



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

Andiara Moraes Evangelista **Barbieri**¹; Helder **Louvandini**², Rafael Canonenco de **Araujo**³;
Luciana Morita **Katiki**⁴

RESUMO – A ovinocultura enfrenta um grande problema sanitário na produção, que é a infecção por nematoides gastrointestinais, principalmente o *Haemonchus contortus*. O controle químico com fármacos de largo espectro, devido o uso incorreto e indiscriminado, acarretou em queda da eficácia anti-helmíntica através da seleção de parasitas resistentes. A fitoterapia e o uso de óleos essenciais podem vir a ser alternativas no controle de parasitoses gastrointestinais de pequenos ruminantes. A ação terapêutica desses óleos está frequentemente associada a metabólitos secundários, que agem diretamente sobre esses nematóides. Esse trabalho teve por objetivo testar in vitro os óleos essenciais Timol, Cinamaldeído, Carvona, Carvacrol, Anetol, Linalol, Vanilina, Cineol, Limoneno e Eugenol para a comprovação da ação anti-helmíntica destes. Cada óleo foi solubilizado com detergente Tween e água destilada. Para os testes in vitro, concentrações decrescentes desta solução (2,08 mg/ml, 1,04 mg/ml, 0,39 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,02 mg/ml e 0,007 mg/ml) foram adicionadas aos ovos de *Haemonchus contortus* em placa de 48 poços, sendo incubados por 24 horas a 27 °C para a avaliação de sua eficácia. Os dados foram analisados com o programa SAS Probit para estimar CL₅₀ e as variáveis independentes (dose) transformadas por logaritmo natural (log dose). Conclui-se que o óleo Cinamaldeído apresentou a menor dose de CL₅₀ (0,018 mg/ml) e melhor eficácia no controle da eclodibilidade, seguido dos óleos Anetol, Carvona, Carvacrol e o Timol, respectivamente. Já os menos eficientes foram, respectivamente, o Limoneno e Cineol, que apresentaram elevadas doses de CL₅₀.

Palavras-chaves – Fitoterápicos; Óleos essenciais; Nematoides gastrointestinais; *Haemonchus contortus*; ovinos.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, FAC, Campinas/SP; andiaraevangelista@yahoo.com.br

2. Colaborador, CENA – USP – Piracicaba/SP

3. Colaborador, GRASP – Curitiba/PR

4 Orientadora, Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP; lmkatiki@iz.sp.gov.br



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT – *The sheep industry is facing a major health problem in the production, which is infection with gastrointestinal nematodes, Haemonchus contortus mainly. Chemical control drugs with broad spectrum, because the incorrect and indiscriminate use, resulted in decreased anthelmintic effectiveness through selection of resistant parasites. Phytotherapy and the use of essential oils have been alternatives in the control of gastrointestinal parasites in small ruminants. The therapeutic action of these oils is frequently associated with secondary metabolites, which act directly on hatching and mortality of these nematodes. This study aimed to test in vitro the essential oils Thymol, Cinnamaldehyde, Carvone, Carvacrol, Anethole, Linalool, Vanillin, Cineol, limonene and Eugenol for attesting the anthelmintic action of these. Each oil was solubilized with detergent Tween and distilled water. For in vitro tests, decreasing concentration of this solution (2.08 µl/ml, 1.04 µl/ml, 0.39 µl/ml, 0.15 µl/ml, 0.06 µl/ml, 0.02 µl/ml and 0.007 µl/ml) were added to eggs of Haemonchus contortus in a 48-well plate and incubated for 24 hours at 27 ° C for the evaluation of their effectiveness. Data were analyzed with SAS Probit to estimate CL₅₀ and independent variables (dose) transformed by natural logarithm (log dose). It was concluded that the oil Cinnamaldehyde had the lowest CL₅₀ dose (0.018 mg / ml) and better effectiveness in controlling hatchability, followed by oils Anethole, Carvone, Carvacrol and Thymol, respectively. Since the least effective were, respectively, Limonene and Cineole that CL₅₀ showed high doses.*

KEY WORDS – Herbal Medicines; Essential oils; Gastrointestinal nematodes; *Haemonchus contortus*; sheep.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil é uma atividade econômica que está em franca ascensão. Esse crescimento foi impulsionado pelos elevados preços pago ao produtor na última década, tornando a atividade atraente e rentável (VIANA, 2008). Porém, os criadores de ovinos enfrentam um grande problema sanitário na produção, que é a infecção por nematóides gastrointestinais. A alta prevalência e a grande patogenicidade fazem do *Haemonchus contortus* uma das principais espécies de endoparasitos de ovinos no mundo. Pertencem à classe dos nematóides, vermes hematófagos que parasitam o abomaso dos ruminantes, onde os principais sintomas são a anemia, devido à quantidade de sangue ingerida pelo verme, e o edema submandibular, podendo facilmente levar ao óbito cordeiros e fêmeas peri-parturientes.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

O método mais utilizado para controlar o parasitismo gastrointestinal nos pequenos ruminantes é o controle químico com fármacos de largo espectro. Segundo LEATHWICK (2001) e MOLENTO (2004) o uso incorreto e indiscriminado desses produtos pelos criadores acarretou em queda da eficácia anti-helmíntica pela seleção de parasitas resistentes, havendo, em alguns casos, resistência múltipla (MEJÍA et al., 2003) causada por tratamento supressivo com diferentes bases sobre uma população de parasitas.

A fitoterapia (tratamento por meio de plantas) é uma das alternativas que vem sendo pesquisada como auxiliar no controle das parasitoses gastrintestinais de pequenos ruminantes (ALMEIDA et al., 2006). A ação terapêutica dos extratos vegetais (em nosso caso os óleos essenciais) está frequentemente associada a metabólitos secundários, onde suas funções biológicas são atribuídas a essas substâncias odoríferas, como: defesa contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda de água, aumento da temperatura e como inibidores de germinação (VITTI e BRITO, 2003).

Os óleos essenciais apresentam uma composição complexa de substâncias (SANTOS et al 2004). MACEDO (2009 e 2011) e CAMURÇA-VASCONCELOS (2007) relataram que os óleos essenciais extraídos de algumas espécies de plantas têm sido relatados com atividade nematicida e podem ser utilizadas como uma alternativa ecologicamente benéfica ao controle de nematóides. O mecanismo de ação destas substâncias pode ser diretamente sobre esses nematóides (BOSENBECKER, 2006), ou na indução de resistência, envolvendo mecanismos de defesa pré-existentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Unidade Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Genética e Reprodução Animal, no Instituto de Zootecnia em Nova Odessa-SP. Três cordeiros machos da raça Morada Nova, com aproximadamente 90 dias de vida, pesando entre 13,5 kg e 18,0 kg, foram infectados artificialmente e mantidos como doadores de ovos e larvas de *H. contortus* em baias coletivas para o uso dos testes *in vitro* dos óleos essenciais no controle de eclodibilidade de ovos do nematóide em questão.

2.1. Testes *in vitro* de eclodibilidade

Para os testes de eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* utilizou-se 5,0 g de fezes colhidas diretamente do reto do animal. Estas foram trituradas, misturadas com água (27° C) e em seguida filtradas em peneiras de 1,00 mm, 105 µm, 55 µm e 25 µm (nessa última, os ovos foram retidos).



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Os ovos retidos foram recuperados, adicionados em água destilada e centrifugados a 3000 RPM durante três minutos. O sobrenadante foi descartado. Ao conteúdo sedimentado foi adicionando água hipersaturada de NaCl, realizando-se uma nova centrifugação a 3000 RPM por três minutos. Após este processo os ovos encontravam-se na superfície e a sujidade mais densa no fundo do tubo. Os ovos, novamente recuperados com a peneira de 25 µm, foram lavados com água destilada e colocados em um Becker.

Para iniciar os testes foi feita uma contagem de 10 ul da solução de água destilada contendo os ovos, em cinco repetições, para se estimar a média de 100 ovos que seriam usados para os testes *in vitro*.

2.2. Óleos essenciais avaliados

Os óleos essenciais selecionados para os testes foram Timol, Cinamaldeído, Carvona, Carvacrol, Anetol, Linalol, Vanilina, Cineol, Limoneno e Eugenol. Em um tubo foram misturados 12,48 mg/ml do óleo essencial, solubilizados com Detergente Tween em 100 ul e adicionado 5887,52 mg/ml de água destilada para diluições. Conforme a Figura 1, os ovos de *H. contortus* foram adicionados em placa de 48 poços em concentrações decrescentes desta solução (2,08 mg/ml, 1,04 mg/ml, 0,39 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,02 mg/ml e 0,007 mg/ml), com seis repetições em cada concentração, incubados por 24 horas a 27 °C. Após a incubação, avaliou-se o número de ovos não eclodidos e de larvas que não sofreram a inibição dos óleos essenciais testados. Para avaliar a porcentagem de inibição natural dos ovos, realizou-se o controle apenas com água destilada.

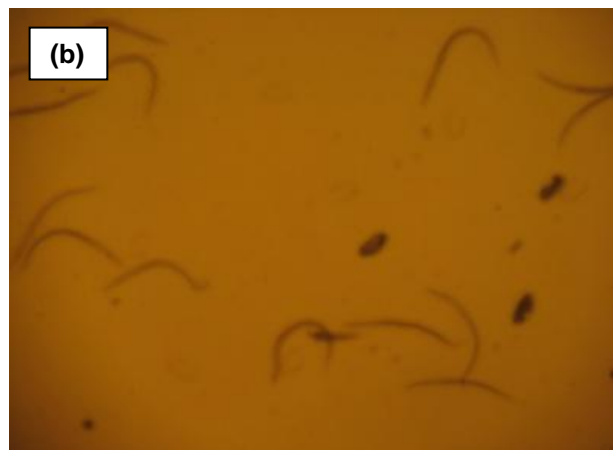
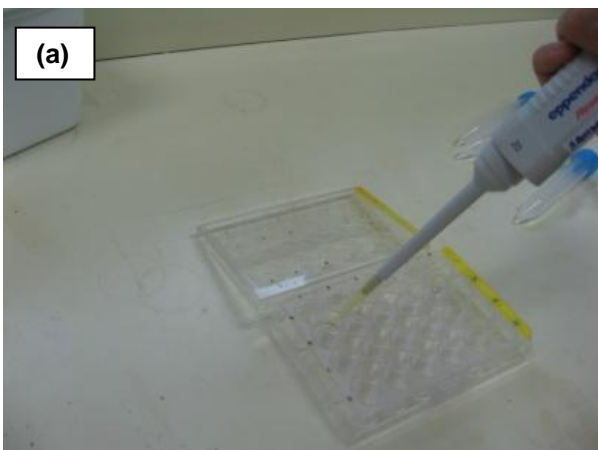


Figura 1. (a) Plaqueamento com os ovos de *H. contortus* e solução com óleo essencial. **(b)** Visão dos ovos e larvas para a contagem de eclosão.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

2.3. Análise estatística

As concentrações decrescentes foram realizadas para se obter a inibição máxima e mínima da eclodibilidade, através SAS Probit para estimar CL₅₀ e as variáveis independentes (dose) transformadas por logaritmo natural (log dose). A comparação entre as CL₅₀ permitiu o ranqueamento das soluções para a obtenção do óleo essencial com a menor dose e a maior eficácia no controle de eclodibilidade *in vitro* dos ovos de nematóides *H. contortus*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 observa-se que o óleo essencial com a menor dose e a maior eficácia no controle da eclodibilidade *in vitro* dos ovos de *H. contortus* foi o Cinamaldeído, que apresentou a dose de CL₅₀ muito menor que a dos outros óleos testado (0,018 mg/ml).

Bom desempenho anti-helmíntico também foi observado no Anetol (CL₅₀ de 0,07 mg/ml). Estudos realizados por CAMURÇA-VASCONCELOS (2006) também comprovam a atividade anti-helmíntica desse óleo em testes *in vitro* no controle de *H. contortus*, onde a inibição foi apresentada com doses de CL₅₀ de 0,69 mg/mL; e o Timol com dose de CL₅₀ de 0,55 mg/ml. O óleo essencial de *Lippia sidoides* apresenta 76,6% de Timol em sua composição e foi avaliado por CARVALHO et al. (2012) em teste de eclodibilidade obtendo valores de CL₅₀ de 0,04 mg/ml. Já em nosso teste, o Timol apresentou CL₅₀ de 0,13 mg/ml. A diferença desses resultados pode ter ocorrido devido os óleos essenciais serem compostos por mistas substâncias voláteis de porcentagens diferentes e que podem variar por causas multifatoriais. A conjugação e o sinergismo de diferentes compostos presentes no óleo essencial de *Lippia sidoides* permitiu uma melhora na sua atividade anti-helmíntica.

Os óleos essenciais Carvona (CL₅₀ de 0,085 mg/ml) e Carvacrol (CL₅₀ de 0,11 mg/ml) apresentaram boa eficácia com doses relativamente baixas. DAL POZZO (2010), em sua pesquisa, destacou o óleo essencial de Carvona como tendo atividade antimicrobiana sobre *Stapyilococcus sp.*, sendo uma alternativa de controle da mastite em bovinos leiteiros.

O óleo Linalol apresentou eficácia anti-helmíntica com uma dose CL₅₀ de 0,29 mg/ml. KNOBLOCH et al. (1989) constatou que o óleo de Linalol também apresenta significativa atividade antimicrobiana.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Tabela 1. Ranqueamento dos óleos essenciais no controle de eclodibilidade *in vitro* dos ovos de nematóides *Haemonchus contortus*.

Óleo essencial	Dose CL₅₀ (mg/ml)	Limite de confidencia
Cinamaldeído	0,018	0,017 - 0,019
Anetol	0,07	0,068 - 0,076
Carvona	0,085	0,081 - 0,088
Carvacrol	0,11	0,10 - 0,12
Timol	0,13	0,12 - 0,14
Linalol	0,29	0,27 - 0,31
Vanilina	0,57	0,47 - 0,71
Eugenol	0,57	0,53 - 0,62
Cineol	4,74	3,28 - 9,04
Limoneno	207,56	80,31 - 760,69

O óleo Eugenol apresentou atividade anti-helmíntica relativamente baixa quando comparada aos outros óleos, com CL₅₀ de 0,57 mg/ml. PESSOA et. al (2002) observou, em testes com Eugenol, atividade anti-helmíntica de 100% de inibição com soluções a 0,5% contra *H. contortus* em pequenos ruminantes. Resultado similar foi encontrado no óleo Vanilina, que também apresentou eficácia anti-helmíntica na dose CL₅₀ 0,57 mg/ml.

O óleo Cineol também apresentou baixa eficácia anti-helmíntica com CL₅₀ de 4,74 mg/ml, quando comparado com outros óleos, ficando a frente somente do Limoneno, que destoou apresentando dose muito alta CL₅₀ de 207,56 mg/ml. MACEDO (2009) avaliou atividade do óleo de *Ecalyptus globulus* (o Cineol é composto majoritário do extrato) e obtiveram CL₅₀ de 8,3 mg/ml.

O gráfico de testes de eclodibilidade apresentado na Figura 2 evidencia a variação dos seis melhores óleos, destacando a eficiência de inibição dos ovos de *H. contortus* conforme a diminuição das concentrações dos óleos na solução testada. Nele podemos observar a manutenção de 100% de eficiência do óleo Cinamaldeído até a concentração de 0,06 mg/ml, apresentando queda de eficiência após este valor. Para os óleos Anetol e Carvona a eficácia de 100% manteve-se até concentrações de 0,15 mg/ml, apresentando um queda abrupta de eficiência



até a concentração de 0,06 mg/ml. Já os óleos Carvacrol, Timol e Linalol obtiveram queda gradual desde as concentrações mais altas.

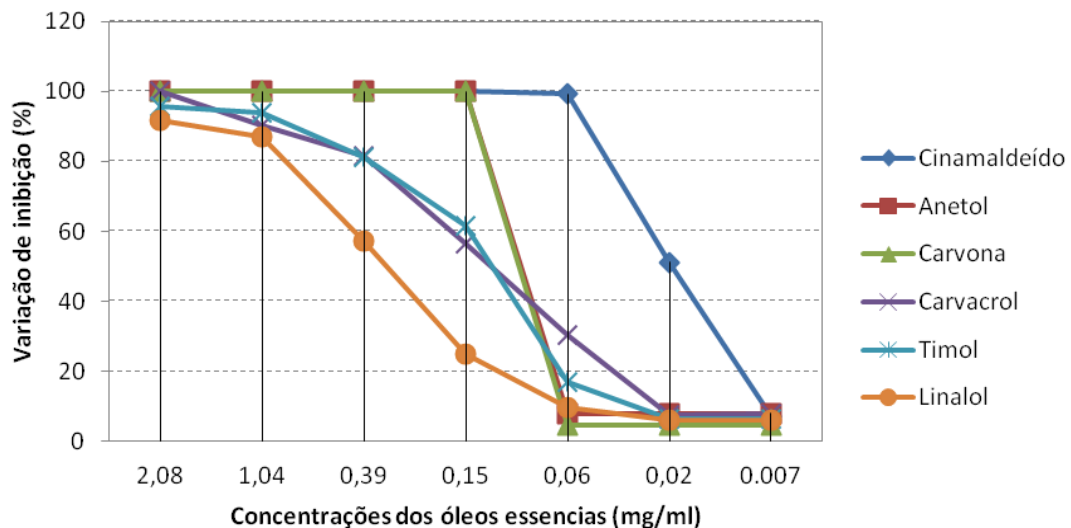


Figura 2. Gráfico de Testes de Eclodibilidade, evidenciando a variação de inibição de ovos de *H. contortus* (%) em diferentes concentrações dos óleos essenciais (mg/ml).

4. CONCLUSÃO

Conforme os resultados apresentados, os testes *in vitro* para avaliação de atividade anti-helmíntica de óleos essenciais, testados em diferentes doses, revelou o Cinamaldeído como o óleo mais promissor.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à minha orientadora Luciana Katiki, pelo acolhimento em seu laboratório e suporte na condução de todo trabalho, à FAPESP pelo financiamento do trabalho, ao Instituto de Zootecnia pela possibilidade de realização desta pesquisa e ao CNPq pela bolsa concedida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F.L.C.; PEREIRA, T.F.C. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro profissional veterinário. **Revista Verde de Desenvolvimento Sustentável**, v.1, p.67-74, 2006.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

BOSENBECKER, V. K. Efeitos de óleos essenciais de plantas bioativas no controle de *Phytophthora infestans* e *Meloidogyne javanica* em batata (*Solanum tuberosum* L.). **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 65 p, 2006.

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

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, 83 p, 2006.

CARVALHO, C.O, CHAGAS, A.C.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L.G.; CHAVES, F.C.; STEPHAN, M.P., BIZZO, H.R.; AMARANTE, A.F. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology n. 183**, p, 260-268, 2012.

CIAGRO – **Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br>>. Acesso em 2012

DAL POZZO, M. Mastite bovina e caprina: suscetibilidade de isolados de *Staphylococcus spp.* frente aos óleos essenciais extraídos de condimentos / **Tese** (mestrado) - 69 f, 2010.

KNOBLOCH, K., PAULI, A., IBERL, N., WEIGAND, N., WEIS, H.M. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, 1, p.119-128, 1989.

LEATHWICK, D.M.; POMROYB, W.E.; HEATHC, A.C.G. Anthelmintic resistance in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.49, n.6, p.227-235, 2001.

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

MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; AMÓRA, S.S.A. Avaliação do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.223-227, 2011.

MEJÍA, M.E.; FERNÁNDEZ IGARTÚA, B.M.; SCHMIDT, E.E.; CABARET J. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? **Veterinary Research**, v.34, p.461-467, 2003.

MOLENTO, M.B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl.1, p.82-87, 2004.

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

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado Técnico-Embrapa 99**: 1-6, 2004.

VIANA, J G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, p. 44 - 47, 2008.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo Essencial de Eucalipto. **Documentos florestais n. 17**, 2003.