimeno <p->	1014	1024					23,76		4,17
Dauca-4(11),7-dieno <trans->	1548	1557	0,27			2,55			
Dauca-5,8-dieno	1472	1472	3,14						
Dihidroagarofurano <cis->	1521	1520				0,47			
Duprezianeno <β->	1415	1422					2,03		
Elemeno <γ->	1435	1436	0,51						
Butanoato de etila	850	804		0,41	4,08				
Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	1686	1688	1,63						

<b>Compostos</b>	<b>IR Calculado</b>	<b>IR Literatura</b>	<b>Baccharis trimera</b>	<b>Anthemis nobilis</b>	<b>Lavandula officinalis</b>	<b>Mentha viridis</b>	<b>Thymus vulgaris</b>	<b>Citrus sinensis</b>	<b>Citrus aurantifolia</b>
Eudesmol <α>	1656	1653				2,38			
Eudesmol <γ>	1633	1632				0,83			
Fencheno <α>	944	952					0,66		
Fenebreno <α>	1402	1402	0,70						
Acetato de furfurila	993	990		0,61					
Germacreno A	1505	1509	0,27						
Guaiadieno <6,9>	1443	1444	0,16						
Gurjuneno <β>	1427	1433	0,52						
Propanoato de hexila	1103	1101		0,25					
Humeleno <α>	1453	1454	1,11			0,26			
Intermedeol <neo>	1660	1660	1,66						
Angelato de isoamila	1146	1146		15,27					
Isobutirato de isoamila	1014	1009		2,73					
Isoborneol	1164	1160			0,30		1,14		
Angelato de isobutila	1048	1051		29,26					
Isobutirato de isobutila	912	911		3,93					
Tiglato e isobutila	1093	1090		0,71					
Isolemicina <(z)>	1573	1573	0,25						
Acetato de isopentila	875	876			0,42				
Junenol	1622	1619	0,55						
Kessano	1525	1530	0,14						
Acetato de lavandulina	1283	1290			0,77				
Limoneno	1029	1029			0,52	0,15		89,86	56,37
Linalol	1086	1096					4,75		
Acetato de linalina	1248	1257			35,97	58,21			
Menta-2,4(8)-dieno <p>	1086	1088			0,24				
Metil benzil butirato	1365	1365	0,41						
Muurolo-3,5-dieno <cis>	1446	1450	0,35						
Muurolo-4(14),5-dieno <cis>	1469	1466	0,64						
Muurolo-4(14),5-dieno <trans>	1489	1493	1,43						
Muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1627	1631	1,91						
Muurolo <α>	1500	1500	0,46						
Muurolo <γ>	1478	1479	6,83			2,08			
Muurolo <α>	1643	1646	0,69						
Mirceno	989	988			0,16		0,92	0,92	0,67
Mirtenol	1197	1195		0,77					
Ocimeno <(E)-β>	1046	1050			0,74				
Ocimeno <(Z)-β>	1035	1037			0,56				
Ocimeno <allo>	1128	1132			0,61				
Octanol <3>	1002	991		0,56					
Oplopenona <β>	1604	1607	0,81						
Palustrol	1567	1568	0,79						
Patchouleno <α>	1456	1456	0,41						
Isobutanoato de pentila	1040	1055		0,53					
Pineno <α>	931	939					1,73		
Pineno <β>	976	979							11,86
Pinocamfeol	1169	1170			0,31				
Pinocamfona <cis>	1177	1175		0,37		0,16			
Pinocarvona	1163	1164		3,15					
Piperitenona	1343	1343	0,73						

<b>Compostos</b>	<b>IR Calculado</b>	<b>IR Literatura</b>	<b>Baccharis trimera</b>	<b>Anthemis nobilis</b>	<b>Lavandula officinalis</b>	<b>Mentha viridis</b>	<b>Thymus vulgaris</b>	<b>Citrus sinensis</b>	<b>Citrus aurantifolia</b>
Sabineno	977	975		6,27	0,22			0,27	
Sabineno hidrato <cis->	1021	1070					1,21		
Sabineno hidrato <trans->	1101	1098			29,17	13,07			
Sabineno hidrato acetato <cis->	1222	1221			0,14				
Sabinol <trans->	1141	1142		4,47					
Salvial-4(14)-en-1-ona	1592	1594	1,20						
Selineno <α->	1499	1498	0,32						
Selineno <β->	1493	1490	1,93						
Silfiperfol-6-eno	1380	1379	0,16						
Spatulenol	1576	1578	5,19						
Tagetona <(Z)->	1143	1152					0,52		
Terpinen-4-ol	1181	1177			0,74				
Terpineno <γ->	1050	1059					6,00		11,42
Terpineol <trans-β->	1163	1163					1,00		
Terpineol <γ->	1197	1199			0,85	0,37			
Tujeno <α->	932	930		8,92	0,31			0,68	2,85
Tujopsan-2-α-ol	1585	1587	1,79						
Tujopsenal <cis->	1702	1709	0,20						
Tujopseno <cis->	1428	1431							1,20
Timol	1291	1290	0,14				50,22		
Verbeneno	971	967							1,74
Vetiveneno <β->	1555	1555	0,63						
Zonareno	1531	1529	0,41						
<b>TOTAL (%)</b>			<b>91,21</b>	<b>90,54</b>	<b>91,99</b>	<b>92,53</b>	<b>95,42</b>	<b>91,73</b>	<b>91,17</b>

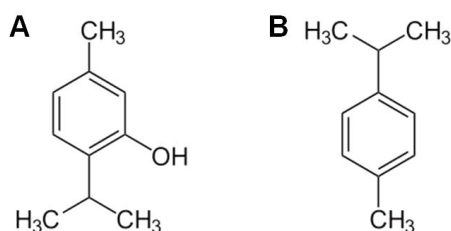
Quanto aos constituintes químicos apresentados na tabela 1, podemos notar que alguns dos compostos voláteis identificados aparecem, de um modo geral, como majoritários, ou também em comum entre as diferentes espécies sob estudo, podendo estas, serem ou não da mesma família. Dessa forma, de um modo mais detalhado, podemos citar alguns exemplos. O limoneno foi identificado como majoritário tanto na espécie *C. sinensis* (89,86%) como na *C. aurantifolia* (56,37%), inclusive por ser característico em espécies do gênero *Citrus* (BOURGOU et al., 2011). No entanto, mesmo em baixas concentrações, o limoneno foi identificado também nos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae como *L. officinalis* (0,52%) e *M. viridis* (0,15%). Da mesma forma, o linalool acetato é um constituinte comum e majoritário entre plantas da família Lamiaceae, principalmente no gênero *Lavandula* (ZHELJAZKOV et al., 2013) tal como foi identificado nas espécies *L. officinalis* (35,97%) e *M. viridis* (58,21%). Neste contexto, o trans-sabineno hidratado é também típico de plantas da família Lamiaceae (SCHMIDT et al., 2012), tal como foi identificado nas espécies *L. officinalis* (29,17%) e *M. viridis* (13,07%). Por fim, outros constituintes em comum entre as espécies são o cariofilleno <(E)>, encontrado nas espécies *B. trimera* (6,08%), *M. viridis* (4,85%) e *L. officinalis* (2,37%) (BOUNIHI et al., 2013); e o γ-terpineno, identificado tanto na espécie *C. aurantifolia* (11,42%) como na espécie *T. vulgaris* (6,00%) (PARK; KOO; KIM, 2012).



Dentre os constituintes de maior importância para nossos objetivos, merecem maior consideração aqueles cuja atividade anti-helmíntica já tenha sido demonstrada na literatura científica. O 1,8-cineol, por exemplo, é um terpeno identificado nas espécies *A. nobilis* (3,97%), *L. officinalis* (4,87%) e *M. viridis* (0,21%). É conhecido por ser eficiente contra a fase de ovo e larva do parasita *H. contortus* (ZHU et al., 2013). Da mesma forma o timol, constituinte identificado no óleo essencial das espécies *B. trimera* (0,14%) e *T. vulgares* (50,22%), foi também identificado no óleo de *Lippia sidoides* por Camurça-Vasconcelos et al. (2007) e Carvalho et al. (2012), apresentando atividade anti-helmíntica eficaz em testes contra ovo e larva do parasita *H. contortus*. Isso mostra que as plantas escolhidas em nosso trabalho são ricas em compostos já conhecidamente pródigos para atividade anti-helmíntica, incluindo a atividade contra *H. contortus*.

Os óleos essenciais aqui estudados apresentam grande diversidade de compostos, o que representa um vasto repertório de biomoléculas ativas de grande interesse biotecnológico. Isto permite o estabelecimento teórico de uma biblioteca química natural para estudos de correlação estrutura-atividade (STANIEK et al., 2013). Neste sentido ainda, de acordo com as estruturas moleculares vistas em Adams (1995), podemos observar algumas semelhanças e/ou diferenças entre alguns dos compostos identificados. Por exemplo, os monoterpenos timol (2-isopropil-5-metil-fenol) (figura 3A) e p-cimeno (1-Metil-4-(1-metiletil)-benzeno) (figura 3B), ambos constituintes presentes no óleo de *T. vulgaris*, apresentam um anel aromático em sua estrutura molecular, e se diferenciam apenas pela presença de um radical hidroxila no anel benzênico. Em se tratando da correlação estrutura-atividade específica tais semelhanças e/ou diferenças nas estruturas moleculares podem resultar em diferenças e semelhanças quanto ao mecanismo de ação de tais compostos, na medida em que respectivamente, receptores farmacológicos diferentes ou iguais podem ser acessados nas diferentes fases de vida do parasita.

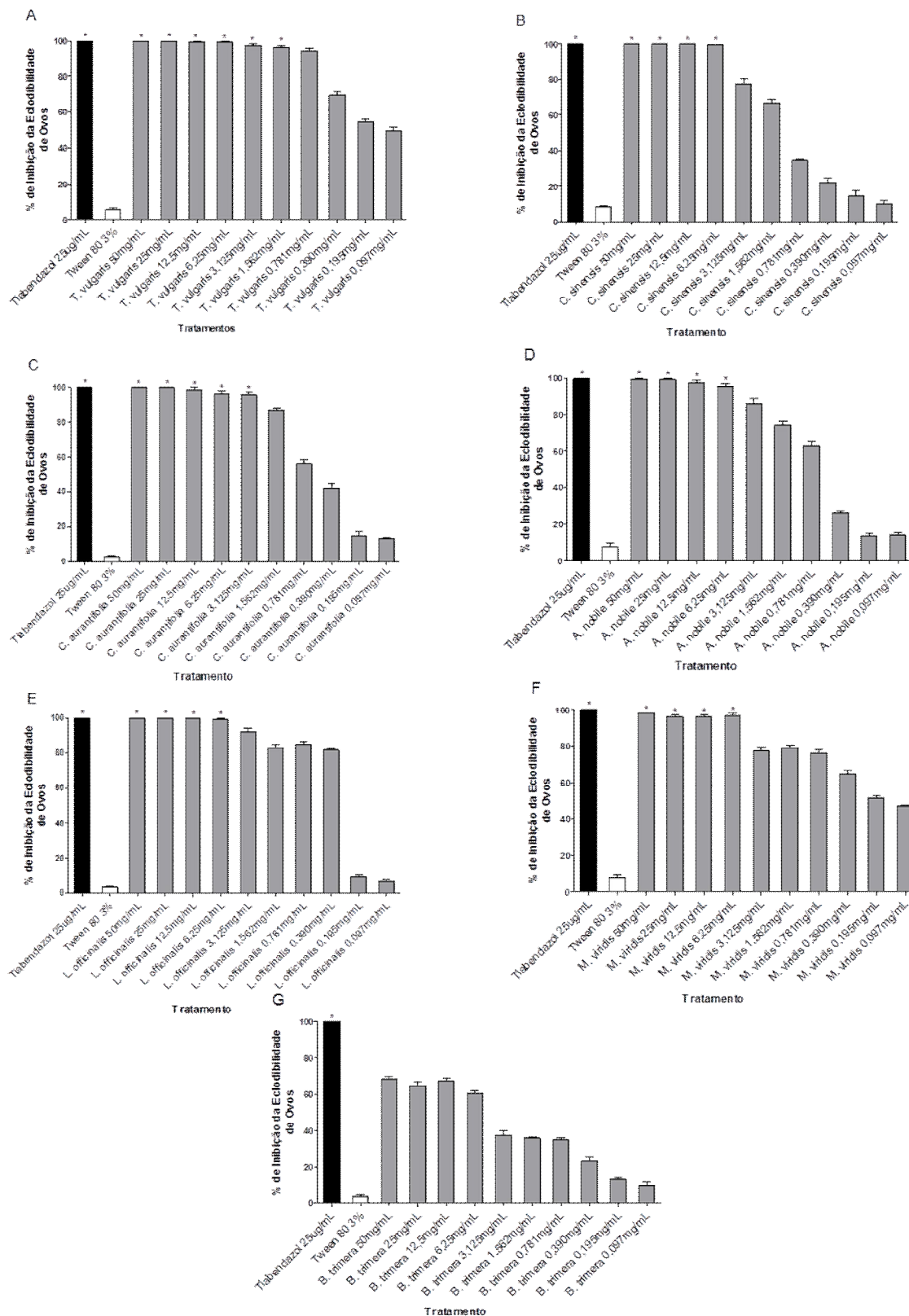
**Figura 3:** Estruturas moleculares: A – Timol; B – p-Cimeno.



**Fonte:** Adams, 1995.

Após a análise de identificação dos constituintes presentes em cada óleo, a etapa seguinte do nosso trabalho consistiu na realização dos ensaios *in vitro* para avaliação da atividade anti-helmíntica na inibição da eclosão de ovos, inibição da motilidade larvar e, de modo condicionado aos primeiros resultados, inibição da viabilidade dos parasitas adultos de *H. contortus*. Diante disto, os resultados obtidos nos ensaios de inibição da eclosão de ovos para todos os óleos estão exibidos na figura 4:

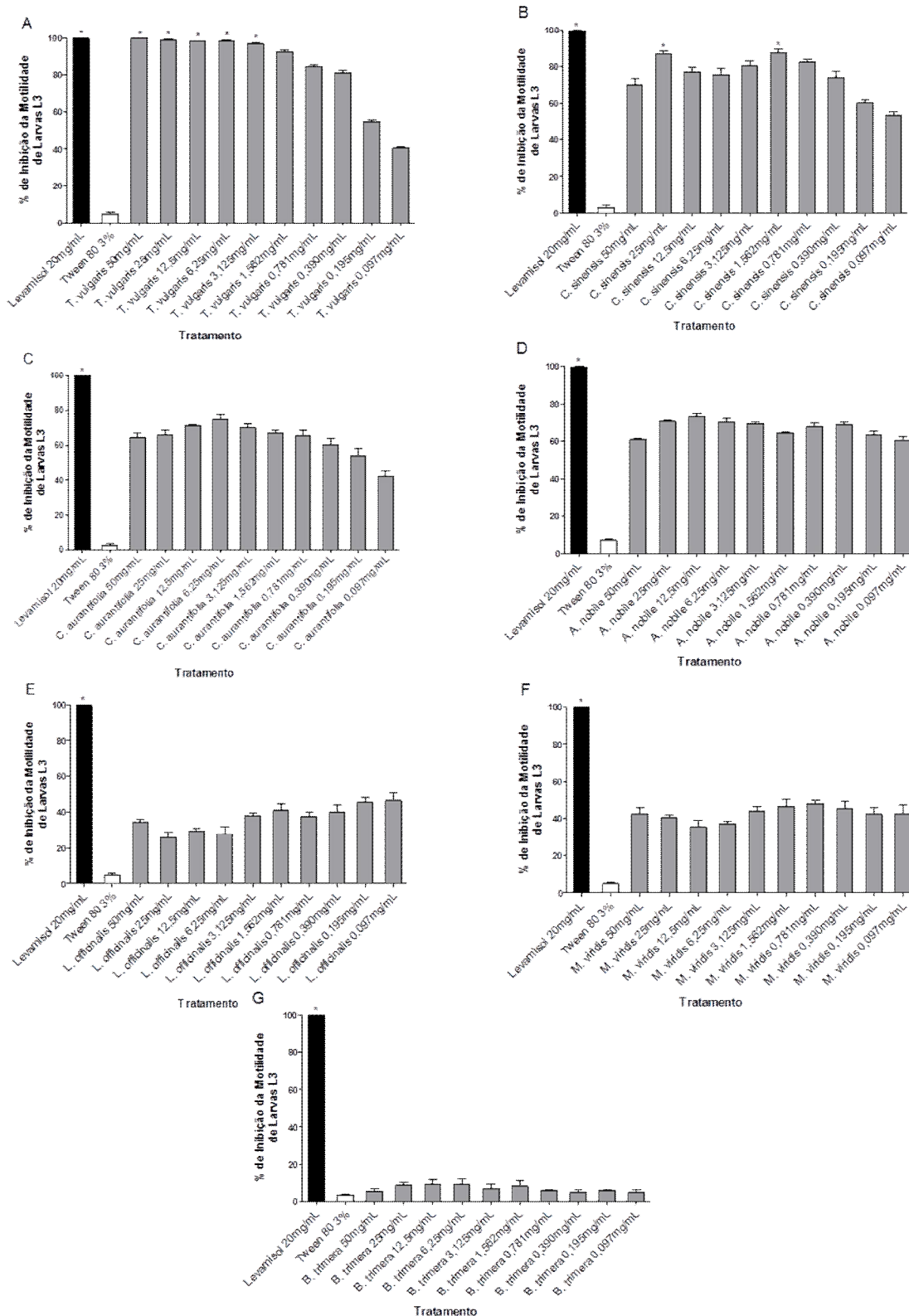
**Figura 4:** Efeito dos diferentes tratamentos com óleos essenciais na inibição da eclosão de ovos de *H. contortus*: A – *Thymus vulgaris*; B – *Citrus sinensis*; C – *Citrus aurantifolia*; D – *Anthemis nobilis*; E – *Lavandula officinalis*; F – *Mentha viridis*; G – *Baccharis trimera*; ( $p < 0,05$ ).



Na figura 4 podemos concluir que os resultados do teste de inibição da eclodibilidade de ovos foram promissores, sobretudo, para os óleos essenciais de *T. vulgaris* (figura 4A), *C. sinensis* (figura 4B), *C. aurantifolia* (figura 4C), *A. nobile* (figura 4D), *L. officinalis* (figura 4E) e *M. viridis* (figura 4F). Para estes, podemos observar que para as concentrações de 50 mg/mL a 3,125 mg/mL produziram a inibição de 100% na eclodibilidade dos ovos, sendo, do ponto de vista estatístico, equiparados aos resultados do controle positivo tiabendazol (25 µg/mL). Podemos notar ainda, que o óleo essencial de *T. vulgaris*, se destacou dentre os demais, pois, até em baixas concentrações como 1,562 mg/mL foi observado inibição de 100% na eclodibilidade dos ovos, mostrando ser bastante efetivo contra ovos de *H. contortus*. No entanto, para o óleo essencial de *B. trimera* (figura 4G), os resultados não foram satisfatórios, pois mesmo na maior concentração (50 mg/mL) foi obtida inibição de apenas 68,3% na eclosão dos ovos, o que é relativamente baixo se compararmos com os dados do controle positivo e dos óleos mais promissores.

A seguir, na figura 5, estão dispostos todos os resultados obtidos nos ensaios de inibição da motilidade larvar, novamente para todos os óleos em teste na mesma faixa de concentração utilizada no ensaio anterior.

**Figura 5:** Efeito dos diferentes tratamentos com óleos essenciais na inibição da motilidade de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*: A – *Thymus vulgaris*; B – *Citrus sinensis*; C – *Citrus aurantifolia*; D – *Anthemis nobilis*; E – *Lavandula officinalis*; F – *Mentha viridis*; G – *Baccharis trimera*; ( $p < 0,05$ ).



Na figura 5 as análises dos resultados nos permitem concluir que o óleo de *T. vulgaris* (figura 5A) apresentou o melhor desempenho na inibição da motilidade larval, produzindo inibições que variaram entre 84,8% a 99,4% nas diluições entre 0,781 mg/mL a 50 mg/mL. Para o óleo de *C. sinensis* (figura 5B), as inibições que variaram entre 52,6% a 87,4%, sendo os melhores resultados obtidos nas diluições de 1,562 mg/mL e 25 mg/mL, mostrando não haver relação dose-dependência para seu efeito. Apesar disso, ambos os óleos citados se destacaram, pois, estatisticamente, apresentaram resultados equiparados aos do controle positivo levamisol (20 mg/mL).

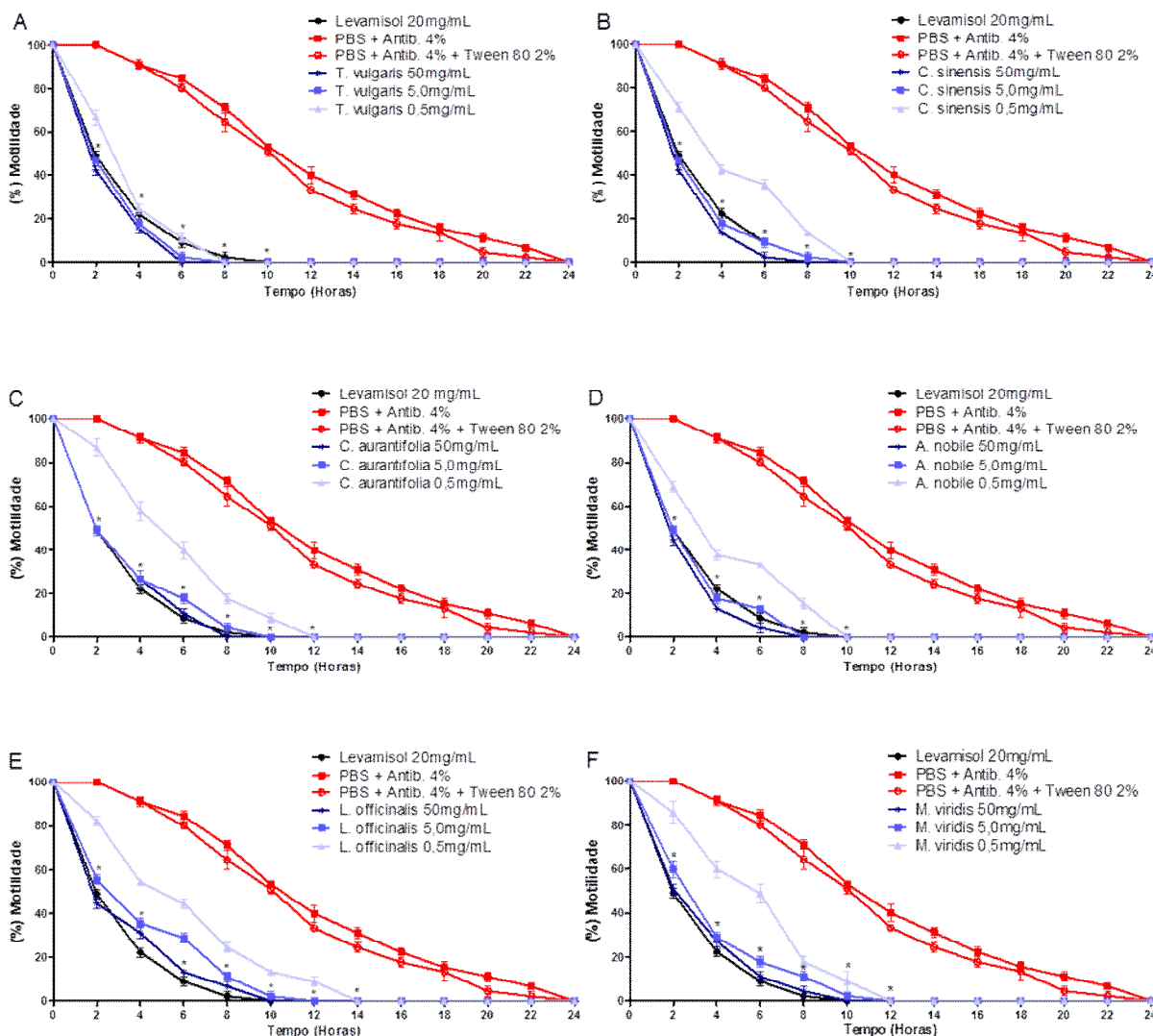
Os óleos de *C. aurantifolia* (figura 5C) e *A. nobile* (figura 5D) apresentaram desempenho intermediário, com inibições que variaram, respectivamente, de 42,3% a 74,6% e de 60,5% à 73,0%, o que relativamente dista em desempenho do controle positivo e melhores óleos descritos acima.

Os óleos essenciais de *L. officinalis* (figura 5E) e *M. viridis* (figura 5F) não foram promissores, pois ambos os óleos não ultrapassaram o patamar de 50% de inibição na motilidade das larvas L<sub>3</sub> para as diferentes diluições ensaiadas. O óleo de *B. trimera* (figura 5G) mostrou desempenho ainda pior, equiparando-se ao controle negativo, não mostrando, pois, atividade significativa para nenhuma das diluições testadas. Há que se lembrar também que este mesmo óleo, na mesma faixa de concentração, foi pouco efetivo na inibição da eclosão dos ovos.

Posteriormente, foram executados os ensaios envolvendo os parasitas na fase adulta. As faixas de concentrações utilizadas para os óleos essenciais neste experimento foram definidas com base no desempenho geral dos óleos nos testes de inibição da eclosão de ovos e inibição motilidade larvar. Além disso, apenas óleos com desempenhos importantes nestes dois testes foram selecionados para os testes com parasitas adultos.

Na figura 6 estão apresentados os resultados obtidos nos testes de inibição da viabilidade dos parasitas adultos de *H. contortus* para os diferentes óleos e suas diluições.

**Figura 6:** Efeito dos diferentes tratamentos com óleos essenciais na inibição da viabilidade dos parasitas adultos de *H. contortus*: A – *Thymus vulgaris*; B – *Citrus sinensis*; C – *Citrus aurantifolia*; D – *Anthemis nobile*; E – *Lavandula officinalis*; F – *Mentha viridis*; ( $p < 0,05$ ).



A partir dos resultados acima, podemos observar que os parasitas adultos apresentam elevada sensibilidade devido à mudança de temperatura, pH, e ausência da proteção dada pelas microvilosidades intestinais após a recuperação do abomaso. Diante disso, os controles negativos (PBS + Antib. 4% e PBS + Antib. 4% + Tween 80 2%), foram importantes parâmetros para mostrar a ausência de interferentes durante o processo de recuperação, e apontar o momento exato do final do teste, que foi considerado o de 24 horas após o seu início. Sendo assim, concluímos que para os óleos essenciais de *T. vulgaris* (figura 6A), *C. sinensis* (figura 6B), *C. aurantifolia* (figura 6C) e *A. nobile* (figura 6D), os resultados foram promissores, pois na maioria das diluições utilizadas, houve quase que 100% de inibição da viabilidade dos parasitas dentro de apenas 6 horas do início do experimento, o que pode ser equiparado ao controle positivo. Em contrapartida, para os óleos de *L. officinalis* (figura 6E) e *M. viridis* (figura 6F), ainda que apresentando

resultados importantes, a inibição da viabilidade dos parasitas se deu apenas acima de 8 horas de experimento e apenas para algumas das doses ensaiadas.

Sendo assim, no balanço geral dos resultados, podemos concluir que tanto o óleo de *T. vulgaris* como o de *C. sinensis* se destacaram dentre os demais óleos testados. Estes óleos, portanto, atendem as exigências de desempenho propostas pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.) e descrito por Powers et al. (1982), que dizem serem promissores os compostos que apresentem inibições acima de 90% para maior parte da faixa de concentração usada contra ovo, larva e adulto do helminto. No entanto, podemos afirmar também que os resultados obtidos para os óleos de *C. aurantifolia* e *A. nobile*, apesar de não atingirem a mesma faixa de eficiência dos primeiros óleos, foram satisfatórios, pois, as porcentagens de inibições contra ovos, larvas e adultos, em geral, ultrapassaram os 50% de eficácia, mostrando também ação em todo ciclo de vida do parasita *H. contortus*.

Os dados obtidos a partir de análises de regressão não linear e distribuição logarítmica foram importantes para avaliação da concentração mínima inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) nos testes de eclodibilidade de ovos e motilidade larvar, sendo de valia na melhor interpretação dos resultados. Sendo assim, com bases nos dados apresentados na tabela 2, o óleo essencial de *T. vulgaris* foi o que apresentou os resultados mais promissores, exibindo os menores valores de IC<sub>50</sub> para ambos os testes (0,436 mg/mL para eclodibilidade de ovos e 0,338 mg/mL para motilidade larvar). Considerando os baixos valores de IC<sub>50</sub> pode-se concluir que o óleo de *T. vulgaris*, apresenta elevado potencial anti-helmíntico. É importante ainda lembrar do importante desempenho farmacológico deste último óleo contra a fase adulta do parasita (figura 6).

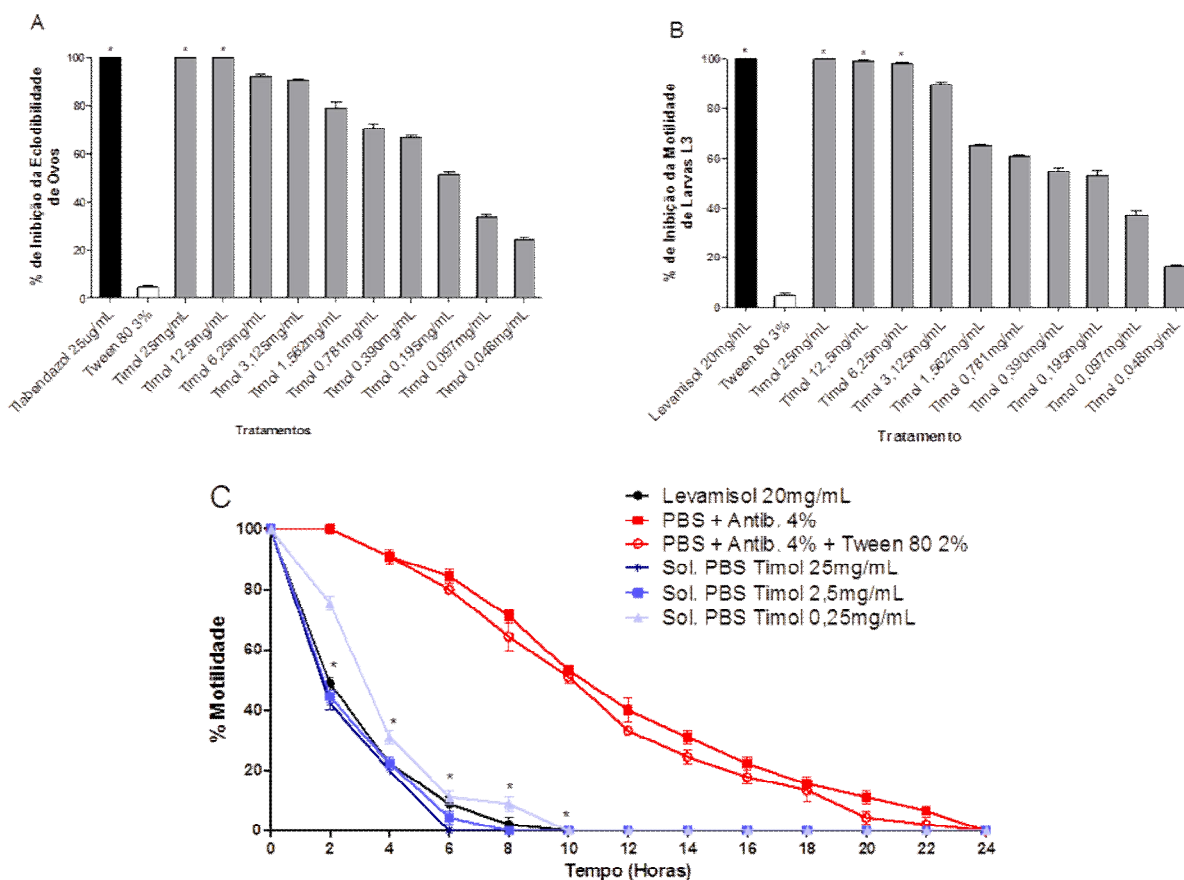
**Tabela 2:** Concentração mínima inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) dos diferentes óleos nos testes de eclodibilidade de ovos e motilidade larvar para cepas resistentes de *H. contortus*.

<b>Espécies Vegetais</b>	<b>Teste de Inibição de Eclodibilidade de Ovos</b>	<b>Teste de Inibição de Motilidade Larvar</b>
<i>T. vulgaris</i>	0,436 mg/mL	0,339 mg/mL
<i>C. sinensis</i>	1,268 mg/mL	0,339 mg/mL
<i>C. aurantifolia</i>	0,694 mg/mL	0,414 mg/mL
<i>A. nobile</i>	0,842 mg/mL	1,507 mg/mL
<i>L. officinalis</i>	0,316 mg/mL	2,272 mg/mL
<i>M. viridis</i>	0,922 mg/mL	5,159 mg/mL
<i>B. trimera</i>	1,705 mg/mL	1,829 mg/mL

Considerando a relação entre os constituintes químicos identificados nos óleos essenciais e as atividades farmacológicas obtidas nos ensaios *in vitro*, é importante fazer algumas observações adicionais, principalmente para o caso do óleo de *T. vulgaris*. De acordo com nossos resultados, o timol é o constituinte majoritário do óleo essencial de *T. vulgaris*, representando

sozinho 50,22% de sua constituição. Considerando isso, é importante avaliar também a atividade anti-helmíntica do timol. Os resultados da análise do efeito de diferentes concentrações de timol nos ensaios de eclodibilidade de ovos, motilidade larval e viabilidade de parasitas adultos são apresentados na figura 7. As concentrações de timol escolhidas para os testes *in vitro* correspondem sempre à metade das concentrações do óleo de *T. vulgaris*, o que representa sua presença de cerca de 50% no óleo.

**Figura 7:** Efeito dos diferentes tratamentos de timol: A – inibição da eclosão de ovos de *H. contortus*; B – inibição da motilidade de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*; C – inibição da viabilidade dos parasitas adultos de *H. contortus*; ( $p < 0,05$ ).



Com base na figura 7, os resultados mostraram que o timol teve ação contra as três fases de vida do parasita *H. contortus*. No geral, podemos verificar que na figura 7A o timol inibiu de 90,6% à 100% a eclosão dos ovos entre as concentrações de 3,125 mg/mL à 25 mg/mL, obtendo a IC<sub>50</sub> de 0,442 mg/mL; na figura 7B houve inibição de 89,5% à 100% da motilidade de larvas L<sub>3</sub> entre as concentrações 6,25 mg/mL a 25 mg/mL, com IC<sub>50</sub> de 0,497 mg/mL; e na figura 7C houve inibição da viabilidade dos parasitas adultos nas 6 primeiras horas nas três concentrações testadas. Desde que os resultados de eficácia anti-helmíntica do timol são bem similares aos



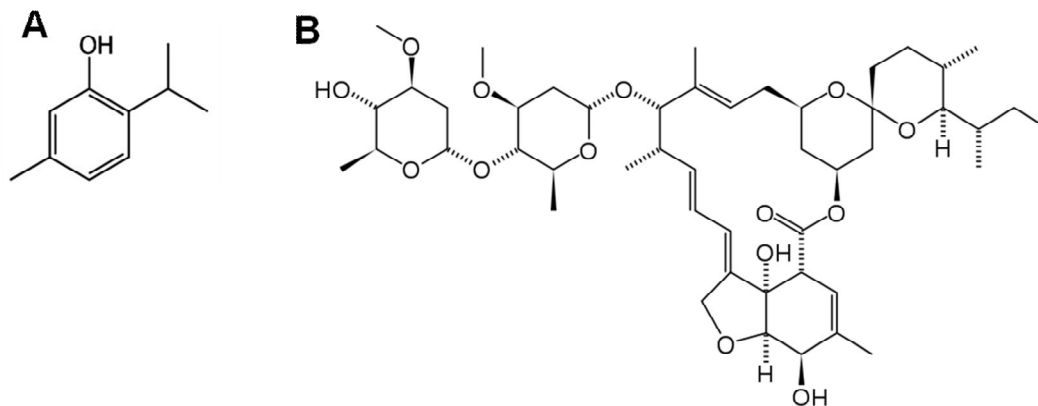
exibidos pelo óleo essencial contra as diferentes fases de vida do *H. contortus*, é possível afirmar que o timol seja o único responsável pela atividade anti-helmíntica do óleo de *T. vulgaris*.

A ação anti-helmíntica do óleo essencial de outras plantas também tem sido atribuída à presença do timol. De fato, em experimentos anteriores e muito similares, Camurça-Vasconcelos et al. (2007) e Carvalho et al. (2012), em ensaios *in vitro* realizados contra ovos e larvas de *H. contortus*, atribuíram a eficácia anti-helmíntica do óleo de *Lippia sidóides* à presença majoritária do timol em sua constituição química.

Ademais, estudos recentes sugerem o mecanismo de ação do timol contra *H. contortus* como sendo similar as drogas da classe das lactonas macrocíclicas (LYNAGH et al., 2014). A ivermectina é uma das drogas mais utilizadas no controle de parasitas gastrointestinais em ovinos e uma das mais importantes desta classe (GLENDINNING et al., 2011). Hibbs e Gouaux (2011) propuseram um modelo para ligação da molécula da ivermectina na subunidade GLC-1 do receptor GluCl no nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Tal modelo definiu as principais regiões para formação de pontes de hidrogênio entre o receptor GluCl e grupamentos hidroxilas da ivermectina. Dentro deste conceito, estudos de novos agonistas ou moduladores de receptores GluCl expressos em oocistos de *Xenopus laevis* mostram que o timol possui ação moduladora nos receptores GluCl (LYNAGHT et al. 2014). Além disso, estudos *in silico* demonstraram a interação do radical hidroxila presente no timol através de pontes de hidrogênio com o receptor GluCl, assim como a ivermectina de acordo com Hibbs e Gouaux (2011). Isso pode explicar parcialmente o mecanismo de ação do timol contra o *H. contortus*, que provavelmente envolve o mesmo alvo farmacológico da ivermectina ou drogas da mesma classe.

Apesar da resistência da cepa de *H. contortus* usada neste trabalho (Embrapa2010 – resistente às lactonas macrocíclicas, benzimidazóis e imidotiazóis) às lactonas macrocíclicas (CHAGAS et al., 2013), a ação do timol aqui observada pode ser explicada por diferenças na sua estrutura química em relação a classe das lactonas macrocíclicas (figura 8). Por exemplo, estas diferenças poderiam promover formas ou modelos de interação diferentes no mesmo alvo farmacológico (receptores GluCl) em diferentes sítios de ligação, o que poderia levar aos diferentes níveis de resistência para diferentes tipos de drogas. Além disso e como outra sugestão, as doses utilizadas do timol neste trabalho podem ser mais elevadas que as doses associadas à resistência para as lactonas macrocíclicas. De fato, a extensão maior da dose pode superar a resistência exibida pelo isolado resistente Embrapa2010, uma vez que doses mais elevadas de tiabendazol (benzimidazol) e levamisol (Imidotiazol) funcionaram a contento como controles positivos em nossos ensaios *in vitro*. As doses dos controles positivos foram selecionadas com base em resultados de estudos preliminares de nosso grupo de pesquisa.

**Figura 8:** Estruturas moleculares: A – Timol; B – Ivermectina.



**Fonte:** Figura A: Lynagh et al. (2014); Figura B: Brunton; Chabner; Knollmann (2012)

Após terem sido concluídos todos os ensaios *in vitro* e com base na avaliação do desempenho anti-helmíntico, o óleo essencial de *T. vulgaris* foi selecionado para ser avaliado nos ensaios *in vivo*.

Os ensaios *in vitro*, como o teste da eclodibilidade de ovos, motilidade larvar e viabilidade dos parasitas adultos são testes bastante utilizados na parasitologia veterinária, sendo vantajosos quando usados como predecessores dos ensaios *in vivo*. As principais vantagens do uso racional/estratégico destes testes antes dos ensaios *in vivo* dão conta de um uso mais reduzido de animais, economia de tempo e de custos, permitindo a avaliação de eficácia anti-helmíntica de um dado ativo ao longo de todo o ciclo de vida do parasita (DEMELER et al., 2013). Entretanto, compostos que sejam ativos nos ensaios *in vitro* não necessariamente são ativos em igual magnitude nos ensaios *in vivo*. Este tipo de divergência, relativamente comum no estudo de novos anti-helmínticos contra *H. contortus*, se deve a fatores ligados a biodisponibilidade e farmacologia intrínseca do composto em teste, como sua provável destruição ou insolubilização no rúmem animal, bem como proteção adicional do verme nas microvilosidades do abomaso (PENELUC et al., 2009). Esta limitação deve ser sempre levada em conta, deixando claro, a importância do seguimento farmacotécnico/farmacocinético no desenvolvimento industrial de novos produtos anti-helmínticos contra *H. contortus* (SANGSTER; GILL, 1999).

De fato, apesar da marcada atividade anti-helmíntica do óleo de *T. vulgaris* nos ensaios *in vitro*, o mesmo falhou em promover a redução da carga parasitária dos animais nos ensaios *in vivo*, ao menos nas doses ensaiadas (300, 150 e 75 mg/mL). Os resultados dos ensaios *in vivo* estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Efeito dos diferentes tratamentos com óleo essencial de *T. vulgaris* em ovinos artificialmente infetados pelo parasita *H. contortus* durante os ensaios *in vivo* ( $p < 0,05$ ):

MÉDIA DA CARGA PARASITÁRIA EM OPGs								
TRATAMENTOS	Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12	Dia 14
Controle (+) Zolvix	6757 ± 3800	244 ± 444***	0 ± 0***	0 ± 0***	0 ± 0***	0 ± 0***	0 ± 0***	0 ± 0***
Controle (-) Solução Salina	4950 ± 3826	6783 ± 4815	6828 ± 4669	5433 ± 2898	6144 ± 3428	5733 ± 3267	5867 ± 2111	5847 ± 3410
<i>T. vulgaris</i> 300 mg/kg (PV)	4695 ± 3540	5245 ± 2128	6122 ± 1385	5894 ± 1219	7689 ± 2721	5883 ± 3444	5694 ± 2385	6211 ± 3485
<i>T. vulgaris</i> 150 mg/kg (PV)	3673 ± 1769	4033 ± 3121	4693 ± 3096	5210 ± 3909	5480 ± 3648	4533 ± 3132	4713 ± 3586	5327 ± 3710
<i>T. vulgaris</i> 75 mg/kg (PV)	6428 ± 3363	6622 ± 4673	5156 ± 3328	5578 ± 3745	4772 ± 4184	4850 ± 3693	5017 ± 4146	5244 ± 3578

Na tabela 3, estão apresentados os valores das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), representando a média da carga parasitária dos animais de cada grupo. Como dito, os tratamentos com o óleo essencial de *T. vulgaris* não resultaram em redução efetiva na contagem dos ovos. Apesar disso, novos esforços experimentais têm sido postos em prática pelo nosso grupo de pesquisa, sobretudo, alterando a via de administração dos ativos em teste (óleo essencial de *T. vulgaris* e timol), suas doses e a preparação farmacotécnica do produto. De fato, resultados preliminares promissores têm sido conseguidos através do uso de polietilenoglicol (PEG 400) adicionado à formulação base de ativos (dados não mostrados).

Apesar da atual ineficácia *in vivo*, é possível claramente afirmar que tanto o óleo essencial de *T. vulgaris*, bem como seu constituinte majoritário o timol, são bem tolerados pelos animais. De fato, desempenhos de função renal e hepática medidos pela avaliação bioquímica, bem como o hemograma completo e condição geral dos animais (comportamento e peso, p.e) não se mostraram diferentes entre animais dos diferentes tratamentos e controle negativo nos ensaios *in vivo* (vide apêndice D). Este dado é de vital importância quando considerada a importância atual da toxicologia no desenvolvimento de produtos veterinários modernos.

Como tratado anteriormente, o aumento de infecções por *H. contortus* em rebanhos de ovinos em diferentes partes do mundo, bem como o aparecimento de cepas resistentes tem sido um grande problema de interesse veterinário e zootécnico. Na prática o comércio brasileiro de antiparasitários veterinários movimentou cerca de 989 milhões de reais no ano de 2013 (SINDAN, 2013). No mundo, este valor chega à casa dos bilhões de dólares gastos anualmente no controle destas parasitemias (ZHU et al., 2013). As consequências deixadas por este problema vão muito além da elevação de custos do manejo do plantel, pois, para os anti-helmínticos convencionais existe também a possibilidade de contaminações da carne e leite animal, levando a impactos negativos para a saúde humana. A procura por anti-helmínticos botânicos tem representado uma alternativa atraente para o problema mencionado, podendo impactar em vantagens econômicas e aquelas relacionadas à efetividade farmacológica e menor toxicidade tanto para o animal quanto

para humanos (CRAGG; NEWMAN, 2013). Neste contexto, o trabalho atual valida a atividade anti-helmíntica ao menos *in vitro* do óleo essencial de *T. vulgaris* e de seu constituinte majoritário, o timol, apresentando o trabalho marcada contribuição etnofarmacológica e biotecnológica, o que repercute em grande interesse farmacêutico-veterinário.

## 5. CONCLUSÃO

As principais conclusões deste trabalho são:

- Os resultados *in vitro* mostraram que o óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho) foi o que apresentou melhor desempenho na atividade anti-helmíntica em comparação com os demais óleos testados;
- O timol é o constituinte majoritário do óleo essencial de *T. vulgaris*;
- Tanto o óleo essencial de *T. vulgaris* quanto o timol, que representa 50,22% da composição do óleo, foram efetivos contra o *H. contortus* nas suas principais fases de vida. Tanto o óleo quanto o timol foram capazes de inibir a eclosão dos ovos entre 96,4 a 100% e a motilidade larvar entre 97,0% a 100%. Tanto óleo quanto timol bloquearam completamente a motilidade de parasitas adultos de *H. contortus* dentro das primeiras 6 horas de experimento, equiparando-se ao controle positivo;
- Dado fato de o timol replicar em grande proximidade os resultados anti-helmínticos apresentados pelo óleo e de ser este composto o principal constituinte do mesmo, é natural assumir que o timol seja o único responsável direto pela ação anti-helmíntica de *T. vulgaris*;
- Tanto o óleo essencial de *T. vulgaris*, bem como seu constituinte majoritário o timol, são bem tolerados pelos animais. De fato, desempenhos de função renal e hepática medidos pela avaliação bioquímica, bem como o hemograma completo e condição geral dos animais (comportamento e peso, p.e) não se mostraram diferentes entre animais dos diferentes tratamentos e controle negativo nos ensaios *in vivo*. Este dado é de vital importância quando considerada a importância atual da toxicologia no desenvolvimento de produtos veterinários modernos;
- Apesar da ineficácia relativa do óleo de *T. vulgaris* no ensaio *in vivo*, o que se deve ser corrigido através do melhoramento de sua biodisponibilidade, os resultados *in vitro* validam o uso popular do óleo de *T. vulgaris* como anti-helmíntico, ao menos contra o *H. contortus*;
- Os resultados apresentam marcada contribuição etnofarmacológica e biotecnológica, o que repercute em grande interesse farmacêutico-veterinário.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-DARWISH, M. S. et al. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region - South of Jordan. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.25, n.1, p.239-245, 2012.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy**. Allured Publ. Corp, Carol Stream, 1995.

AKIN, M.; AKTUMSEK, A.; NOSTRO, A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. **African Journal of Biotechnology**. v.9, n.4, p.531-535, 2010.

ALBA-HURTADO, F.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. A. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. **BioMed Research International**. v.2013, p.1-11, 2013.

ALMEIDA, F. A. et al. Multiple Resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**. v.59, n.4, p.622-625, 2010.

AMARANTE, A. F. T. Resistência genética de ovinos à verminoses. **FarmPoint**, jun. 2006, Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/resistencia-genetica-de-ovinos-a-verminoses-138n.aspx>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

AMIN, M. R. et al. *In vitro* anthelmintic efficacy of some indigenous medicinal plants against gastrointestinal nematodes of cattle. **Journal Bangladesh**. v.7, n.1, p.57-61, 2009.

ÁVILA, V. S. et al. O retorno da ovinocultura ao cenário produtivo do Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v.11, n.11, p.2419-2426, 2013.

AYAZ, M. M. et al. Epidemiological survey of helminths of goats in southern Punjab, Pakistan. **Tropical Biomedicine**. v.30, n.1, p.62-71, 2013.

BACHAYA, H. A. et al. Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematodes of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**. v.123, p.325-329, 2009.

BARROS, E. Controle de verminose em caprinos e ovinos. **Portal Dia de Campo**, 14 dez. 2011. Disponível em: <<http://ovinosecaprinos.iepec.com/noticia/controle-de-verminose-em-caprinos-e-ovinos>>. Acesso em 14 jan. 2015.

BORGSTEEDE, F. et al. How widespread is resistance to ivermectin among gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. **Tijdschr Diergeneeskd**. v.135, n.21, p. 782-785, 2010.

BOURGOU, S. et al. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. **Scientific World Journal**. v.2012, p.1-10, 2011.

BOUNIHI, A. et al. *In Vivo* potential anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil. *Advances in Pharmacological Sciences*. v.2013, p.1-7, 2013.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª ed. Porto Alegre. Artmed, p.1443-1459, 2012.

BYGARSKI, E. E.; PRICHARD, R. K.; ARDELLI, B. F. Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.4, p.143-151, 2014.

CALA, A. C. et al. *In vitro* Anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**. v.130, p.98-102, 2012.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**. v.148, p.288-294, 2007.

- CARNAT, A. et al. The aromatic and polyphenolic composition of Roman camomile tea. **Fitoterapia**. v.75, p.32-38, 2004.
- CARVALHO, R. S. et al. Controle de verminose nos rebanhos caprino e ovino no semiárido brasileiro: avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais. Embrapa Caprinos e Ovinos, 2010, Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/876897/controle-de-verminose-nos-rebanhos-caprino-e-ovino-no-semiarido-brasileiro-avaliacao-dos-impactos-economicos-sociais-e-ambientais>>. Acesso em: 08 abr. 2016.
- CARVALHO, C. O. et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**. v.183, p.260-268, 2012.
- CERNANSKA, D. et al. Worm control practices on sheep farms in the Slovak Republic. **Veterinary Parasitology**. v.154, p.270-276, 2008.
- CEZAR, A. S. et al. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in souther Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.173, p. 157-160. 2010.
- CHAGAS, A. C. S. et al. *Haemonchus contortus*: A multiple resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**. v.62, p.1-6, 2013.
- CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S. Ação da *Azadirachta indica* (Neem) em nematoides gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.44, n.1, p.49-55, 2007.
- CHINTOAN-UTA, C. et al. Wild deer as potential vectors of anthelmintic-resistant abomasal nematodes between cattle and sheep farms. **Proceedings of The Royal Society**. v.281, p.1-9, 2014.
- CONTI, B. et al. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. v.107, n.6, p. 1455-1461, 2010.
- COLES, G. C. et al. World Association for Advancement in Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v.44, p.35-44, 1992.
- COSTA, M. S. V. L. F. et al. Anthelmintic resistance in a dairy cattle farm in the State of Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.20, n.2, p.115-120, 2011.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1830, p.3670-3695, 2013.
- CRUZ, D. G. et al. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.170, p.340-343, 2010.
- DEMELEER, J. et al. The *in vitro* assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.3, p.109–118, 2013.
- DOMINGUES, L. F. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**. v.197, n.1-2, p.263-70, 2013.

- DOMKE, A. V. M. et al. Worm control practice against gastro-intestinal parasites in Norwegian sheep and goat flocks. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.53, n.29, p.1-9, 2011.
- EDDOUKS, M. et al. Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v.67, p.189-195, 2005.
- EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAYA, M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.137, p.108-113, 2011.
- ELHAJILI, M. et al. Diuretic activity of the infusion of flowers from *Lavandula officinalis*. **Reproduction Nutrition Development**. v.41, n.5, p.393-399, 2001.
- FARIAS, J. L. S. et al. Análise socioeconômica de produtores familiares de Caprinos e ovinos no semiárido cearense, Brasil. **Archivos de Zootecnia**. v.63, n.241, p.13-24, 2014.
- FORRESTER, S. G. et al. *Haemonchus contortus*: HcGluCla expressed in *Xenopus oocytes* forms a glutamate-gated ion channel that is activated by ibotenate and the antiparasitic drug ivermectin. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.129, p.115-121, 2003.
- FOSTER, J. G.; CASSIDA, K. A.; TURNER, K.E. *In vitro* analysis of the anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. **Veterinary Parasitology**. v.180, n.3-4, p.298-306, 2011.
- FURTADO, S. K. et al. Effectiveness of Asteraceae extracts on Trichostrongylidae eggs development in sheep. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v.20, n.3, p.215-218, 2011.
- GAINZA, Y. A. et al. Anthelmintic activity *in vitro* of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. **Industrial Crops and Products**. v.76, p.647-652. 2015.
- GENE, R. M. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**. v.62, n.3, p.232-235, 1996.
- GEURDEN, T. et al. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. **Veterinary Parasitology**. v.201, p.59-66, 2014.
- GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology**. v.140, n.2, p.1506-1522, 2013.
- GLENDINNING, S. K. et al. Glutamate-Gated Chloride Channels of *Haemonchus contortus* Restore Drug Sensitivity to Ivermectin Resistant *Caenorhabditis elegans*. **Plos One**. v.6, n.7, p.1-8, 2011.
- GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology Research**. v.110, n.5, p.2023-2032, 2012.
- GUIMARÃES, R. et al. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. **Food Chemistry**. v.136, n.2, p.718-725, 2013.
- GUSE, J. C.; DÖRR, A. C.; ROSSATO, M. V. Ovinocultura na região central do estado do Rio Grande do Sul: um enfoque à gestão rural. **Perspectiva Econômica**. v.9, n.2, p. 131-145, 2013.
- HIBBS, R. E.; GOUAUX, E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. **Nature**. v.474, p.54-61. 2011.

HOUNZANGBE-ADOTE, M. S. et al. *In vitro* effects of four tropical plantas on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**. v.78, p.155-160, 2005.

HUANG, L. et al. Pharmacological profile of essential oils derived from *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* with anti-agitation properties: focus on ligand-gated channels. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.60, n.11, p.1515-1522, 2008.

JAIN, D. et al. Evaluation of cytotoxicity and anticarcinogenic potential of Mentha leaf extracts. **International Journal of Toxicology**. v.30, n.2, p.225-236, 2011.

JORIS, J. L.; VILPOUX, O. F. Transações entre produtores e frigoríficos no setor de ovinos no estado de Mato Grosso do Sul: Uma abordagem pela economia dos custos de transação. **Organizações Rurais & Agroindustriais**. v.15, n.2, p.220-234, 2013.

KATIKI, L. M. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**. v.183, p.103-108, 2011.

KATIKI, L. M. et al. Evaluation of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. v.186, p.312-318, 2012.

KUMAR, P. et al. Insecticidal evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Parasitology Research**. v.110, n.5, p.1929-1936, 2012.

LARA, V. et al. **O mercado nacional da ovinocultura**. 01 set. 2009 Disponível em: <<http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/palestras/22279-mercado-nacional-ovinocultura.html>>. Acesso em 14 jan. 2015.

LI, X. D. et al. Extraction and analysis of chemical components of essential oil *Thymus vulgaris* of tissue culture. **Journal of Chinese medicinal materials**. v.34, n.10, p.1544-1548, 2011.

LOIZZO, M. R. et al. Evaluation of *Citrus aurantifolia* peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2012.

LYNAGH, T. et al. Comparative pharmacology of flatworm and roundworm glutamate-gated chloride channels: Implications for potential anthelmintics. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.4, p. 244-255. 2014.

MACEDO, I. T. F. et al. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**. v.173, p.93-98, 2010.

MACHADO, A. A. **Endoparasitoses ovina**. In: **Seminários Acadêmicos**, abr. 2008. Disponível em <http://www.uniovinos.unipampa.edu.br>>. Acessado em 03 fev 2010.

MACIEL, M. V. et al. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**.v.140, p. 98-104, 2006.

MACIEL, W. G. et al. Fauna helmintológica de ovinos provenientes da microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**. v.44, n.3, p.492-497, 2014.

MARSIGILIO, B. N. **Ovinocultura de corte no Brasil e no mundo**. 18 ago. 2012 Disponível em: <<http://ovinosecaprinos.iepec.com/noticia/ovinocultura-de-corte-no-brasil-e-no-mundo>>. Acesso em 16 jan. 2015.



- 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.1-4, 2014.
- MEIYANTO, E.; HERMAWAN, A.; ANINDYAJATI. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.13, n.2, p.427-436, 2012.
- MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.100, n.555-556, p.141-146, 2005.
- MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestinos brasileiros. **Ciência Animal Brasileira**. v.10, n.1, p.294-300, 2009.
- NOVA, L. E. V. et al. Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.8, n.1, p.160-171, 2014.
- NTALLI, N. G. et al. Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, p.7856-7863, 2010.
- OJIMA, A. L. R. O.; BEZERRA, L. M. C.; OLIVEIRA, A. L. R. Caprinos e ovinos em São Paulo atraem argentinos. **Análises e Indicadores do Agronegócio**. v.1, n.1, 2006.
- OLIVEIRA, C. B. et al. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**. v.17, n.1, p.1113-1123, 2012.
- OLIVEIRA, L. M. B. et al. Effects of *Mimosa tenuiflora* on larval establishment of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**. v.196, n.3-4, p.341-346. 2013.
- PARAUD, C.; CHARTIER, C. Biological control of infective larvae of a gastro-intestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. **Parasitology Research**. v.89, p.102-106, 2003.
- PARK, Y. U.; KOO, H. N.; KIM, G. H. Chemical composition, larvicidal action, and adult repellency of *Thymus magnus* against *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.28, n.3, p.192-198, 2012.
- PAUL, E. L. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**. v.32, n.6, p.419-425, 2009.
- PENELUC, T. et al. Anthelmintic activity of aqueous extract of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves (Rutaceae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.18, p.43-48, 2009.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants usage. **Pharmacognosy Reviews**. v.6, n.11, p.1-5, 2012.
- POWERS, K. G. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) – Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelmintics in Ruminants (Bovine And Ovine). **Veterinary Parasitology**. v.10, p.265-284, 1982.

PRICHARD, R.; MÉNEZ, C.; LESPINE, A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.2, p.134-153, 2012.

RIBEIRO, A. R. C. et al. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.11, p.1051-1055, 2014.

RODRIGUES, A. B. et al. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do sertão paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, n.4, p.162-166, 2007.

RUFENER, L. et al. *Haemonchus contortus* Acetylcholine Receptors of the DEG-3 Subfamily and Their Role in Sensitivity to Monepantel. **Pathogens**. v.5, n.4, p.1-11, 2009.

SANGSTER, N. C.; GILL, J. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. **Parasitology Today**. v.15, n.4, 1999.

SANTHANNA, S. **Mato Grosso registra crescimento de consumo de carne ovina no Estado**. 30 out. 2010 Disponível em: <<http://www.aguaboanews.com.br/>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

SCHMIDT, E. et al. Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. **Natural Product Communications**. v.7, n.8, p.1095-1098, 2012.

SCHUSTER, B. G. Demonstrating the validity of natural products as anti-infective drugs. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v.7, p.73-82, 2001.

SCZESNY-MORAES, E. A. et al. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.3, p.229-236, 2010.

SEGVIC, K. M. et al. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Letters in Applied Microbiology**. v.44, n.1 p.36-42, 2007.

SERTEL, S. et al. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**. v.31, n.1, p.81-87, 2011.

SIDRA. **Sistema IBGE de recuperação automática**, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre. Editora da UFRGS. p.467-472, 2004.

SIMPRAGA, M. et al. Alternative approaches for the control of gastrointestinal nematodes in sheep farming: a review. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**. v.128, n.7-8, p.257-270, 2015.

SINDAN. **Mercado veterinário: Classes terapêuticas e espécies de animais**. 2013. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

SILVA, A. P. S. P. et al. Ovinocultura do Rio Grande do Sul: Descrição do sistema produtivo e dos principais aspectos sanitários e reprodutivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.12, p.1453-1458, 2013.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10ª ed. Rio de Janeiro. LTC. v.2, p. 284-284, 2012.

SORO, D. et al. *In vivo* anthelmintic activity of *Anogeissus leiocarpus* Guill & Perr (Combretaceae) against nematodes in naturally infected sheep. **Parasitology Research**. v.112, p.2681-2688, 2013.

SOUZA, M. F. et al. Seasonal distribution of gastrointestinal nematode infections in sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.22, n.3, p.351-359, 2013.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**. v.161, n.2, p.119-128, 2006.

SQUIRES, J. M. et al. Effects of artemisinin and Artemisia extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Veterinary Parasitology**. v.175, p.103-108, 2011.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR E.; GUPTA, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. **Molecular and Cellular Pharmacology**. v.3, n.6, p.895-901. 2011.

STANIEK, A. et al. Natural products: modifying metabolite pathways in plants. **Biotechnology Journal**. v.8, n.10, p.1159-1171, 2013.

TARIQ, K. A.; CHISHTI, M. Z.; AHMAD, F. Gastro-intestinal nematode infections in goats relative to season, host sex and age from the Valley, India. **Journal of Helminthology**. v.84, n.1, p.93-97, 2010.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p.134, 2010.

TOROGLU, S. *In vitro* antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils. **Journal of Environmental Biology**. v.32, n.1, p.23-29, 2011.

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.139, n.1, p.155-163, 2012.

UCHA, D. Consumo de carne ovina em crescimento. **Jornal do Comércio**, 25 jan. 2010. Disponível em: < <http://jcrs.uol.com.br/site/noticia.php?codn=18216> >. Acesso em: 16 jan. 2015.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4 ed. Tóquio (Japan). Japan Internacional Cooperation Agency, p.25, 1998.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p.9-23, 1998.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Multidrug and Multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.187, n.1-2, p.209-216, 2012.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**. v.4, n.12, 2008.

VIEIRA, L. S. Métodos Alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v.2, n.2, p.49-56, 2008.

VIEIRA, V. D. et al. Sheep gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Northeastern Brazil: prevalence and risk factors. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v.23, n.4, p.488-494, 2014.

VOORT, M. V. D. et al. Conceptual framework for analysing farm-specific economic effects of helminth infections in ruminants and control strategies. **Preventive Veterinary Medicine**. v.109, p. 228-235. 2013.

WALLER, P. J. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**. v.72, p.391-412, 1997.

WANG, T. et al. Moisture requirements for the migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae out of faeces. **Veterinary Parasitology**. v.204, p.258-264, 2014.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. **Molecules**. v.17, p.12771-12791, 2012.

WOLSTENHOLME, A. J. Glutamate-gated Chloride Channels. **Journal Of Biological Chemistry**. v.287, n.48, p. 40232–40238. 2012.

ZEN, S. D.; SANTOS, M. C.; MONTEIRO, C. M. Evolução da caprino e ovinocultura. **Boletim Ativo Ovinos e Caprinos**. v.1, 2014.

ZHELJAZKOV, V. D. et al. Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition. **Journal of Oleo Science**. v.62, n.4, p.195-199, 2013.

ZHU, J. et al. Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.22, n.3, p.515-522, 2006.

ZHU, L. et al. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Veterinary Parasitology**. v.195, p.112-117, 2013.

ZUNDT, M. et al. Desempenho de cordeiros mestiços dorper machos e femeas, em creep feeding recebendo ração peletizada até a desmama. **Colloquium Agrariae**. v.10, n.1, p. 26-32, 2014.

YONEYA, F. Criadores de ovinos festejam bons preços. **Jornal O Estado de São Paulo**, 19 jan. 2011. Disponível em:  
<[http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20110119/not\\_imp668041,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20110119/not_imp668041,0.php)>. Acesso em: 16 jan. 2015.

## APÊNDICE A



## Laudo Técnico

Rua Otto Benz, 544 – Nova Ribeirânia – Cep.:14096-580  
 Ribeirão Preto – SP - Fone/Fax:(16)2133-4466  
 CNPJ:08.898.383/0001-79 / IE:582.741.351.117

**Produto: Óleo Essencial de Camomila Romana**  
*(Anthemis nobilis)*

**Lote:297**

**Fabricação/Validade(mês/ano):** Fevereiro/2013 – Fevereiro/2015

**CAS Number:** 8015-92-7

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido	Líquido
Cor	Amarelo	Incolor a Amarelo
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade(20°C)	0,908	0,900 – 0,920
Índice de Refração(20°C)	1,450	1,438 – 1,470
Rotação Ótica		[-10° ; -2°]
Data da Análise	27/03/2013	
Origem	Itália	
Resultado	Aprovado	

**Responsável**

Ademar Menezes Jr.

CREA:5060000803

Eng. Agrônomo



## Laudo Técnico

Rua Otto Benz, 544 – Nova Ribeirânia – Cep.:14096-580  
Ribeirão Preto – SP - Fone/Fax:(16)2133-4466  
CNPJ:08.898.383/0001-79 / IE:582.741.351.117

**Produto: Óleo Essencial de Lavanda Mont Blanc**  
(*Lavandula officinalis*)

**Lote: 229**

**Fabricação/Validade(mês/ano):** Fevereiro/2013 – Fevereiro/2015

**CAS Number:** 84776-65-8

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Claro	Incolor a Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade(20°C)	0,891	0,880 – 0,900
Índice de Refração(20°C)	1,459	1,450 – 1,470
Data da Análise	19/04/2013	
Origem	França	
Resultado	Aprovado	

*Ademar Menezes Jr.*

**Responsável**  
Ademar Menezes Jr.  
CREA:5060000803  
Eng. Agrônomo



## Laudo Técnico

Rua Otto Benz, 544 – Nova Ribeirânia – Cep.:14096-580  
Ribeirão Preto – SP - Fone/Fax:(16)2133-4466  
CNPJ:08.898.383/0001-79 / IE:582.741.351.117

**Produto: Óleo Essencial de Tomilho Branco**  
(*Thymus vulgaris*)

**Lote:** 177

**Fabricação/Validade(mês/ano):** Julho/2012 – Julho/2014

**CAS Number:** 8007-46-3

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Claro	Incolor a Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade(20°C)	0,918	0,900 – 0,940
Índice de Refração(20°C)	1,501	1,490 – 1,510
Rotação Ótica		(-3,0o ; -0,1o)
Data da Análise	18/10/2012	
Resultado	Aprovado	
Principais componentes(aprox.)	Timol	

*Ademar Menezes Jr.*  
**Responsável**

Ademar Menezes Jr.  
CREA:5060000803  
Eng. Agrônomo



## Laudo Técnico

Rua Otto Benz, 544 – Nova Ribeirânia – Cep.:14096-580  
Ribeirão Preto – SP - Fone/Fax:(16)2133-4466  
CNPJ:08.898.383/0001-79 / IE:582.741.351.117

**Produto: Óleo Essencial de Laranja Doce**  
(*Citrus sinensis*)

**Lote:** 151

**Fabricação/Validade(mês/ano):** Dezembro/2012 – Junho/2014

**CAS Number:** 8008-57-9

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Laranja	Amarelo a Laranja
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Cítrico - Doce	Cítrico - Doce
Densidade(20°C)	0,843	0,830 – 0,860
Índice de Refração(20°C)	1,473	1,465 – 1,485
Data da Análise	08/01/2013	
Origem	Brasil	
Resultado	Aprovado	
Principais Componentes (aprox.)	D-limomeno=92%	

**Responsável**

Ademar Menezes Jr.

CREA:5060000803

Eng. Agrônomo





## Laudo Técnico

Rua Otto Benz, 544 – Nova Ribeirânia – Cep.:14096-580  
 Ribeirão Preto – SP - Fone/Fax:(16)2133-4466  
 CNPJ:08.898.383/0001-79 / IE:582.741.351.117

**Produto: Óleo Essencial de Limão Tahiti**  
*(Citrus aurantifolia)*

**Lote:** 116

**Fabricação/Validade(mês/ano):** Dezembro/2012 – Junho/2014

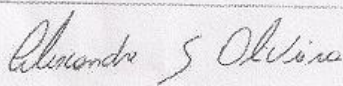
**CAS Number:** 8008-26-2

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Verde	Verde
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Cítrico - Característico	Cítrico - Característico
Densidade(20°C)	0,868	0,855 – 0,875
Índice de Refração(20°C)	1,478	1,470 – 1,490
Data da Análise	07/02/2013	
Origem	Brasil	
Resultado	Aprovado	
Principais Componentes (aprox.)	D-limomeno=55% Terpinemo=5% P-cimeno=8% A-pinemo=5% Mirceno=1,5% Neral=0,5%	

*Ademar Menezes Jr.*  
**Responsável**

Ademar Menezes Jr.  
 CREA:5060000803  
 Eng. Agrônomo

## APÊNDICE B

<b>NEON</b>		<b>LAUDO DO PRODUTO</b>	
<p style="text-align: right;">Neon Comercial Ltda  CNPJ: 00.327.149/0001-80 I.E.: 114235121114  Rua Roberto Koch, 67  CEP: 04221-060 - Vila Independência, São Paulo-SP  Tel: (11)2219-9999 Fax: (11)2219-9999</p>			
Nome	Timol	Número CAS	<b>89-83-8</b>
		Nro. de Lote	18467
Fórmula Molecular	2-[(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH]C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -5-(CH <sub>3</sub> )OH	Fabricação	03/12/2013
Peso Molecular	150,22	Validade	02/12/2016
<b>Determinação</b>		<b>Especificação</b>	<b>Resultado</b>
Aparência		= Cristais incolor à branco	cristais incolor à branco
Ponto de fusão		entre 48,0°C e 51,0°C	49,9 °C
Solubilidade em etanol		= Solúvel	solúvel
Aparência da solução de solubilidade		= Líquido límpido incolor	líquido límpido incolor
Obs:	Produto classificado como reagente analítico Uso para laboratório de controle de qualidade e fins industriais Proibida a venda para menores de 18 anos NFe Nro.: 34838 - CNPJ: 96193636000176 - Nome: Jose Marcos Liceras EPP Endereço: Rua Rafaela Gabriel Lopes, 151 - Conjunto Habitacional Jardim das Palmeiras 1 - Ribeirão Preto/SP		
			
<hr/> <b>Alexandre Oliveira (CRQ 4264809-IV Reg.)</b> Responsável Técnico			
Observações Gerais			
<hr/>			
27/5/2015 14:36:50	Neon	Página 1/1	
www.neoncomercial.com.br			

## APÊNDICE C



Ribeirão Preto, 21 de fevereiro de 2013

Prezado (a) Pesquisador (a) Renê de Oliveira Beleboni,

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTHELMINTICA IN VITRO E IN VIVO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DAS FAMÍLIAS ASTERACEA, LAMIACEAE E RUTACEAE CONTRA HAEMOCHUS**” tendo como pesquisador Renê de Oliveira Beleboni, registrado sobre o **ComÉt: 042/2012**

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

*Prof.ª Dr.ª Luciana Rezende Alves Oliveira*  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da UNAERP  
Universidade de Ribeirão Preto

Av: Costabile Romano, 2201 – Bairro Ribeirânia – Ribeirão Preto-SP - CEP. 14096-380 Fone: (16) 3603-6915  
e-mail [cetica@unaerp.br](mailto:cetica@unaerp.br)

## APÊNDICE D

EXAME LABORATORIAL ENSAIOS <i>IN VIVO</i>																									
		Controle Negativo Salina										Tratamento 300 mg/mL													
		Animal 5		Animal 11		Animal 12		Animal 14		Animal 22		Animal 26		Animal 7		Animal 16		Animal 20		Animal 23		Animal 27		Animal 35	
		Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14
Hemácia 10 <sup>6</sup> /uL 8,0 - 16	4,8	8,8	8,7	6,4	6,6	8,3	3,8	4,4	8,1	8,2	9,4	8,4	8,0	6,6	9,7	9,0	6,7	5,3	10,9	8,1	7,2	9,7			
Hematóc. (%) 24 - 50	15	29	27	16	17	20	11	13	22	20	24	22	25	17	29	25	17	15	30	22	21	28			
Hemogr. g/dL 8,0 - 16	6,8	11,7	11,6	7,2	7,6	9,2	4,8	5,6	9,2	10,2	11,5	10,1	10,7	8,6	12,1	11	7,3	6,5	13,2	9,9	9	12,8			
Leucócito 10 <sup>3</sup> /uL 4 - 12	9,8	7,8	6,6	11,1	7,4	7,1	9,4	6,9	8,0	8,6	6,8	6,5	7,7	8	5,8	5,1	11	12	7,8	8,8	6,7	9,3			
Basófilo 10 <sup>3</sup> /uL 0 - 0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Eosinófilo 10 <sup>3</sup> /uL 0,04 - 1,2	0,098	0,078	0,066	0,222	0,296	0	0	0,207	0	0,172	0,204	0,455	0	0,08	0,116	0,306	0,22	0	0	0,088	0,201	0			
Neut. Bast. 10 <sup>3</sup> /uL 0 - 0,2	0	0	0	11,1	0,074	0	0,094	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Neut. Seg. 10 <sup>3</sup> /uL 0,4 - 6,0	7	3,2	3,1	7,8	4,7	2,4	6,6	4,0	4	4,8	3,9	2,1	4,6	5,2	2,9	2,6	5,5	5	4,2	5,8	2,8	5,8			
Linfócitos 10 <sup>3</sup> /uL 1,6 - 9,0	2,6	4,1	3,1	2,8	2,2	4,5	2,6	2,6	1,74	3,3	2,6	3,7	2,9	2,7	2,5	2	4,9	4	3,2	2,9	3,6	3,3			
Monócito 10 <sup>3</sup> /uL 0,04 - 0,7	0	0,312	0,198	0	0	0,071	0	0	0,058	0,258	0	0,13	0,154	0	0,174	0,051	0,33	0	0,237	0	0,067	0,093			
Uréia mg/dL 17 - 43	48	53	54	40	45	39	47	33	39	40	41	47	39	37	38	40	41	41	43	42	43	37	41		
Creat. mg/dL 1,0 - 2,7	0,8	0,9	0,9	1,1	0,7	0,7	0,9	0,9	0,8	1,1	1,1	1	1,3	1,3	1,4	1	1,4	1,1	0,7	1,2	1	1,1	1,4		
ALT/TGP U/L 50 - 80	15	20	10	26	26	26	20	15	10	31	20	20	20	26	15	36	20	20	10	26	20	15	26		
AST/TGO U/L 98 - 278	83	104	89	73	62	83	78	309	99	52	73	99	105	78	73	125	132	62	104	89	94	65	57		