

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA “IN VITRO” E “IN VIVO”
DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS PARA O CONTROLE DE
NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

LUCIANA MORITA KATIKI

Botucatu – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA “IN VITRO” E “IN VIVO” DE COMPOSTOS
FITOQUÍMICOS PARA O CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS
DE OVINOS

LUCIANA MORITA KATIKI

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de doutor

Orientador: Professor Adjunto Alessandro
Francisco Talamini do Amarante

Co-orientador: Dra Ana Carolina de
Souza Chagas

Co-orientador: Dr. Jorge Freire da Silva
Ferreira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Katiki, Luciana Morita.

Atividade anti-helmíntica in vitro e in vivo de compostos fitoquímicos para o controle de nematoides gastrintestinais de ovinos / Luciana Morita Katiki. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Co-orientador: Ana Carolina de Souza Chagas

Co-orientador: Jorge Freire da Silva Ferreira

Capes: 50502042

1. Ovino. 2. Haemonchus contortus. 3. Helminto.

Palavras-chave: Anti-helmíntico; Fitoterapico; Haemonchus contortus; In vitro, Óleo essencial, Ovino.

Nome do Autor: Luciana Morita Katiki

Título: ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA “IN VITRO” E “IN VIVO” DE
COMPOSTOS FITOQUÍMICOS SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE
OVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adjunto Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Presidente e Orientador
Departamento de Parasitologia
IB – UNESP – Botucatu

Profa. Adjunto Michiko Sakate
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Adjunto Regina Kiomi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Doutor Helder Louvandini
Membro
Laboratório de Nutrição Animal
Centro de Energia Nuclear na Agricultura-ESALQ-USP

Doutora Cecília José Veríssimo
Membro
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Zootecnia Diversificada
Instituto de Zootecnia - APTA- Nova Odessa

Data da Defesa: 20 de janeiro de 2011.

A percepção do desconhecido
é a mais fascinante das experiências.

O homem que não tem olhos
abertos para o mistério
passará pela vida
sem ver nada

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus

Ao meu marido Sussumu

Às minhas filhas Michelle e Nicole

Aos meus pais Luiz e Sadako

Aos meus parentes e amigos

Aos meus queridos animais

A presença de todos vocês

Faz-me acreditar

Que tudo é possível.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu professor e orientador Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante, pela oportunidade de ter sido sua aluna. Estou certa de que a liberdade concedida durante os trabalhos proporcionou o meu crescimento e também a alcançar resultados grandiosos no campo profissional e pessoal.

À minha co-orientadora Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, pela amizade, pelos ensinamentos, pela oportunidade de me encaminhar no estágio de doutorado nos Estados Unidos e por trabalhar no laboratório de sanidade animal da Embrapa para realização das pesquisas,

Ao meu co-orientador, Dr. Jorge Ferreira, pelo esforço e desdobramento que teve para que eu pudesse realizar o doutorado sanduíche nos Estados Unidos e pelo fato de sempre estar presente mesmo de tão longe,

À minha co-orientadora no exterior Dra. Anne Zajac, uma das melhores profissionais de parasitologia que conheci. Cuidou para que minha passagem nos Estados Unidos fosse bastante agradável e produtiva. Quase me senti “em casa”,

À Carol Masler, que pacientemente me ensinou tudo sobre o nematoide *Caenorhabditis elegans*,

Ao Dr. David Lindsay, que cedeu seu laboratório para pesquisa com o *C. elegans*,

Ao meu local de trabalho, Instituto de Zootecnia, que permitiu meu afastamento para meu aperfeiçoamento profissional,

À FMVZ-UNESP-Botucatu, minha escola desde a graduação, o meu local de estudos e de evolução profissional

À agencia financiadora do estágio de doutorado CAPES,

Às pessoas que dedicadamente colaboraram com os resultados dos trabalhos, o médico veterinário Mauricio Etechebere, a bióloga Camila Olivo Carvalho e a estudante de biologia Barbara Rubert,

Aos colaboradores das análises fitoquímicas Dr. Humberto Bizzo e Dr. Hector Juliani,

À Prof. Dra. Regina Takahira pela colaboração nas análises bioquímicas e comentários,

À professora da disciplina de ovinocultura Simone Fernandes por colaborar com os testes pilotos na fazenda Edgárdia e ao funcionário do departamento de parasitologia, Waldir, pela colaboração durante os trabalhos piloto com os ratos.

À todas as pessoas que de uma forma ou de outra colaboraram com este trabalho.

LISTA DE TABELAS

	página
TABELA 1: (Table 1) CL ₅₀ (µL/mL) and confidence limits of <i>Cymbopogon schoenanthus</i> , <i>Mentha piperita</i> and <i>Cymbopogon martinii</i> essential oils in egg hatch assay (EHA), larval development assay (LDA), larval exsheathment assay (LEA) and larval feeding inhibition assay (LFIA) against gastrointestinal nematodes of sheep.....	46
TABELA 2: (Table 2) CL ₉₉ (µL/mL) and confidence limits of <i>Cymbopogon schoenanthus</i> , <i>Mentha piperita</i> and <i>Cymbopogon martinii</i> essential oils in egg hatch assay (EHA), larval development assay (LDA), larval exsheathment assay (LEA) and larval feeding inhibition assay (LFIA) against gastrointestinal nematodes of sheep....	47
TABELA 3: (Table 3) Composition (%) and retention index of <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>Cymbopogon schoenanthus</i> and <i>Mentha piperita</i> essential oils obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry.	48
TABELA 4: (Table 4) Effect of solvents (DMSO, ethanol, methanol, acetone, Labrasol [®] , Tween 20 and Tween 80) in the adult <i>C.elegans</i> motility test. Results are the averages (two tests with six replicates each) in percent (%) of motile worms observed at each solvent concentration. Average % motile adult larvae in the M-9 control medium ranged from 95-100% 24 hours after incubation.....	59
TABELA 5 : (Table 5) Mean (standard deviation) of eggs per gram (EPG) of feces (transformed data (log ₁₀ (EPG + 1) from Wistar rats experimentally infected with <i>Strongyloides venezuelensis</i> and treated with albendazole, <i>C. schoenanthus</i> , <i>C. martinii</i> and <i>M. piperita</i> essential oils.....	73
TABELA 6: (Table 6) Mean (standard deviation) worm burdens from small intestine of Wistar rats experimentally infected with <i>Strongyloides venezuelensis</i> after treatment with albendazole, <i>C. schoenanthus</i> , <i>C. martinii</i> , and <i>M. piperita</i> essential oils.....	74
TABELA 7: (Table 7) Composition (%) and retention index (RI) of	

<i>Cymbopogon martinii</i> , <i>Cymbopogon schoenanthus</i> and <i>Mentha piperita</i> essential oils analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry.....	75
TABELA 8: (Table 8) Mean (standard error) of log-transformed values of fecal egg count (log FEC) at before, 1, 5 , 10 , 15 and 20 days after treatment and log-transformed total worm count (TWC) from lambs artificially infected with <i>Haemonchus contortus</i> and treated with <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil at doses of 0.2 mL/kg or 0.4 mL/kg.....	92
TABELA 9: (Table 9) Mean (standard error) of packed cell volume (PCV) and total seric protein (TSP) evaluated before and at 5, 10 and 20 days from lambs artificially infected with <i>Haemonchus contortus</i> and treated with <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil at doses of 0.2 mL/kg and 0.4 mL/kg.....	95
TABELA 10: (Table 10) Mean (standard error) percentage of <i>in vitro</i> test egg hatch assay (EHA) and larval development assay (LDA) of <i>Haemonchus contortus</i> from lambs at 1, 5, 10 and 15 days after treatment with 0.2 mL/kg, 0.4 mL/kg <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil.....	96
TABELA 11: (Table 11) Mean (standarderror) of serum urea and creatinine evaluated before and at 5, 10 and 20 days from lambs artificially infected with <i>Haemonchus contortus</i> and treated with <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil at doses of 0.2 mL/kg and 0.4 mL/kg.....	97
TABELA 12: (Table 12) Mean (standard deviation) of albumine, liver biochemical enzymes alkaline phosphatase (AP), aspartate amino transferase (AST) and gama glutamyl transferase (GGT) evaluated before, at 5, 10 and 20 days from lambs artificially infected with <i>Haemonchus contortus</i> and treated with <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil at doses of 0.2 mL/kg and 0.4 mL/kg.....	98
TABELA 13: (Table 13) Retention index (RI), retention time (RT), components and their relative percentage in <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil according to Wiley 275 spectra library....	99

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1: Aspecto foliar do gênero <i>Cymbopogon spp.</i>	12
FIGURA 2: Aspecto foliar da espécie <i>Mentha piperita</i>	13
FIGURA 3: Ovos de tricostrongilídeos não eclodidos e larvas de primeiro estágio ao microscópio óptico em aumento x40	15
FIGURA 4: Larvas de tricostrongilídeos de primeiro estágio que se alimentaram com <i>Escherichia coli</i> marcada com fluoresceína ao microscópio de fluorescência em aumento x40	16
FIGURA 5: Larvas de tricostrongilídeos de terceiro estágio em microscópio óptico com aumento x 40.....	17
FIGURA 6: (Figure 6) Mean (standard error bar) of <i>Haemonchus contortus</i> adults parasites counting (males and females) and total count in artificially infected lambs after treatment with <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil during three consecutive days at a dose of 0.2 and 0.4 mL/kg.....	93
FIGURA 7: (Figure 7) Mean (standard error bar) of fecal egg count (FEC) evaluated before, at 1, 5, 10, 15 and 20 days from lambs artificially infected with <i>Haemonchus contortus</i> after treatment with <i>Cymbopogon schoenanthus</i> essential oil at doses of 0.2 mL/kg and 0.4 mL/kg.....	
FIGURA 8: Infecção artificial subcutânea de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em ratos Wistar na prega da virilha.....	101
FIGURA 9: <i>Haemonchus contortus</i> adultos machos com espícula (seta para cima) e fêmea com útero em formato espiralado(seta para baixo) registrados por meio de lupa durante a contagem total de parasitas presentes no abomaso.....	103

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO 1	
1-INTRODUÇÃO.....	1
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Helmintos gastrintestinais.....	4
2.2 Resistência anti-helmíntica.....	5
2.3 Uso de compostos fitoquímicos	6
2.3.1 Óleos essenciais.....	7
2.3.2 Óleos essenciais no controle de parasitas.....	9
2.3.2.1 Óleo essencial de <i>Cymbopogon martinii</i>	10
2.3.2.2 Óleo essencial de <i>Mentha piperita</i>	12
2.3.2.3 Óleo essencial de <i>Cymbopogon schoenanthus</i>	13
2.4 Testes in vitro.....	14
2.4.1 Teste de inibição da eclodibilidade dos ovos.....	15
2.4.2 Teste da inibição da alimentação de L1.....	16
2.4.3 Teste da inibição da perda da cutícula de L3.....	16
2.4.4 Teste de inibição do desenvolvimento das larvas.....	17
2.4.5. Atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i> de extratos de plantas	17
2.5 <i>Caenorhabditis elegans</i>	19
2.5.1 <i>C.elegans</i> como método de screening para droga anti-helmíntica.....	20
2.5.2 Comparando ovos de <i>C.elegans</i> com ovos de <i>Haemonchus contortus</i>	22
2.5.3 Atividade nematicida de plantas medicinais avaliadas em testes com <i>C.elegans</i>	23

2.5.4 Como se determina a concentração eficiente de um anti-helmíntico?.....	24
2.5.5 Avanços no conhecimento da farmacologia das drogas baseado em mecanismos de resistência do <i>C.elegans</i>	25
2.5.6 Descoberta da nova geração de anti-helmínticos.....	26
2.6 Testes in vivo.....	26
2.7 Toxicidade.....	30

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO: <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>Cymbopogon schoenanthus</i> and <i>Mentha piperita</i> essential oils evaluated in different <i>in vitro</i> tests against sheep gastrointestinal nematodes.....	
Abstract.....	33
Introduction.....	34
Materials and Methods.....	35
Results.....	39
Discussion.....	39
References.....	43

CAPÍTULO 3

TRABALHO CIENTÍFICO: Improved <i>in vitro</i> test using <i>Caenorhabditis elegans</i> as a model to screen plant extracts for potential use against nematodes of veterinary importance.....	
Abstract.....	51
Introduction.....	52
Materials and Methods.....	53
Results and Discussion.....	55
Conclusions.....	56
References.....	57

CAPÍTULO 4

TRABALHO CIENTÍFICO: Anthelmintic activity and toxicity of *Cymbopogon schoenanthus*, *Cymbopogon martinii* and *Mentha piperita* essential oils against *Strongyloides venezuelensis* in artificially infected Wistar rats.

Abstract.....	61
Introduction.....	62
Materials and Methods.....	63
Results.....	66
Discussion.....	66
References.....	70

CAPÍTULO 5

TRABALHO CIENTÍFICO: Anthelmintic activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil against *Haemonchus contortus* artificially infected in Santa Ines lambs.

Abstract.....	79
Introduction.....	79
Materials and Methods.....	80
Results.....	84
Discussion.....	85
References.....	89

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO GERAL.....	100
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	104
CONCLUSÕES GERAIS.....	105
BIBLIOGRAFIA.....	106
Anexos.....	120

KATIKI, L.M. **Atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* de compostos fitoquímicos sobre nematoides gastrintestinais de ovinos.** Botucatu, 2011. 135p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus* foram avaliados *in vitro* sobre tricostrongilídeos de ovinos por meio dos testes de eclodibilidade, do desenvolvimento, da inibição da alimentação e da eliminação da cutícula larvar. Utilizou-se cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas para identificação dos constituintes dos óleos. Os óleos apresentaram elevada atividade anti-helmíntica avaliada pela comparação de CL₅₀, sendo o *C. schoenanthus* o mais ativo. Os mesmos óleos foram testados em ratos Wistar infectados artificialmente com o parasita intestinal *Strongyloides venezuelensis* nas dosagens de 1,5 mL/kg e 2,3 mL/kg cada um. Os óleos não apresentaram efeito anti-helmíntico significativo medido pela contagem de ovos nas fezes e contagem parasitária quando comparado ao albendazol. *C. schoenanthus* foi o óleo essencial que apresentou melhor atividade anti-parasitária *in vitro* sobre trichostrongilídeos de ovinos, portanto, sua atividade foi testada *in vivo* em cordeiros artificialmente infectados com *Haemonchus contortus* nas dosagens de 0,2 e 0,4 mL/kg. A redução parasitária (por meio de contagem de ovos nas fezes e contagem parasitária) e a toxicidade (por meio de perfis bioquímicos renal e hepático) foram avaliadas. O óleo essencial de *C. schoenanthus* não foi tóxico nas dosagens utilizadas e embora não tenha propiciado redução significativa no grau de infecção parasitária, proporcionou maior valor de hematócrito e proteína sérica total. Além desse efeito, causou discreta redução no desenvolvimento de larvas nas fezes. Uma metodologia aperfeiçoada de teste *in vitro* utilizando o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, mantidos em cultura líquida estéril, também foi descrito, assim como os testes de sensibilidade destes nematoides aos principais solventes utilizados na preparação dos extratos de plantas.

Palavras chaves: óleo essencial, anti-helmíntico, ovino, profilaxia, *Cymbopogon schoenanthus*, *Cymbopogon martinii*, *Mentha piperita*

KATIKI, L.M. ***In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of phytochemical compounds against sheep gastrointestinal nematodes.** Botucatu, 2011. 135p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Mentha piperita, *Cymbopogon martinii* and *Cymbopogon schoenanthus* essential oils were evaluated *in vitro* against sheep trichostrongylids through eclodibility assay, larval development assay, larval feeding inhibition assay and larval exsheathment assay. Oils were analysed by chromatography coupled to mass spectrometry. The oils presented high anthelmintic activity by comparison of LC₅₀, being *C. schoenanthus* is the most active. The oils were tested with Wistar rats artificially infected with *Strongyloides venezuelensis* at 1.5 mL/kg and 2.3 mL/kg. The essential oils didn't present a significant anthelmintic effect measured by fecal egg count and worm burden when compared to albendazole. The oil of *C. schoenanthus* had the best anthelmintic activity against sheep trichostrongylids and were evaluated *in vivo* in lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* at doses of 0.2 and 0.4 mL/kg. Its activity were evaluated by fecal egg count and worm burden and the toxicity evaluated by kidney and liver profile. *C. schoenanthus* did not show toxic effects at the doses tested and although without significant reduction in parasite infection, it led to a higher packed cell volume and total serum protein and small reduction in larval development in feces. An improved methodology of *in vitro* test employing the free living nematode *Caenorhabditis elegans* raised in sterile liquid medium was described as well the toxicity to the major solvents used in preparation of plant extracts.

Key words: essential oil, anthelmintic, sheep, , prophylaxis, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus*, *Mentha piperita*

CAPÍTULO 1

1-INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil é uma atividade econômica rural que está em franca ascensão, sendo que, a produção da carne é o principal objetivo desta produção. Este crescimento na atividade foi impulsionado pelos elevados preços pagos ao produtor na última década, o que tornou a atividade atraente e rentável. Atualmente, Brasil detém o 8º maior rebanho de ovinos e caprinos no mundo. A maior concentração dos rebanhos está no nordeste, contudo, São Paulo é o estado onde esta atividade econômica mais cresce no país (VIANA, 2008).

O maior problema sanitário encontrado nas criações de ovinos é a verminose. A infecção por nematóides gastrointestinais é uma das principais causas de imparidade na produção de pequenos ruminantes, com o agravante de que esta doença pode facilmente levar ao óbito. *Haemonchus contortus* é uma das espécies parasitárias mais importantes devido à sua alta prevalência e patogenicidade. O tratamento dessas infecções parasitárias está geralmente baseado em controles estratégicos utilizando-se anti-helmínticos. Contudo a resistência das principais espécies de nematóides a essas substâncias químicas é um fenômeno disseminado devido à presença de cepas emergentes com multiresistência, que podem resistir a todos os anti-helmínticos comercializados atualmente (HOUZANGBE-ADOTE et al., 2005).

A existência de resistência anti-helmíntica veio à tona nos meados de 1950 como resultado da falha da fenotiazina ao controle da hemoncose num rebanho de ovinos mantido em uma fazenda experimental do Kentucky, Estados Unidos. Atualmente encontram-se graus variados de resistência em populações de nematódeos em diversas localidades do mundo. O desenvolvimento da resistência anti-helmíntica tem resultado em diminuição da produtividade animal devido à pesada infecção. Considera-se resistência estabelecida quando uma droga previamente eficaz torna-se incapaz de eliminar a população parasitária exposta nas dosagens terapêuticas recomendadas (JABBAR, et al., 2006).

O aumento da prevalência de nematóides resistentes aos anti-helmínticos tradicionais tem sido a causa de diferentes programas de pesquisa que exploram medidas alternativas ao controle parasitário. Na história da humanidade, as pastagens, as partes de plantas e os extratos de plantas foram usados para combater o parasitismo. Em muitas partes do mundo, os produtos naturais ainda são usados com este propósito dado à continuidade do uso do

conhecimento tradicional ou também para evitar os elevados custos dos medicamentos de formulação industrial. Muitas plantas com valor fitoterapêutico têm sido descritas e têm demonstrado que algumas espécies podem reduzir o grau de infecção parasitária em ovinos. Dado o grande interesse em explorar a atividade anti-helmíntica de plantas ou seus produtos é compreensível que também haja um crescente interesse em encontrar o melhor meio de utilizar a sua bioatividade (JACKSON E GORDON, 2008).

A validação científica dos fitoterápicos é uma etapa obrigatória para a utilização correta das plantas medicinais para fins comerciais. Deste modo, os testes *in vitro* permitem avaliar uma possível propriedade anti-helmíntica, determinando o primeiro passo para a caracterização de substâncias ativas da planta e abrindo novas possibilidades para o controle das endoparasitoses. A etapa de validação de uma planta envolve vários testes que visam confirmar a sua eficácia e determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos. Os testes *in vitro* servem como uma indicação inicial e quando utilizados no início de uma triagem, permitem selecionar as plantas que apresentam melhores resultados, diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação. Para determinação do potencial anti-helmíntico *in vitro* de plantas podem-se utilizar nematóides de ovinos, além de ensaios com nematóides de vida livre, como o *Caenorhabditis elegans* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Somente após a obtenção de resultados promissores com os testes *in vitro*, passa-se aos testes *in vivo* em que se utilizam inicialmente animais de laboratório e, em seguida, os testes toxicológicos. Depois desta primeira etapa, podem ser realizados os testes com animais que representem a espécie alvo para a indicação terapêutica. Os testes de eficácia com animais de laboratório são chamados pré-clínicos e os testes com a espécie alvo são denominados clínicos. Os testes de eficácia com a espécie alvo devem ser os últimos testes a serem realizados numa pesquisa sobre atividade de plantas medicinais. O teste de redução da contagem de ovos nas fezes fornece uma estimativa da eficácia anti-helmíntica de um produto através da comparação da contagem de ovos nas fezes antes e após o tratamento. Pode-se realizar também o teste controlado com inoculação artificial de parasitos, tratamento com a planta desejada e necropsia ao final. Este teste é mais confiável, porém mais caro em termos de mão de obra e utilização de animais (TAYLOR et al., 2002; CAMURÇA-VASCONCELOS, et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* sobre

nematóides gastrointestinais de ovinos em testes *in vitro* e *in vivo* e também apresentar uma metodologia aperfeiçoada utilizando-se o nematóide de solo *Caenorhabditis elegans* em testes *in vitro* para diagnóstico de atividade anti-helmíntica de extratos vegetais.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Helmintos gastrointestinais

No aspecto sanitário, os helmintos gastrointestinais são os maiores responsáveis por perdas econômicas na produção de ovinos. Os gêneros de maior importância sanitária no mundo são: *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., *Cooperia* spp., *Teladorsagia* spp. e *Oesophagostomum* spp (VIANA, 2008).

A elevada prevalência devido às condições ambientais favoráveis, associada à sua patogenicidade, faz com que *Haemonchus contortus* seja a principal espécie que parasita ovinos no Brasil. Em seguida, em ordem de importância e prevalência, a espécie *Trichostrongylus colubriformis*. As infecções geralmente são mistas e pode ainda ocorrer a presença de *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp e *Strongyloides papillosus*. A principal consequência dessas infecções é o prejuízo econômico devido à redução de produtividade, mortalidade, despesas com mão de obra e antiparasitários (ALMEIDA et al., 2010).

O ciclo de vida do *Haemonchus contortus* envolve vários processos que começa com a oviposição das fêmeas adultas localizadas no abomaso, sendo os ovos liberados pelas fezes no meio ambiente, onde ocorre a eclosão com liberação de larvas de primeiro estágio (L1), que se desenvolve para L2 e L3 (larvas infectantes). As L3 são ingeridas pelo hospedeiro, fixam-se na mucosa abomasal, mudam para o estágio L4 e finalizam o ciclo tornando-se adulto. *Haemonchus contortus* adulto alimenta-se de sangue, sendo a perda estimada de 0,05 mL de sangue por parasito/dia. Em infecções elevadas, um animal pode albergar cerca de 1000 a 2000 parasitas e perda sanguínea estimada de 100 mL por dia. Os animais altamente parasitados podem apresentar anemia, hipoproteinemia, que pode ser fatal aos mais susceptíveis. Outras alterações clínicas como pelos arrepiados, emagrecimento, fezes escuras, fraqueza e edema submandibular podem se apresentar em maior ou menor grau. Outro agravante que perpetua o ciclo de *H. contortus* é que esse parasita produz cerca de 5000 a 10000 ovos/dia causando elevada contaminação das pastagens e re-infecções (DIEHL et al., 2004).

Fatores como idade, raça, imunidade, estados fisiológicos, nutricionais e manejo sanitário podem influir para uma maior infecção parasitária. Deste modo, animais jovens são

mais susceptíveis que adultos. Animais de raças lanadas, como Suffolk ou Ille de France, tiveram sua resistência aos nematóides avaliadas em relação à raça Santa Inês e foi provado que a raça nacional Santa Inês é mais resistente às infecções parasitárias (AMARANTE et al., 2004). As ovelhas no periparto (período que compreende o final da gestação e lactação) são altamente afetadas pelos parasitas gastrointestinais devido às alterações hormonais e nutricionais (AMARANTE, 1993). A deficiência protéica na alimentação pode predispor a uma menor resposta imune dos animais aos parasitas e, por outro lado, a suplementação protéica pode melhorar a resistência aos nematóides (BRICARELLO et al., 2005). O manejo sanitário inadequado, como por exemplo, superlotação de pastagens ou instalações inadequadas também pode favorecer uma maior infecção (COSTA et al., 2007).

2.2 Resistência anti-helmíntica

Em pequenos ruminantes a resistência anti-helmíntica aos nematóides tem sido um sério problema comprovado por estudos em todo o mundo, como por exemplo, Austrália, Nova Zelândia, Holanda, Reino Unido, Irlanda, entre outros. (WOLSTENHOLME et al., 2004) e também em rebanhos brasileiros localizados no Rio Grande do Sul (ECHEVARRIA et al., 1996), Paraná (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004), Santa Catarina (RAMOS et al., 2002), Ceará (VIEIRA & CAVALCANTE, 1999), Bahia (BARRETO et al., 2005) e Mato Grosso do Sul (SEZESNY-MORAIS et al., 2010) e São Paulo (ALMEIDA et al., 2010).

A ocorrência de resistência anti-helmíntica dos parasitas acontece quando a concentração usualmente indicada de uma droga não é suficiente para alcançar o grau de eficácia, com redução de carga parasitária inferior a 95%. Pode ser causada pela alta frequência de tratamentos, utilização de sub-dosagens e rotação contínua no uso de produtos químicos (MOLENTO et al., 2004).

Há várias hipóteses sobre os mecanismos de resistência dos parasitas às drogas: a primeira hipótese é a mudança molecular no sítio de atuação da droga, a segunda hipótese é a mudança no metabolismo que inativa ou remove a droga e a terceira hipótese é a mudança na distribuição da droga sobre os alvos moleculares do parasita. A situação da resistência dos parasitas é agravada pelo fato de que a ocorrência da resistência para cada classe química de anti-helmínticos geralmente confere resistência a outras classes, levando a situações de multi-resistência. Neste caso, os parasitas desenvolvem resistência sequencial, porém independente,

às diversas classes anti-helmínticas. Uma vez presente na população, a resistência não sofre reversão ou diminuição (WOLSTENHOLME et al., 2004).

Quando uma nova classe de anti-helmínticos é introduzida numa população de parasitas, a frequência de alelos que conferem resistência é baixa, indicando que na ausência de tratamentos, os alelos de resistência terão uma reprodução neutra ou negativa. (WOLSTENHOLME et al., 2004)

Entre as alternativas para se retardar a resistência anti-helmíntica, pode-se citar o controle seletivo que visa tratar somente os animais mais susceptíveis do rebanho (HOSTE et al., 2005), utilização de raças mais resistentes (AMARANTE et al., 2004), rotação de pastagens, pastejo rotacionado com outras espécies de animais (FERNANDES et al., 2004) e administração de produtos derivados de plantas (VIEIRA, 1999).

2.3 Uso de compostos fitoquímicos

A busca por compostos antiparasitários de origem vegetal deve-se primeiramente à escassez de compostos anti-helmínticos comerciais que eliminem os parasitas. Existem apenas nove grandes grupos químicos de medicamentos e grande parte dos nematóides já apresentam resistência à maior parte deles. (VERÍSSIMO et al., 2010). A natureza pode fornecer uma gama de compostos fitoquímicos ainda pouco estudados. Dentre as várias espécies de plantas existentes, alguma pode conter atividade anti-helmíntica. Outra razão pelo interesse em se pesquisar bioativos naturais para o controle de parasitos é a preocupação em se utilizar compostos antiparasitários que reduzam o problema da contaminação da fauna e flora e que não deixem resíduos tóxicos na carne e/ou leite destinados ao consumo humano (CHAGAS, 2004).

Plantas bioativas podem conter um grande número de metabólitos secundários, ou substâncias farmacologicamente ativas, que podem agir isoladas ou em combinação para produzir efeito direto ou indireto sobre parasitas no trato alimentar, levando à redução da sobrevivência, do crescimento e da fecundidade dos nematódeos. Os compostos de plantas também podem promover melhora na disponibilidade protéica para o hospedeiro e/ou ter efeito direto ou indireto sobre minerais ou elementos traços . É sabido que há muitos compostos bioquimicamente ativos que podem agir contra parasitas incluindo óleos essenciais, enzimas proteolíticas, lecitinas e polifenóis como os taninos (JACKSON & GORDON, 2008).

Segundo GITHIORI et al. (2006), dentro do conhecimento cultural há um grande número de plantas medicinais indicadas para doenças parasitárias. Por exemplo, sementes ou folhagens de plantas como alho, cebola, menta, noqueira, anis ou salsinha têm sido usados para tratar animais que sofrem de parasitismo por nematóides gastrointestinais, ao passo que sementes de pepino e abóbora têm sido associadas com a expulsão de cestóides do trato gastrointestinal. A administração de extratos de *Acacia e Artemisia* spp. é utilizada em animais infectados com endoparasitas enquanto que folha de tabaco é utilizada para o controle de ectoparasitas. Evidências de propriedades anti-helmínticas de plantas e extratos de plantas são derivadas principalmente de fontes etnoveterinárias. O uso de preparações etnoveterinárias tem sido documentado em diferentes partes do mundo. No entanto, a maioria das evidências citadas em fontes etnoveterinárias é encontrada na sua maior parte, na forma de observações empíricas, do que em estudos científicos controlados. Alguns estudos científicos têm comprovado a eficácia (HOGERDEN et al., 2003; IDRIS et al., 1982), enquanto outros têm demonstrado ausência de ação anti-helmíntica de certas plantas (GITHIORI et al., 2002, 2003, 2004; KETZIS et al., 2002). Os óleos essenciais estão sendo analisados e podem apresentar atividade anti-parasitária como foi observado por SQUIRES et al. (2010).

2.3.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico ou químico. Os óleos são encontrados em todas as estruturas vegetais, sendo mais frequentes em folhas, flores, frutos, e menos frequentes em raízes, rizomas, lenhos ou sementes. Ocorrem em diversos gêneros de plantas e constituem uma mistura complexa de substâncias apresentando estruturas químicas heterogêneas. São obtidos por diferentes processos, dependendo da localização no vegetal, da quantidade e das características requeridas para o produto final. As técnicas mais usuais para sua obtenção são: prensagem, extração com solventes orgânicos ou com gorduras, com fluido supercrítico ou destilação por arraste de vapor (ANVISA, BRASIL, 1999).

Quimicamente são compostos com baixo peso molecular, constituindo misturas variáveis de fenilpropanóides e terpenóides, especificamente monoterpenos e sesquiterpenos, embora diterpenos também possam estar presentes, além de uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas. Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais, atuando na atração de

polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados esteroidais apresentam uma gama de funções como proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (NIEIRO et al., 2006).

A composição química de uma mesma espécie vegetal pode variar de acordo com a parte da planta utilizada, como por exemplo, o óleo de laranja amarga (*Citrus aurantium*) quando obtido a partir das flores é rico em nerol, dos talos em linalol e acetato de linalila, e quando obtido dos frutos, é rico em limoneno (ROGERS, 1981).

Os óleos essenciais começaram a ser consumidos a partir da época das Cruzadas. Além da culinária, com fins de tempero e conservação dos alimentos, também foram usadas na preparação de óleos e unguentos, cosméticos e medicamentos. Atualmente, os óleos essenciais são empregados na indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e produtos sanitários, além de usados na aromaterapia. É estimado que cerca de 3000 óleos essenciais sejam conhecidos, dos quais aproximadamente 300 são comercialmente importantes, destinados principalmente para o mercado de fragrâncias (BURT, 2004).

Por se tratar de uma mistura de constituintes voláteis, os óleos essenciais brutos podem ser analisados diretamente por cromatografia gasosa, que é uma técnica que permite a separação de substâncias volatilizáveis. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias entre uma fase estacionária (sólida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra, através do sistema de injeção é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. Temperaturas adequadas, no local da injeção e na coluna, possibilitam a vaporização dos componentes da amostra, os quais, de acordo com as suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos variáveis e chegam ao final da coluna em tempos diferentes. Um detector adequado, na saída da coluna, permite a detecção e a quantificação das substâncias. A análise qualitativa ou identificação da natureza química dos componentes da amostra é obtida pela comparação dos tempos de retenção de um padrão com o da amostra feita pela espectrometria de massas acoplada após o detector. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) permite a detecção da qualidade e o valor de mercado de um óleo essencial (COLLINS, 2006).

Devido à sua frequente presença nos vegetais e à variedade de composição química, os óleos essenciais constituem objeto de extensivos estudos visando identificar atividades biológicas e os resultados apontam um potencial terapêutico importante. Porém, devido à

complexidade química, torna-se difícil relacionar a atividade com as substâncias presentes. Porém, em alguns casos, o óleo de uma planta pode apresentar um constituinte majoritário, como o *Cymbopogon martinii* que contém mais de 80% de geraniol, tornando mais evidente a correlação entre a química e a atividade biológica. Entretanto, substâncias presentes em menor quantidade podem contribuir, pelo menos em parte, para a ação biológica possivelmente por sinergismo entre os componentes. Também a variação da constituição associada à existência de diferentes quimiotipos das espécies (ocasionados por fatores genéticos e influência do meio ambiente sobre o metabolismo dos terpenóides) entre outros, são fatores que dificultam a determinação inequívoca da atividade. Assim inúmeras investigações são realizadas com componentes isolados (TEPE et al., 2005).

Dentre as principais atividades farmacológicas dos óleos essenciais destacam-se antimicrobiana (CHENG et al., 2006), antioxidante (MATSINGOU et al., 2000), anti-inflamatória (PEANA et al., 2004), antiparasitária (PESSOA et al., 2002), anticonvulsivante (SILVA BRUM et al., 2001), sedativa (PERAZZO et al., 2003), antitumoral (KIM et al., 2003), inseticida (YANG et al., 2005) e promotores de absorção de fármacos (GHAFOURIAN et al., 2004).

O potencial deste grupo de compostos (terpenos) para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos parece ser evidente. Resultados promissores relatados indicam a possibilidade do uso terapêutico mais intenso de óleos voláteis e de substâncias isoladas. Alguns produtos recentemente lançados no mercado incluem Acheflan[®] produzido em extratos da erva baleeira *Cordia verbenaceae*, contendo alfa-humuleno, com indicação como anti-inflamatório de uso tópico para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais. Produtos como o Rowachol[®], indicado para cálculos biliares e como colerético e colagogo, contém b-borneol, alfa-pineno, canfeno, 1,8-cineol, mentona e mentol e Rowatinex[®], com indicação para urolitíase apresentando princípios ativos 1,8-cineol, alfa pineno, canfeno, fenchona, borneol e anetol, demonstrando a potencialidade deste grupo químico (OLIVETTI, 2005).

2.3.2 Óleos essenciais no controle de parasitas

Vários óleos essenciais de plantas medicinais têm sido testados *in vitro* para avaliação de atividade anti-helmíntica. GARG & SEEMA (1993) demonstraram que o óleo essencial das flores de *Eupatorium triplenerve* (Japaná roxa) apresentou boa eficácia contra *Ascaris lumbricoides* e *Taenia solium*.

O óleo essencial de *Zanthoxylum limonella* tem como principal constituinte o L-sabineno. A atividade anti-helmíntica, *in vitro*, do óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum limonella* contra *Taenia solium*, *Ascaridia galli* e *Pheritima postuma* foi superior ao do fosfato de piperazina (KALYANI et al., 1989; PESSOA, 2002).

O óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (Asteraceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) e Eugenol foram avaliados contra *Haemonchus contortus*. Na concentração de 1%, o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e eugenol demonstraram inibição máxima de eclodibilidade (100%) e o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* mostrou inibição de eclodibilidade de 99,9% (PESSOA et al., 2002).

O óleo essencial de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* foram investigados contra o *Haemonchus contortus*. Na concentração de 1% houve 100% da inibição da eclosão dos ovos para óleo essencial de *C. zehntneri* e 90,9% para o óleo essencial de *L. sidoides* (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2007).

SQUIRES et al. (2010) trataram gerbils artificialmente infectados com *H. contortus* com uma emulsão de óleo essencial de laranja a uma dosagem de 1200 mg/kg durante 5 dias para avaliação anti-helmíntica e encontraram redução de 87,8% dos parasitas. Os autores atribuíram a atividade nematicida ao constituinte majoritário limoneno, que neste óleo estava presente em 95% da composição total.

Os óleos essenciais de três espécies de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana*) foram testados sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. O óleo essencial de *E. citriodora* matou 100% dos carrapatos a uma concentração média de 17,5% e o de *E. globulus* a 15% e o de *E. staigeriana* a 12,5%. No entanto, quando esses óleos foram transformados em um concentrado emulsionável, eles mataram 100% dos carrapatos a uma concentração média de 9,9% do *E. globulus* e 3,9% do *E. staigeriana* (CHAGAS et al., 2002).

2.3.2.1 Óleo essencial de *Cymbopogon martinii*

Também conhecido como óleo essencial de Palmarosa é originário do Nepal, sendo cultivado em larga escala no Brasil, Índia e América Central. O óleo de *C. martinii* (Figura 1) tem aparência fluido-líquida, coloração amarela pálida, odor doce e floral similar ao de rosas. Para o uso industrial é empregado como fragrância de cosméticos e aromatizantes de cigarros.

O uso popular o indica como estimulante do apetite, tônico nas convalescenças e anorexia. Além disso, é popularmente conhecido por possuir propriedades antibióticas, antifúngicas, antivirais, vermífuga, digestiva, emoliente e cicatrizante (NATURAL RESOURCE INDUSTRIES, 2007).

O óleo essencial de *C. martinii* foi analisado por cromatografia gasosa num trabalho realizado por PRASHAR et al. (2003) que determinaram em suas amostras 65% de geraniol e 20% de acetato de geraniol. Neste estudo encontraram propriedades antimicrobianas contra o *Saccharomyces cerevisiae* e as atribuíram principalmente ao composto geraniol.

PATTNAIK et al. (1996) determinaram que o óleo essencial de Palmarosa tem atividade antibacteriana contra 21 bactérias (incluindo cocos e bastonetes gram positivos e bastonetes gram negativos) e 12 tipos de fungos (3 leveduras e 9 filamentosos) pelo método de difusão por disco. Estudos com a *Escherichia coli* enteropatogênico (EPEC) e enterotoxigênico (ETEC) demonstraram que o óleo essencial de *C. martinii* também apresenta atividade contra esses patógenos e os principais constituintes de ação bactericida são o limoneno, geraniol, geraniol, transgeraniol, transcariofileno e acetato de geraniol (DUARTE, 2006). O geraniol foi testado como acaricida sobre as larvas e teleóginas do carrapato *B. microplus* e teve ação acaricida potencializada quando adicionada ao composto citrionelal (MARTINS et al., 2006).

Como anti-helmíntico, o óleo essencial de *C. martinii* e o seu principal constituinte, o geraniol foi testado *in vitro*, utilizando o nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Ambas as substâncias demonstraram potente atividade anti-helmíntica. A DE50 do geraniol foi determinado a 66,7 mcg/mL, sugerindo que o geraniol pode ser um princípio anti-helmíntico do óleo de Palmarosa (KUMARAN et al. 2003).

Estudos foram conduzidos para avaliar a ação repelente do *C. martinii* contra mosquitos sob condições experimentais. Resultados revelaram que o óleo apresenta forte ação repelente e dá proteção absoluta por 12 horas contra *Anopheles culicifacies*, contra *A. annularis* e contra *A. subpictus*. A proteção contra *Culex quinquefasciatus*, foi de 96,3% por 12 horas (ANSARI & RAZDN, 1994).



FIGURA 1: Aspecto foliar do gênero *Cymbopogon spp.*(Graminae ou Poaceae)

2.3.2.2 Óleo essencial de *Mentha piperita*

Derivada da planta conhecida como hortelã pimenta, da família Lamiaceae (Figura 2), a *M. piperita* é bastante conhecida como vermífuga em estudos etnoveterinários de muitos países. É composta primariamente por mentol e mentona. Outros possíveis constituintes incluem a pulejona, mentofurano e limoneno. Possui atividade bactericida, anti-fúngica (MUCCIARELLI et al., 2003), anti-viral, elevada ação anti-oxidante e anti-tumoral *in vitro*. Em modelo animal, a *M. piperita* demonstrou atividade analgésica, anestésica sobre o sistema nervoso central e periférico, ação imunomoduladora e quimiopreventiva. Em estudos com humanos, o óleo essencial apresentou ação sobre o trato respiratório e o efeito analgésico também foi relatado. Reações adversas à *M.piperitana* forma de chá não foram relatadas, no entanto, deve se ter cuidado na administração do óleo essencial principalmente em pacientes com refluxo gástrico, hérnia de hiato ou pedras no rim (McKAY & BLUMBERG, 2006).

Em estudos toxicológicos, a *M. piperita* apresentou mínima toxicidade aguda oral. Em camundongos, preveniu alterações hepáticas induzidas por arsênico. No entanto, a pulejona em grandes quantidades (>200 mg/kg/dia) é reconhecida por sua hepatotoxicidade (SHARMA et al., 2007). Em testes intradérmicos, produziu moderada a severa reação em

coelhos, porém não foi fototóxica. Não apresentou fator de mutagenicidade e carcinogenicidade em camundongos e não apresentou nefrotoxicidade em testes com ratos (AKDOGAN et al., 2003).



FIGURA 2: Aspecto foliar da espécie *Mentha piperita* (Lamiaceae)

O óleo essencial de *M. piperita* apresentou atividade anti-parasitária relatada pela ação larvicida e repelente contra diferentes espécies de mosquito. As espécies *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* foram fortemente repelidas quando o óleo essencial de *M piperita* foi aplicado sobre a pele humana. A ação repelente foi comparável a um produto contendo dibutil e dimetil ftalatos (ANSARI et al., 2000). Utilizado também em fumigações em estoques de cereais contra insetos coleópteros (SHAAYA et al., 1991).

2.3.2.3 Óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus*

Planta pertencente à família Graminae (Poaceae é o nome oficial da família). Original da Índia, foi introduzida no Brasil durante o período colonial. Apresenta propriedades digestiva, sedativa e de uso na perfumaria, pois apresenta aroma forte e característico.

Também conhecido como capim-limão ou lemongrass. O óleo essencial de *C. schoenanthus* possui atividade anti-oxidante e inibidora da acetilcolinesterase medido pelo ensaio DPPH e atividade anti-oxidante medido pelo método β -carotene–linoleic acid bleaching (KHADRI et al., 2008).

Este óleo essencial também possui atividade nefroprotetora. Em estudos *in vivo*, ratos foram induzidos, quimicamente com ácido glicólico, a desenvolver pedras nos rins. Animais que receberam 1 mL de extrato de *C. schoenanthus* via oral diariamente tiveram menor incidência de nefrotoxicidade, elevação da uréia, creatinina e níveis de cálcio sanguíneo (AL-GHAMDI et al., 2007).

Alguns estudos provaram ação de controle biológico contra bruchídeos (besouros que atacam sementes de leguminosas). O óleo essencial de *C. schoenanthus* na concentração de 33,33 μ L/L, foi capaz de matar todos os insetos adultos em 24 horas e também inibir a oviposição e desenvolvimento larval (KETOH et al., 2005).

2.4 Testes *in vitro*

Embora o modelo *in vivo* dê uma noção acurada da atividade de substâncias usadas na medicina tradicional, o uso em muitos países é severamente restrita devido a conceitos econômicos e éticos. Esse fato tem resultado em uma disseminação de testes *in vitro* nos estudos etnofarmacológicos. Estes testes são muito úteis quando a identidade dos compostos responsáveis pela atividade biológica de um extrato está sendo investigado e quando a quantidade de material disponível é limitada. Porém, tem o inconveniente de se superestimar ou subestimar um resultado, pois o uso de *bioensaios in vitro* oferece um resultado incompleto do efeito de um extrato em um sistema como um todo, pois em testes *in vivo*, fatores como absorção no organismo e metabolismo das substâncias presentes, pode levar ao aumento ou diminuição dos efeitos dos compostos ativos (HOUGHTON et al., 2007).

O tempo e os custos financeiros envolvidos em programas de “screening” para medicamentos demonstram a importância da escolha de uma primeira fase *in vitro* que necessita ser sensível, barata e reprodutível. Tendo-se realizado essa primeira fase, há a redução no número de candidatos para as próximas fases. A segunda fase focará os princípios ativos, que é mais complexa e cara, pois à medida que se aumenta o grau de refinamento, os custos da descoberta também são adicionados. Posteriormente vem a farmacologia, segurança e toxicidade, que são dados que irão compor o trabalho. Sabendo-se da natureza dos

compostos bioativos, o modo de ação e seus alvos sobre os parasitas, então o processo levará à aplicação prática (JACKSON & GORDON, 2008).

Os dois principais processos *in vitro* são primeiramente a preparação do material contendo os parasitas, o isolamento dos diferentes estágios pré-parasitários do material fecal ou no caso do estágio parasitário avaliado e a recuperação do parasita do material coletado de seu sítio de predileção. O segundo e mais importante processo das técnicas *in vitro*, é a utilização de diferentes bioensaios, todos os quais mensuram a eficácia do material a ser testado em termos comparativos. Estes bioensaios avaliam os efeitos dos produtos derivados de plantas sobre o processo biológico vital (JACKSON & HOSTE, 2010).

Embora vários tipos de ensaios possam ser utilizados como uma triagem primária, o teste mais simples para o uso em primeira instância é o Teste de inibição da eclodibilidade. Os demais testes ficam para avaliação secundária devido ao elevado tempo que consome, desafios de técnicas ou ensaios caros (JACKSON & GORDON, 2008).

2.4.1 Teste de inibição da eclodibilidade dos ovos (Egg hatch assay)

Ovos são incubados em diferentes concentrações de substância teste em seis repetições por 48 horas, depois dos quais são avaliados os números de larvas e ovos não eclodidos. A concentração do produto que é necessária para inibir 50% da eclosão dos ovos é calculada para se determinar DL_{50} (BIZIMENYERA et al., 2006).



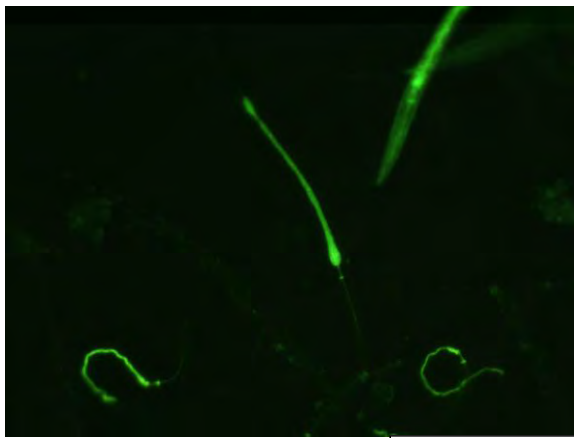
FONTE: arquivo pessoal

FIGURA 3: Ovos de tricostrongilídeos não eclodidos e larvas de primeiro estágio ao microscópio óptico em aumento x40.

Formatado: Fonte: 8 pt

2.4.2 Teste da inibição da alimentação de L1 (Larval feeding inhibition assay)

O ensaio determina o efeito da planta sobre o comportamento de alimentação de larvas de primeiro estágio que são expostas a diferentes concentrações do produto por um período de 2 a 4 horas. Após esta incubação, as larvas são alimentadas com *Escherichia coli* liofilizada e marcada com isotiocianato de fluoresceína. As larvas que se alimentaram podem ser facilmente identificadas com um microscópio de fluorescência pela presença de *E. coli* marcada no seu intestino (ALVAREZ-SANCHEZ et al., 2005).



FONTE: arquivo pessoal.

Formatado: Fonte: 8 pt

FIGURA 4: Larvas de tricostrongilídeos de primeiro estágio que se alimentaram com *Escherichia coli* marcada com fluoresceína ao microscópio de fluorescência em aumento x40.

2.4.3 Teste da inibição da perda da cutícula de L3 (Larval exsheathment assay)

Este teste utiliza o terceiro estágio infectante das larvas em um processo que objetiva examinar o efeito das plantas testadas sobre a perda da cutícula induzida pela exposição ao hipoclorito de sódio diluído. As larvas devem apresentar uma perda de cutícula progressiva ao exame de microscópio óptico. Para o material controle, 100% das larvas devem perder a cutícula entre 60 a 70 minutos (BRUNET & HOSTE, 2006).



FONTE: arquivo pessoal

Formatado: Fonte: 8 pt

FIGURA 5: Larvas de trichostrongilídeos de terceiro estágio em microscópio ótico com aumento x 40.

2.4.4 Teste de inibição do desenvolvimento das larvas (Larval development assay)

Este teste utiliza ovos frescos ou larvas de primeiro estágio e avalia a habilidade do parasita de se desenvolver até o estágio de larva infectante na presença da substância teste. Como a técnica envolve 5 dias de incubação, o risco de desenvolver bactérias ou fungos aumenta, então torna-se necessário a incorporação de antibióticos e antifúngicos no teste. Embora a técnica tenha vantagens, o longo período de incubação faz com que poucos laboratórios tenham utilizado este teste como uma triagem primária *in vitro* (JACKSON & GORDON, 2008).

2.4.5. Atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos de plantas

De uma planta podem-se produzir diversos tipos de extratos a partir de diferentes partes da planta, como por exemplo, extrato de folhas, raízes, casca, sementes ou frutos. Além das partes de planta testada, os tipos de solvente utilizado para se produzir o extrato também é importante (os solventes podem ser polares como a água e os apolares como acetato de etila ou hexano). A atividade medicinal de algumas plantas está distribuída aleatoriamente entre extratos aquosos ou orgânicos. Como exemplo, tem-se a planta *Acacia polyacantha*, que não demonstrou atividade anti-helmíntica quando o extrato aquoso derivado da folha foi

testado. No entanto, o extrato das folhas produzido com solvente orgânico, apresentou efeito significativo (WATERMAN et al., 2010).

Os extratos hexânico e etanólico da semente de manga (*Mangifera indica*) foram testados em ovos de *H. contortus*. O extrato etanólico rico em taninos e saponinas, inibiu 95,66% da eclosão dos ovos a 50 mg/mL, mas o extrato hexânico na mesma concentração não apresentou efeito significativo (COSTA et al., 2002).

O extrato etanólico de sementes de *Melia azedarach* (cinamomo) teve uma melhor atividade do que o extrato etanólico das folhas sobre o desenvolvimento das larvas (MACIEL et al., 2006).

Kaya senegalensis (rica em taninos) teve atividade ovicida e larvicida e o extrato aquoso não diferenciou do extrato etanólico na inibição do desenvolvimento de larvas (ADEMOLA et al., 2004).

MARIE-MAGDELEINE et al. (2009) citam que o extrato diclorometano e metanólico de sementes de *Curcubita moschata* (abóbora) apresenta atividade anti-helmíntica sobre ovos, desenvolvimento e migração de L3.

O extrato hidro alcoólico de *Hedera helix* (hera) apresentou melhor atividade larvicida contra parasitas comparados ao extrato aquoso da mesma planta (EGUALE et al., 2007).

Spigelia anthelmia em extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila ou metanólico foram testados contra ovos e larvas de *H. contortus*. O extrato de *Spigelia anthelmia* a 50 g/mL contendo o solvente acetato de etila inibiu 100% da eclosão dos ovos e 81,2% do desenvolvimento. O extrato metanólico inibiu 97,4% da eclosão e 84,4% do desenvolvimento (ASSIS et al., 2003).

Estudos com 500 plantas comprovaram a eficácia do teste de alimentação de larvas de primeiro estágio para validar a ação anti-helmíntica. Observou-se que, das 500 amostras avaliadas, 119 foram ativas inibindo a nutrição larvar em concentrações inferiores a 1,25 mg/mL, e que dentre estas, 14 amostras causaram visíveis danos morfológicos à cutícula (GORDON et al., 2007).

Sobre o teste in vitro usando-se extratos de plantas para avaliação do desembainhamento de larvas de terceiro estágio, os estudos realizadas por BAUHUAUD et al. (2006), demonstraram que o extrato de *Pinus sylvestris*, na concentração de 600 µg/mL, inibiu de forma significativa o desembainhamento de larvas de *H. contortus* e *T. colubriformis*. De

modo similar, BRUNET & HOSTE (2006) verificaram que a exposição de larvas destes parasitos a galocatequina, monômeros de prodelfinidina e taninos resultou em total inibição do desembainhamento.

De acordo com GITHIORI et al. (2006), várias técnicas de validação de atividade anti-helmíntica *in vitro* têm sido estudadas. Vários modelos parasitários têm sido aplicados. Muitos trabalhos têm aplicado os nematódeos de vida livre *Caenorhabditis elegans*, *Rhabditis pseudoelongata* (OKPEKON et al., 2004) ou *Pheritima posthuma* (AKHTAR et al., 2000). Assume-se que trabalhos realizados com estes modelos *in vitro* possam se assemelhar com os efeitos observados contra nematódeos que parasitam ruminantes.

2.5 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é um nematódeo naturalmente encontrado no solo de regiões com clima temperado, alimenta-se de bactérias e fungos e pode ser facilmente isolado de frutas em decomposição. Na década de 60, Sydney Brenner do laboratório MRC em Cambridge, Inglaterra, decidiu usar esta espécie como um organismo modelo no estudo de desenvolvimento embrionário. Ele procurava um organismo multicelular que fosse pequeno, que tivesse uma anatomia de poucas células, que fosse facilmente cultivado e se reproduzisse rapidamente. Desde então, *C. elegans* se tornou um dos organismos mais pesquisados pela ciência.

C. elegans tem uma anatomia simples com um pequeno número de tecidos e órgãos internos. O corpo é cilíndrico, cercado por uma camada de células epiteliais e protegido por uma cutícula. A musculatura do corpo está arranjada em quatro fileiras, duas dorsais e duas ventrais. O cordão nervoso percorre todo o comprimento do corpo. A cabeça possui um proeminente órgão de alimentação – a faringe. O corpo é preenchido com intestino e no caso de adultos hermafroditas, as gônadas que consistem no útero e espermateca. Os embriões começam a se desenvolver no interior da mãe na forma de ovos e são depositados pela vulva (STIERNAGLE, 2006).

C. elegans não possui sistema circulatório. Os animais adultos possuem apenas 1 mm de comprimento e 0,2 mm de diâmetro, sendo pequeno o suficiente para permitir a difusão do oxigênio do ar através do seu corpo. Os nutrientes do intestino são liberados no espaço pseudocelômico e difundidos para outras células. Os animais estão sobre uma pressão hidrostática interna, que age como um esqueleto hidrostático. Contrações coordenadas permitem um movimento elegante e sinusoidal (por isso foi chamado de *C. elegans*). Este

nematódeo depende criticamente de umidade e possui pouca proteção contra o dessecação (HOLDEN-DYE, 2007).

Embriões de *C. elegans* se desenvolvem rapidamente e eclodem dos ovos após 14 horas. O primeiro estágio larval é completado após 12 horas e ainda passam por mais 4 estágios antes de se tornarem adultos. Em condições de excesso populacional ou na ausência de alimento, a larva pode escolher uma alternativa à rota de desenvolvimento normal, assumindo um estágio latente de larva que é chamado *dauer*. As larvas *dauer* ficam sem se alimentar e sobrevivem às condições adversas por muitos meses. Quando a larva *dauer* encontra condições ideais de desenvolvimento, ela sai desse estágio e desenvolve-se numa larva de quarto estágio antes de se tornar adulta. Animais adultos são hermafroditas e produzem esperma e ovos. No curso de 3 a 4 dias, 300 ovos são depositados. O ciclo de vida é temperatura dependente, ou seja, completa o ciclo em 5,5 dias a 15 °C, 3,5 dias a 20 °C e 2,5 dias a 25 °C. O tempo de vida do *C. elegans* adulto é de 2 a 3 semanas. Este curto ciclo de gerações facilita experimentos genéticos e é a maior vantagem para pesquisadores que trabalham com este organismo. Além disso, uma cepa padronizada de *C. elegans* pode ser propagada por autofertilização por muitas gerações. A autofertilização produz homozigose de alelos, ou seja, todos os indivíduos são considerados geneticamente idênticos (desde que mutações não tenham ocorrido) (BRENNER, 1974).

2.5.1 *C. elegans* como método de screening para drogas anti-helmínticas

Em 1981, SIMPKIN & COLES fizeram um screening de anti-helmínticos usando o *C. elegans* como modelo experimental. Desde então, os parasitologistas veterinários começaram a considerar a utilização deste método.

O melhor teste para determinar a eficácia de drogas anti-helmínticas para uso veterinário é o uso do hospedeiro natural. No entanto, isto requer uma quantidade relativamente alta de substância a ser testada, espaço físico para acomodar os animais, o que muitas vezes pode ter elevado custo para um teste screening. Em screenings primários geralmente são usados roedores que podem ser facilmente mantidos em gaiolas, em ambiente controlado e necessitam de menores quantidades do princípio ativo que a espécie alvo. O uso de teste *in vitro* necessita de quantidades muito menores às utilizadas por roedores. SIMPKIN & COLES (1981) analisaram a atividade de anti-helmínticos comerciais sobre o *C. elegans* em testes *in vitro* e concluíram que o *C. elegans* satisfaz muitos dos critérios necessários para

testes *in vitro*, pois é barato e fácil de operar, fato que reforça o uso deste modelo como método de screening para drogas anti-helmínticas (McGAW et al., 2007).

FONSECA-SALAMANCA & MARTINEZ-GRUEIRO (2003), testaram a droga nitazoxanida, utilizada para controle de *Giardia* e *Cryptosporidium* mas sem indicação para uso como anti-helmíntico, em testes com *C. elegans*. Os autores encontraram um resultado esperado para uma droga destinada a protozoários: nos testes *in vitro* apresentaram baixa atividade da nitazoxanida em comparação ao mebendazol, albendazole e levamisole. Tal resultado confirmou mais uma vez a utilidade do *C. elegans* no screening para produtos anti-helmínticos.

Nematóides gastrointestinais de animais não são animais de laboratório ideais por muitas razões, mas principalmente porque é difícil se manter o complexo ciclo de vida, o qual geralmente inclui um hospedeiro. O uso de testes *in vitro* com *C. elegans* é simples, barato e rápido, e pode funcionar na detecção de anti-helmínticos de amplo espectro. É muito fácil detectar os efeitos da droga em culturas de nematódeos monitorando o comportamento, sobrevivência ou reprodução. Drogas que reduzem a motilidade ou sobrevivência, como o levamisol, podem ser detectadas nestas culturas a baixas concentrações e a potência destes compostos contra o *C. elegans* é um razoável prognóstico da atividade contra nematóides. Para demonstrar o mecanismo de ação da droga anti-helmíntica de largo espectro, emodepside, sobre os nematódeos, foram realizadas avaliação da locomoção, oviposição e desenvolvimento (BULL et al. 2007). Através deste trabalho, os autores determinaram que o emodepside interfere na junção neuromuscular da musculatura do corpo, da faringe e dos músculos que fazem a oviposição.

A ordem Rhabditida em que o *C. elegans* se encontra está intimamente associada a ordem Strongylida, que contém os mais importantes parasitas trichostrongilídeos de ruminantes. Estes animais compreendem a ordem V. Em oposição, ascarídeos e filarioides estão presentes na ordem III. *Trichinella* e *Trichuris* estão localizados na ordem I, que é a mais distante do *C. elegans*. Deste modo a expectativa de uso de *C. elegans* como modelo varia de acordo com a distância filogenética entre as espécies, então, os trichostrongilídeos são bem melhores de serem comparados ao *C. elegans* do que *Trichinella* ou *Trichuris* (GEARY & THOMPSON, 2001). No entanto, os mesmos autores fazem a colocação de que o *C. elegans* é um modelo válido para a descoberta de anti-helmínticos de amplo espectro, pois se um produto apresentar atividade contra nematódeos de vida livre, este resultado pode ser relevante a um parasita de uma diferente ordem. No entanto, os autores alertam de que há uma

enorme diferença evolucionária entre as espécies e citam: “seria muito ingênuo compreender toda biologia dos nematódeos parasitas apenas entendendo a biologia de uma espécie de vida livre”. Uma grande limitação na utilidade do *C. elegans* como modelo de parasitas veterinários ocorre devido a complexidade deste último em realizar o processo infeccioso. Neste caso, questionam: “quantos genes diferentes são necessários para realizar esse processo?” HOEKSTRA et al. (2000) determinaram que o EST (expressed sequence tags) de *H. contortus* possui 195 genes, 30% deles não apresenta homologia com o *C. elegans*.

Contudo, o *C. elegans* tem sido utilizado como screening primário para drogas anti-helmínticas e nematicidas. Além disso, também tem sido proposto um screening para toxicidade geral, assim como neurotoxicidade. Na maioria dos screenings são utilizados *C. elegans* de cepa selvagem (Wild type strain), no entanto, o nematódeo já foi sequenciado geneticamente em sua totalidade. Por isso, atualmente tem sido proposto muitos screenings utilizando-se mutantes selecionados que são sensíveis a certos compostos com definido modo de ação (STIERNAGLE, 2006).

2.5.2 Comparando ovos de *C. elegans* com ovos de *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus é muito mais sensível do que *C. elegans*, de acordo com FASIUDDIN & CAMPBELL (2000). Em testes para determinação ovicida do tiabendazol, os autores encontraram valores de (concentração inibitória mínima) MIC₉₀ de 0,1 µg/mL para ovos de *H. contortus*, enquanto que na dosagem de 120 µg/mL, apenas parte dos ovos de *C. elegans* foram inibidos da eclosão. Utilizaram então, compostos derivados e purificados do tiabendazol contra os ovos de *C. elegans*, que são mais solúveis e mais ativos resultando em uma MIC₉₀ 400 µg/mL. Estes dados levaram os autores à conclusão de que os ovos de *C. elegans* possuem baixa sensibilidade aos benzimidazóis. Neste mesmo trabalho, os autores citaram que a estrutura da casca dos ovos dos diferentes tipos de nematóides pode variar e que a casca dos ovos de *C. elegans* é resistente o suficiente para resistir a compostos químicos cáusticos como alvejante alcalino (hipoclorito de sódio) normalmente utilizado no estudo (processo de sincronização do ciclo de vida do nematóide). Concluíram que embora por razões de economia e conveniência os nematódeos de vida livre *C. elegans* são geralmente utilizados em screenings, diferenças entre a susceptibilidade da droga para determinados estágios do ciclo de vida do nematóide podem ser muito grandes quando comparados com nematódeos de espécies alvo. BULL et al. (2007), testando o emodepside em *C. elegans*, também observaram a resistência dos ovos à droga. O efeito da droga atingiu somente os estágios após eclosão.

2.5.3 Atividade nematicida de plantas medicinais avaliadas em testes com *C. elegans*

McGAW et al. (2000) utilizaram o *C. elegans* para determinar atividade anti-helmíntica de plantas da medicina tradicional da África do Sul. Dentre 72 extratos (hexânico, etanólico e aquoso) testados, derivados de 24 plantas, apenas um não apresentou atividade contra o nematódeo. Os extratos foram testados a 1 e 2 mg/mL sobre 500-1000 nematódeos de uma cultura de 7-10 dias. Os nematódeos foram avaliados através de um sistema de escore onde foram dadas notas de acordo com a sua motilidade. Em 2007, MC GAW et al., testaram extratos de 24 plantas, totalizando-se 70 extratos com a mesma metodologia. Vinte e cinco extratos foram ativos contra *C. elegans*. O extrato hexânico de *Hippobromus pauciflorus* demonstrou a maior atividade matando 70% dos nematódeos a uma concentração de 0,5 mg/mL.

Trabalho semelhante foi realizado por KERMANSHAI et al. (2001) quando utilizaram extratos da semente de papaia, a qual é conhecida pela sabedoria popular como possuidora de atividade anti-helmíntica. Os autores recolheram o extrato usando solventes orgânicos e o fracionaram através de cromatografia de coluna em sílica. As frações encontradas foram testadas contra *C. elegans* e determinaram que a fração que continha benzil isothiocyanato foi responsável pela atividade anti-helmíntica. *Tribulus terrestris* também foi testado de forma semelhante. Esta é uma planta que contém saponinas, alcalóides e flavonoides e através de extratos etanólicos teve a sua atividade anti-helmíntica *in vitro* confirmada por DEEPAK et al. (2002). MUKAI et al. (2008) também determinaram que os taninos da *Camelia sinensis* (novel tannin gallate) tiveram atividade contra *C. elegans*.

WATERMAN et al. (2010) determinaram a atividade anti-helmíntica de extratos aquosos e orgânicos de 33 partes de plantas de 17 espécies utilizadas na medicina tradicional do Sahara sub-africana. Das 17 espécies testadas, 12 plantas demonstraram significativa atividade contra a cepa de *C. elegans* resistente ao levamisol. Em 8 destas 12 plantas, os taninos foram identificados como o princípio ativo majoritário. Os taninos são compostos polifenólicos que podem ter atividade anti-helmíntica devido a coagulação de proteínas. Além dos taninos, outros compostos também foram identificados como possíveis anti-helmínticos, como por exemplo, os compostos fenólicos simples como ácido gálico, gentísico e elágico, assim como as saponinas e flavonoides tais como quercetinas e quinonas.

DEEPAK et al. (2002) realizaram testes utilizando extratos polares e apolares de *Tribulus terrestris*. Determinaram que o extrato apolar teve o melhor resultado e posteriormente os compostos puros foram identificados através de análise cromatográfica e

testados novamente contra o *C. elegans*. A tribulosina e o B-sitosterol-D-glucosídeo são os compostos ativos contra o *C. elegans* numa dosagem de ED₅₀ 76,25 e 82,50 µg/mL, respectivamente. Os autores citam que os compostos não foram tão eficazes quanto o levamisol, no entanto o valor encontrado é significativo uma vez que compostos isolados com um ED₅₀ <100 µg/mL em ensaios utilizando-se *C. elegans* são considerados ativos. Os autores sugerem que compostos ativos a uma concentração menor que ED₅₀ <100 µg/mL podem servir como base para moléculas no desenvolvimento de anti-helmínticos úteis para seres humanos e para animais.

KERMANSHAI et al. (2001) fazem a relação entre volume utilizado em testes *in vitro* e volume do intestino delgado de um humano adulto. Os autores testaram a atividade anti-helmíntica da semente de papaia. De acordo com o trabalho, cerca de 1,2 a 2,4 mg de sementes matam >90% dos *C. elegans* em 500 µl em 4 a 5 horas. Se o intestino delgado humano contém capacidade de 1,3 l, então a dose anti-helmíntica será de 3,1 a 6,2 g de sementes, valor efetivo contra *C. elegans* no ensaio. No entanto, os autores comentam que a dosagem calculada geralmente não é a dose eficaz devido a fatores que diminuem a concentração da droga no intestino tais como movimento e a absorção do conteúdo gastrointestinal.

2.5.4 Como se determina a concentração eficiente de um anti-helmíntico?

A concentração de uma droga necessária para produzir qualquer efeito sobre *C. elegans* é geralmente bastante alta, chegando a ser mil vezes maior que a concentração efetiva para testes em células de mamíferos. Esta grande discrepância na eficácia está relacionada à relativa impermeabilidade de *C. elegans*. Muitas técnicas têm sido usadas para melhorar a permeabilidade ou solubilidade a droga. Por exemplo, uso de vortex, sonicação a elevada temperatura são técnicas para maximizar a solubilização do composto ativo. Além disso, o uso de solventes que possam melhorar a solubilidade também pode ser utilizado. Por exemplo, solventes orgânicos melhoram a atividade de muitos compostos. *C. elegans* pode tolerar modestas quantidades de solventes convencionais: <2% DMSO, <4% Ethanol e <2% methanol. Quantidades superiores podem afetar o crescimento ou comportamento do nematóide (STIERNAGLE, 2006).

Em muitos campos da quimioterapia, o uso de testes *in vitro* pode prever com acurácia a que concentração uma droga vai ser eficaz *in vivo*. Por exemplo, de acordo com a

sobrevivência de bactérias expostas à drogas em culturas *in vitro*, pode-se prever qual concentração é necessária em tecidos ou sangue para o sucesso terapêutico. Infelizmente, esse componente da farmacologia não pode ser facilmente aplicado para helmintos. Enquanto diversas opções estão disponíveis para se avaliar a potência anti-helmíntica *in vitro*, pouco se tem para prever a concentração da droga necessária para eficácia *in vivo*. Os sistemas desenvolvidos para este propósito incluem culturas de nematódeos de vida livre e adultos ou formas imaturas de nematódeos parasitas (particularmente tricostrongilídeos de ruminantes) (GEARY et al. 1999b).

As drogas que reduzem a motilidade como o levamisol podem ser detectadas a baixas concentrações e, de acordo com a potência contra o *C. elegans* é possível se prever a potência contra nematódeos parasitas. Contudo, a correlação não é universal. Por exemplo, morantel ou pirantel, que age de maneira similar ao levamisol em receptores acetilcolínicos de nematódeos, necessita de altas doses para apresentarem algum efeito. Tal fato se contrapõe à teoria de que os nematódeos parasitas possuem maior tolerância aos anti-helmínticos do que nematódeos de vida livre devido à necessidade de sobrevivência no ambiente. Testes com o *C. elegans* também não são capazes de detectar alterações de comportamento induzidas pela droga que resultam em expulsão do parasita do organismo do hospedeiro (GEARY et al. 1999a).

2.5.5 Avanços no conhecimento da farmacologia das drogas baseados em mecanismos de resistência do *C.elegans*

DRISCOLL et al. (1989) demonstraram que o mecanismo de ação dos benzimidazóis ocorre pela interferência da dinâmica de polimerização da tubulina.

CULLY et al. (1994) relataram que o mecanismo preciso de ação das lactonas macrocíclicas é a abertura dos canais de cloro. Recentes estudos (DENT et al., 2000) indicaram que cepas de *C. elegans* altamente resistentes a avermectinas (redução da sensibilidade a ivermectina em 4000 vezes) possuem mutações genéticas em 3 subunidades, enquanto que mutações em 2 subunidades reduz a sensibilidade à ivermectina em aproximadamente 10 vezes.

FLEMING et al. (1997), em estudo com cepa mutante e resistente ao levamisol de *C. elegans*, revelaram que o sítio de ação da droga está relacionada com receptores nicotínicos-acetilcolínicos.

Para HOLDEN-DYE & WALKER (2007), o motivo mais relevante em se estudar o *C. elegans* como modelo para avaliação de anti-helmínticos é a fisiologia e farmacologia comparativa do Filo Nematoda. Muitos anti-helmínticos agem sobre a neuromusculatura e por isso as similaridades se tornam importantes. O sistema neuromuscular é similar entre *C. elegans* e o nematódeo parasita *Ascaris suum*, assim como os neurotransmissores, a acetilcolina em motoneurônios excitatórios, Gaba nos motoneurônios inibitórios e glutamato dos motoneurônios. O sistema nervoso dos nematódeos possuem abundância em neuropeptídeos que por sua vez exercem funções vitais como a alimentação, locomoção e ovopostura. Os autores sugerem que uma prospecção no desenvolvimento de peptidomiméticos como uma nova iniciativa para o controle de nematódeos.

2.5.6 Descoberta da nova geração de anti-helmínticos

No trabalho de GEARY et al. (1999a), os autores discutem a possibilidade de *C. elegans* ser empregado como ferramenta para a descoberta de futuros anti-helmínticos. Como este nematódeo pode ser facilmente propagado em culturas e todos os anti-helmínticos comerciais podem ser testados neste sistema, este pode ser um modelo para screening de drogas com potencial anti-helmíntico. No início da década de 80, *C. elegans* tornou-se parte de muitos programas para detecção de anti-helmínticos em indústrias. Muitas amostras que demonstraram efeito sobre os nematódeos foram primeiro testadas em modelos animais. Apenas poucos compostos demonstraram suficiente atividade para serem testados em hospedeiros naturais. Recentemente houve o estudo das drogas anti-helmínticas emodepside (BULL et al., 2007) e os AADs (amino-acetonitrile derivatives) (KAMINSKY et al., 2008) que foram extensivamente testados sobre culturas de *C. elegans*. Os autores finalizam que embora pareça paradoxal, a importância do *C. elegans* apenas aumenta com o tempo. O genoma completo deste organismo, com cerca de 100 milhões de bases, já foi sequenciado. Este conhecimento é bastante útil para muitas áreas da pesquisa, incluindo descoberta de anti-helmínticos.

2.6 Testes *in vivo*

Somente após a obtenção de resultados promissores com os testes *in vitro*, passa-se aos testes *in vivo* que podem utilizar inicialmente animais de laboratório e, em seguida, os testes toxicológicos. Depois desta primeira etapa, podem ser realizados os testes com animais que representem a espécie alvo para a indicação terapêutica. Os testes de eficácia com animais

de laboratório são chamados pré-clínicos e os testes com a espécie alvo são denominados clínicos. Os testes de eficácia com a espécie alvo devem ser os últimos testes a serem realizados numa pesquisa sobre atividade de plantas medicinais. O teste de redução da contagem de ovos nas fezes fornece uma estimativa da eficácia anti-helmíntica de um produto por meio da comparação da contagem de ovos nas fezes antes e após o tratamento. Pode-se realizar também o teste controlado com inoculação artificial de parasitos, tratamento com a planta desejada e necropsia ao final. Este teste é mais confiável, porém mais caro em termos de mão de obra e utilização de animais (TAYLOR et al., 2002, CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Os métodos *in vitro* oferecem meios de avaliação rápida para atividade anti-helmíntica de plantas e possibilita analisar os possíveis mecanismos envolvidos na interação entre compostos ativos e parasitas. Contudo, devido a divergências em condições encontradas *in vitro* e *in vivo*, os resultados continuam a indicar que temos que passar pelos testes *in vivo* para confirmar a atividade sobre infecções experimentais em hospedeiros alvos. (HOUZANGBE-ADOTE et al., 2005).

BIZIMENYERA et al. (2006) avaliaram a ação ovicida e larvicida de extrato de *Peltophorum africanum* sobre *T. colubriformis* com resultados positivos, no entanto, não encontraram ação similar contra parasitas adultos. Diferenças na fisiologia e na biodisponibilidade das preparações de plantas sobre os hospedeiros podem ocorrer.

Tal fato também foi observado com o extrato rico em taninos condensados denominado quebracho (ATHANASIADOU et al., 2001), que apresentou atividades ovicida e larvicida. O extrato de quebracho não apresentou ação sobre parasita do abomaso *Haemonchus contortus*, mas houve sobre o parasita intestinal *Trichostrongylus colubriformis*. Os autores atribuem como principal fator para as diferenças o pH e interação com os taninos. *In vitro*, o pH não pode ser manipulado e está aproximadamente em valor neutro. Os taninos condensados mantem-se estáveis em pH entre 5 e 7, dissociam-se em pH elevado ou em pH mais baixo que o citado. Então, no teste de inibição do desenvolvimento, os taninos se fixam a qualquer macromolécula e formam complexos estáveis que danificam a cutícula do parasita.

O efeito pH também foi observado por BURKE et al (2009), citando que o látex da Papaya foi efetivo contra *Heligmosomoides polygyrus*, parasita intestinal de camundongos (SATRIJA et al., 1995), mas não foi eficaz em *Protospiura muricola*, parasita de estômago, a não ser que a acidez do estômago fosse controlada (STEPEK et al., 2007).

Outra dificuldade encontrada para a validação dos resultados dos testes *in vitro* em organismos vivos é o fato de que pode ser impraticável extrapolar a dose utilizada *in vitro*, para a quantidade necessária em equivalência para organismos vivos adultos. Por exemplo, se a atividade foi demonstrada a 1 mg/mL, a dose necessária para a mesma concentração no volume de plasma de um adulto normal (aproximadamente 6 litros), então seria necessário aproximadamente 6 gramas do produto a ser administrado. Este valor pode ser considerado impraticável para algumas espécies de plantas e também devido ao elevado volume a ser administrado via oral (HOUGHTON et al., 2007).

Embora o *Chenopodium ambrosioides* (erva de Santa Maria) tenha uma longa história no uso como anti-helmíntico em humanos e não ruminantes, quando testado em ovinos não apresentou capacidade em reduzir o número de parasitas adultos ou a contagem de OPG. Contudo, em testes *in vitro*, o óleo reduziu a viabilidade dos ovos (KETZIS et al., 2002).

VIEIRA et al. (1999) administraram plantas da flora brasileira reconhecidas pela sabedoria popular como anti-helmínticas a caprinos infectados artificialmente com *H. contortus*. Os animais foram divididos em grupos com cinco repetições e receberam alho (3 g/kg), sementes de papaia (2 g/kg), folhas de banana (0,5 g/kg), semente de *Canavalia brasiliensis* (1 g/kg), semente de *Mormodica charantia* (1 g/kg), folhas de *Anona squamosa* (0,3 g/kg); folhas de menta (0,5 g/kg); folhas e sementes de *Chenopodium ambrosioides* (0,75 g/kg) ou casca de *Hymenaea courbaril* (1 g/kg). Um grupo recebeu ivermectina e outro foi usado como controle. As nove plantas testadas foram ineficazes contra *H. contortus*.

O alho e semente de mamão são mundialmente conhecidos como anti-helmínticos. BURKE et al. (2009) avaliaram a eficácia do bulbo de alho e do suco de alho sobre nematódeos de caprinos e de sementes de papaia para ovinos. Após 14 dias dos tratamentos, nenhuma mudança no volume globular e OPG foi observada em relação ao grupo controle. BATATINHA et al. (2005) também avaliaram a atividade anti-helmíntica do alho em pó em cordeiros e observaram que os animais não apresentaram ganho de peso e que a perda de peso, verificada no início do experimento, desaconselha a sua utilização. NORO et al. (2003) relata que a inclusão deste elemento na alimentação de ruminantes modifica a microbiota. Em experimento realizado, os animais controle tiveram ganho de peso superior ao dos animais tratados com alho. O pH ruminal dos tratados foi diferente do controle e o tempo de redução de azul de metileno foi diferente, com redução mais lenta para o grupo tratado em relação ao grupo controle. A dose de 1 g/kg via oral resultou em redução da intensidade dos movimentos

ruminais, anorexia, apatia e perda de peso, sendo estes parâmetros gradativamente restabelecidos após interrupção do tratamento

Atividade anti-helmíntica de plantas da medicina etnoveterinária da África foram avaliados por GITHIORI et al (2004). *Hagenia abyssinica*, *Olea europaea*, *Annona squamosa*, *Ananas comosus*, *Dodonea angustifolia*, *Hildebrandtia sepalosa* e *Azadirachta indica* foram administradas a cordeiros infectados artificialmente por *H. contortus*. Comparados ao grupo controle, nenhuma redução significativa de OPG, contagem de parasitas e ganho de peso foram observados para nenhum dos grupos tratados.

BURKE et al. (2009) testaram um composto comercial de plantas contendo *Artemisia absinthum*, *Allium sativum*, *Juglans nigra*, *Curcubita pepo*, *Artemisia vulgaris*, *Foeniculum vulgare*, *Hyssopus officinalis* e *Thymus vulgaris*. Caprinos infectados artificialmente receberam estes compostos os quais se mostraram ineficazes contra os parasitas.

Alguns trabalhos têm evidenciado a atividade anti-helmíntica de produtos naturais. IQBAL et al. (2006) verificaram atividade de *Butea monosperma* administrada em forma de extrato em pó para ovinos naturalmente infectados com nematódeos. A redução máxima foi de 78,4% no OPG 10 dias após o tratamento com 3 g/kg. O grupo que recebeu levamisol exibiu 99,1% de redução de OPG. HODERGEN et al. (2003) ofereceram 183 mg/kg de extrato etanólico da planta inteira *Fumaria parviflora* a qual causou elevada redução na contagem de OPG (100%) e reduziu em 78,2% a contagem de *H. contortus* adultos e em 88,8% a contagem de *T. colubriformis* adultos. Outra planta que apresentou eficácia anti-helmíntica foi a *Nauclea latifolia* em extrato aquoso da casca administrado em ovelhas naturalmente infectadas (ONYEYILI et al., 2001). A porcentagem de redução (93,8%) com a dosagem de 1600 mg/kg do extrato foi comparável a 5 mg/kg de albendazol (94,1%). EGUALE et al. (2007) também obtiveram resultado significativo na redução da contagem de OPG em animais tratados com extrato hidro-alcoólico de *Hedera helix* após 2 dias do tratamento. Observaram também que o extrato hidro-alcoólico teve melhor atividade que o extrato aquoso.

TARIK et al. (2009) avaliaram *Artemisia absinthium* em condições *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos foram semelhantes nos testes *in vitro* e *in vivo*, obtendo-se efetividade do extrato etanólico (2 g/kg) com redução do OPG de ovelhas infectadas por *H. contortus* 90,46%, semelhante ao albendazol.

A importância da avaliação da toxicidade de plantas em animais estudada por ATHANASIADOU et al. (2001). Os autores verificaram a atividade de taninos condensados derivados de planta em ovinos infectados com parasitas gastrointestinais. Animais que receberam Quebracho (16%) apresentaram menor contagem de OPG em comparação com ovinos medicados com Quebracho (8%), que por sua vez, foi menor do que aqueles tratados com Quebracho (4%). No entanto, diversos efeitos colaterais foram observados em animais tratados. Na dosagem de 16%, os animais reduziram a ingestão de alimentos e apresentaram diarreia severa. Ganho de peso e eficiência na conversão foram reduzidos em animais tratados com 8% quando comparados aos animais tratados com 4% e grupo controle. Anterior ao teste *in vivo*, testes *in vitro* foram conduzidos para se investigar o efeito dos taninos sobre as larvas de *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus vitrinus* e indicaram que o quebracho diminui a viabilidade das L3 de todas as espécies.

2.7. Toxicidade

O estudo toxicológico das plantas é alvo de pesquisas e investigações. Apesar de possuírem potencial curativo, as plantas medicinais possuem substâncias que, dependendo da dose, podem ser tóxicas ao organismo, causando reações indesejáveis ou até mesmo levar a óbito. Uma mesma planta pode conter compostos medicinais e terapêuticos e também compostos tóxicos prejudiciais aos organismos humano e animal. Os principais princípios ativos responsáveis pelo potencial tóxico das plantas são os alcalóides, glicosídeos, taninos, saponinas, resinas, fitotoxinas, minerais, oxalatos e óleos essenciais, dentre outros. Embora tais substâncias, quando ingeridas, possam acarretar distúrbios, reações adversas ou efeitos colaterais no organismo, muitas delas quando utilizadas na dosagem terapêutica adequada, possuem atividade benéfica no tratamento de diversas doenças; como por exemplo, a papoula (*Papaver somniferum*) utilizada na fabricação de medicamentos analgésicos e anestésicos, a digitalina (*Digitalis purpurea*) empregada como regulador cardíaco, e os alcalóides da beladona (*Atropa belladonna*) que atuam em problemas oculares, como sedativo, antiespasmódico, sedativo e anti-hipertensivo. Com o avanço da indústria farmacêutica, a farmacologia e a toxicidade dos princípios ativos das plantas são elucidadas dia a dia, de modo a eliminar agentes tóxicos e contaminações, as doses terapêuticas e tóxicas são bem estabelecidas, determinando de forma precisa a faixa terapêutica e as interações com outros fármacos, o que garante o promissor dos fitoterápicos a nível mundial (VEIGA JR et al., 2005).

A toxicidade dos óleos essenciais depende da dose, sendo, muitas vezes, encontradas reações tóxicas variadas somente em doses elevadas. Diversos estudos têm contribuído para o conhecimento da mutagenicidade de compostos voláteis. Em estudo realizado com óleo de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) foi observado que este é tóxico quando ingerido em altas doses, podendo desencadear reações alérgicas, especialmente em pessoas sensíveis. Entretanto, uma vez que a toxicidade deste óleo é dose-dependente, a maioria dos efeitos adversos poderia ser evitada pelo uso de menores concentrações (HAMMER et al., 2005).

Diversos agentes tóxicos podem causar hepatotoxicidade ou nefrotoxicidade devido à capacidade de biotransformação destes produtos por estes órgãos. Compostos lipofílicos tendem a ser mais hepatotóxicos do que compostos hidrofílicos devido aos últimos serem eliminados em maior quantidade pelo rim (KANEKO, 1997).

Lesões hepáticas em ovinos causadas por ingestão de fitoquímicos hepatotóxicos podem ser avaliadas pelas enzimas gama glutamil transferase (GGT), aspartato amino transferase (AST) e fosfatase alcalina (FA). A enzima alanino amino transferase (ALT), detecta danoshepatocelulares, no entanto ela é específica para cães e gatos e deve ser substituída pela avaliação de AST em grandes animais. Lesões renais causadas por ingestão de fitoquímicos nefrotóxicos podem ser avaliadas pela dosagem de uréia e creatinina sérica (KANEKO, 1997).

Diversos extratos vegetais presentes na natureza necessitam ser estudados para a avaliação anti-helmíntica. Os óleos essenciais são apenas uma parte dos compostos fitoquímicos presentes nos extratos vegetais. Os testes *in vitro* e *in vivo* possuem elevada importância para a validação da atividade anti-helmíntica da planta assim como os testes toxicológicos.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO:

***Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils
evaluated in different *in vitro* tests against sheep gastrointestinal nematodes**

Trabalho a ser enviado para a revista Veterinary Parasitology

(normas para publicação da revista presentes no anexo)

***Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils
evaluated in different *in vitro* tests against sheep gastrointestinal nematodes**

L.M. Katiki^{a*}, A.C.S. Chagas^b, H. Bizzo^c, J.F.S. Ferreira^d, A.F.T.Amarante^e

^a *IZ - Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteadó 56, CEP 13460-000, Nova Odessa - SP, Brazil

^b EMBRAPA - Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz km 234, CEP 13560-970, São Carlos- SP, Brazil

^c EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas 29501, CEP 23020-470, Guaratiba - RJ, Brazil

^d USDA-ARS - Appalachian Farming Systems Research Center, 1224 Airport Rd., Beaver, WV 25813, USA

^e UNESP – Universidade Estadual Paulista, Dep. de Parasitologia, IB, CEP 18 618-970, Botucatu-SP, Brazil

* **Corresponding author at:** Rua Heitor Penteadó, 56. CEP 13460-000, Nova Odessa – SP – Brazil. Tel. +55 19 34669400, Fax: +55 19 34661279. **E-mail address:** lmkatiki@iz.sp.gov.br

Keywords: *Cymbopogon*, *Mentha piperita*, essential oil, *in vitro* test, sheep, anthelmintic

Abstract

Mentha piperita, *Cymbopogon martinii* and *Cymbopogon schoenanthus* essential oils were chosen to be evaluated against nematodes in *in vitro* tests. Those testes have the advantage of providing a simple, rapid and inexpensive means of primary screening of products. In Egg Hatch Assay, *Cymbopogon schoenanthus* essential oil showed the lowest LC₅₀ value (0.05 µL/mL) when compared to *Cymbopogon martinii* and *Mentha piperita* essential oils and this result is quite similar to LC₅₀ value found in Larval Development Assay (0.07 µL/mL). The Larval Feeding Inhibition Assay is the most sensitive test amongst all tests with the lowest LC₅₀. *C. schoenanthus* essential oil presented LC₅₀ of 0.01 µL/mL, while L₃ presented the highest dose of essential oil to be inhibited in Larval Exsheathment Assay, with LC₅₀ values of 27.1 µL/mL. In all *in vitro* tests *C. schoenanthus* essential oil had the best activity against ovine trichostrongylids followed by *C. martini*, while *M. piperita* presented the worst results

1-Introduction

Gastrointestinal nematodes in livestock are usually controlled by commercial anthelmintics; however a few molecules are available for use and their effectiveness is being reduced due to the emerging of resistant strains of parasites (Molan et al., 2002). For this reason, losses in weight gain and high morbidity and mortality are a consequence of those parasite infections. *Haemonchus contortus* is the most prevalent and pathogenic nematode found in small ruminants in the tropics. Many alternative strategies to control nematodes have been studied such as nutrition, selection of resistant animals, integrated management of pasture, use of nematophagus fungus and new anthelmintic compounds derived from plants. The search for alternative solutions to chemical treatments is nowadays a worldwide necessity to achieve more sustainable control. There is increase evidence indicating that some bioactive plants might possess anthelmintic properties and, thus, represent a promising alternative to chemotherapy (Brunet and Hoste, 2006).

Mentha piperita, *Cymbopogon martinii* and *Cymbopogon schoenanthus* essential oils were chosen to be evaluated against nematodes in *in vitro* tests because they have shown some parasiticide effect. *In vitro* bioassays have the advantage of providing a simple, rapid and inexpensive means of primary screening of products. *M. piperita* essential oil has activity as insecticide in store-products (Shaaya et al., 1991), larvicidal and mosquito repellent (Ansari et al., 2000). *C. martini* essential oil has activity against *Meloidogyne incognita*, a soil nematode, (Pandey et al., 2000) and *C. elegans* (Kumaran et al., 2003). *C. schoenanthus* essential oil has anti-termite activity (Koba et al., 2007) and activity against bruchids (*Callosobruchus maculatus*) (Ketoh et al., 2002).

The evaluation of an emulsion of essential oils were performed on *H. contortus* immature life stages by egg hatching assay (eggs to larvae of 1st stage - L₁), larval development

assay (L₁ to larvae of 3rd stage - L₃), larval feeding inhibition assay (L₁) and larval exsheathment assay (L₃). Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the anthelmintic activity of three essential oils using different *in vitro* assays.

2-Materials and Methods

2.1-Sheep nematodes:

All early life stages of trichostrongylids used in our work were obtained from sheep naturally infected and kept on EMBRAPA- Pecuária Sudeste herd (fecal culture indicated 95% of *Haemonchus* spp. and 5% *Trichostrongylus* spp.). Each time feces were collected to perform the assays, the same concentrations and the same assays were done for the three essential oils.

2.2-Essential oils:

Oils were purchased from WNF Ind. e Com. Ltda(R. Dr. Mario Pinto Serva, 64 - Sao Paulo-SP - Brazil). *M. piperita* oil lot n. 164, density (d) = 0.919, *C. martinii* oil lot n. 081, d = 0.884 and *C. schoenanthus* oil lot n. 10608, d = 0.911.

2.2.1- GC-MS analysis:

Analysis of the chemical composition of the essential oils were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry using an Agilent 5973N GC-MS system equipped with a HP5MS capillary column (5%-difenil-95%-dimetilsilicone, 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). The injector was set at 250°C and the oven programmed to go from 60 to 240°C at an increase of 3°C/min. Mass detector was operated in electronic ionization mode, at 70eV. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. Sample volume was 1.0 µL, and consisted of 1% essential oil in dichloromethane. A split ratio of 1:100 was used. Mass

spectra were compared with data from Wiley 6th ed library. The retention indexes were calculated based on data generated by a series of alkenes (C₇-C₂₆) injected in the same column and conditions specified above and compared to those found in the literature (Adams, 2007). Identification was based in both mass spectrum and retention index. Mentone, menthol, geraniol and geranial were also identified by injection of authentic standards.

2.2.2- GC-FID analysis:

For quantification, the oils were analyzed in an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a HP5 capillary column (5%-difenil-95%-dimetilsilicone, 30 m X 0,32 mm X 0,25 µm). Hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min. All other parameters were the same as described above. Results were reported in relative percentage of peak area.

2.3-In vitro tests

All *in vitro* tests using ovine trichostrongylides was performed based on methodology described by Jackson and Hoste (2010).

2.3.1- Egg hatching assay (EHA):

About 5 g of feces immediately collected from the rectum were mixed to warm water (37°C) and filtered through 1 mm, 105 µm, 55 µm and 25 µm aperture sieves which the latter retained eggs. Eggs recovered were added to concentrate NaCl solution, centrifuged at 3000 rpm for 3 minutes and the floating eggs were collected using the 25 µm sieve and washed with distilled water. A suspension of 100 eggs in 20 µL were added to the treatments (water, tween 80 at 1% and essential oil) at concentrations that ranged from 25 µL/mL and decreased always in a half until 0.02 µL/mL. The lowest dose was the concentrations that allowed eggs

to hatch as values found in control group. All concentrations and positive (water + tween 80 at 1%) and negative (water) control had six repetitions and were performed in 24 wells plate, incubated at 26 °C for 48 h and read in an inverted microscope to count eggs and L₁.

2.3.2-Larval development assay (LDA):

One hundred eggs were added in the wells plus distilled water in a total volume of 200 µL, incubated for 24h at 27°C to obtain L₁. To each well nutritive medium (*Escherichia coli*, yeast extract, anphotericin) were added according to Hubert and Kerbouef (1992) and the treatments (water, DMSO 1%, essential oil) at concentrations that ranged from 6 µL/mL and decreased the concentration always in a half until 0.02 µL/mL in a total volume of 500 µL. The lowest dose was the concentrations that allowed larvae to development at a similar value found in control. All concentrations had six repetitions as well the positive control (water +DMSO 1%) and negative control (water). They were performed in 24 wells plate and incubated at 27°C for four days, when it was read in an inverted microscope to count all L3 and larvae not developed.

2.3.3-Larval feeding inhibition assay (LFIA):

Eggs plus distilled water were kept in a petri dish covered and incubated at 27°C for 24h. Active L₁ were recovered by baermannization using a 25 µm sieve. In a 1.500 µL Eppendorf tube, one hundred L₁ were added to the treatments (water, DMSO 1% and essential oil) on a final volume of 1.500µL at concentrations that startedfrom 3 µL/mL and the concentration was always decreased in a half until 0.005 µL/mL which lo the west dose was the concentrations that allowed larvae fed as in control group. Tubes were incubated horizontally at 24°C for 2 h. Working always in dark from here to the end of procedure, 20 µL *E. coli* marked with fluorescein isotiocianate were added and incubated horizontally covered with aluminum foil for 24 h at 24°C. Tubes were centrifuged at 6.000 rpm/1min, and 800 µL of superficial liquid was removed. All larvae from the bottom were examined under

fluorescence microscope counting all nematodes that fed (luminous intestine) thereafter count under a conventional microscope. All concentrations had six repetitions and positive (water +DMSO 1%) and negative control. (Alvarez-Sanchez et al., 2005).

2.3.4-Larval exsheathment assay (LEA)

Active L₃ from coproculture were separated using a 25 µm sieve. They were concentrated by centrifugation at 6000 rpm/2min to prepare a solution with 100 L₃/100 µL. One hundred L₃ were added to the treatments (water, tween 80 at 2% and essential oil) at concentrations that ranged from 150 µL/mL and decreased the concentration always in a half until 20 µL/mL which the lowest dose was the concentrations that allowed larvae exsheath in 60 minutes. The L₃ were exposed to emulsion of essential oils during 3h at 22°C, centrifuged at 6.000rpm/2min, removed superficial water and added distilled water to clean the larvae from essential oil. This procedure was repeated twice and in the end, 1.200µL with 1.200 L₃ was kept as residual in the bottom. A hundred L₃ were add in each well and 1.400µL of bleach solution (150µL domestic bleach with 6% sodium hypochlorite and 15.625mL of water) were added into wells containing 100 L₃. At every 10 minutes the exsheath was stopped with iodine solution. The gradual exsheathment along 60 minutes guarantees a good control. All concentrations had two repetitions and positive (water +tween80 at 2%) and negative control (water). (Alonso-Diaz et al.,2008).

2.4-Statistics

The calculation of the extract lethal concentration (LC) in the *in vitro* tests was performed by fitting regression using normal and logistic distribution, with the parameters estimative of these equations obtained by maximum likelihood. The procedure used was the SAS Probit to estimate the LC₅₀ and LC₉₉ with the independent variables (dose) transformed by natural logarithm (log dose).

3-Results

In EHA *C. schoenanthus* essential oil showed the lowest LC₅₀ value (0.05 µL/mL) when compared to *C. martinii* and *M. piperita* essential oils and this result is quite similar to LC₅₀ value of LDA (0.07 µL/mL). The LFIA is the most sensitive test amongst all tests with the lowest LC₅₀. *C. schoenanthus* essential oil had LC₅₀ of 0.01 µL/mL in LFIA, while L₃ had the highest dose of essential oil to be inhibited in LEA, with LC₅₀ values of 27.1 µL/mL. In all *in vitro* tests *C. schoenanthus* essential oil had the best activity against ovine trichostrongylids followed by *C. martinii*, while *M. piperita* presented the worst results (Table 1). The same activity can be found in LC₉₉ (Table 2). Oxygenated monoterpenes were the major constituents of the essential oils tested. *M. piperita* oil had approximately 40% iso-menthol, followed by 26% iso-menthone, and 11% neoisomenthol. *C. martinii* oil had approximately 81% of geraniol and 10% geranyl acetate, *C. schoenanthus* oil had approximately 62.5% geraniol, followed by 12.5% geranial and 8.2% neral (Table 3).

4-Discussion

The objective of this study was to evaluate using four different *in vitro* tests with three essential oils. The EHA and LDA are the most widely employed *in vitro* methods for detection of anthelmintic resistance in ovine nematodes under field conditions and are usually interpreted by using LC₅₀ values (Varady et al., 2009). Different LC₅₀ values were found between assays and it can be attributed to the sensitivity of each stage. Eggs are more resistant than L₁ due to its hard and resistant shell. In the other side, L₃ are the strongest due to its double sheath, L₁ is the most sensitive stage due to its pharynx that is more sensitive than the axial muscles to the paralysis caused by drugs (Molan et al., 2002). These facts lead to higher

or lesser volumes of active compound to achieve LC₅₀ for each test.

The sensitivity of immature stages to solvents was observed. In order to make an emulsion of essential oils and water, solvents were needed. Tween 80 is the best solvent for oils and were used in EHA and LEA due to the resistance of eggs and L₃ to its toxicity. This solvent couldn't be used in LFIA and LDA because leads to high mortality in control groups. This solvent was substituted by a less toxic compound, the DMSO.

Alvarez-Sanchez et al. (2005) used LFIA to detect anthelmintic resistance to ivermectin and levamisole and reported that such assay offers the advantage of simplicity and rapidity in comparison to the LDA. We support this statement. LDA takes a long time to be performed and problems related to contaminations frequently occur. Although LFIA has the advantage of simplicity and rapidity it requires an inverted fluorescence microscopy and the necessity to work in dark.

In this study, *C. martinii*, *C. schoenanthus* and *M. piperita* essential oils presented high activity against sheep trichostrongylids. The results obtained in *in vitro* tests are superior to other oils tested previously. For instance, *Eucalyptus globulus* essential oil inhibited 99.3% egg hatching and 98.7% larval development at concentrations of 21.75 and 43.5 mg/mL (Macedo et al., 2009). *Ocimum gratissimum* essential oil inhibited 100% egg hatching at concentration of 50mg/mL (Pessoa et al., 2002). *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils inhibited 99.2 and 94.5% larval development at concentration of 10 and 20 mg/mL (Camurça-Vasconcelos et al., 2007). *Chenopodium ambrosioides* essential oil inhibited 100% egg hatching at concentration of 1.33 uL/mL (Ketzis et al., 2002). The LC₅₀ of *Eucalyptus staigeriana* essential found in EHA was 0.324 mg/mL and LC₅₀ to LDA was 1.702 mg/mL (Macedo et al., 2010). Those values are higher in comparison to our results that showed LC₅₀ EHA of 0.05; 0.29 and 0.15 uL/mL and LC₅₀ LDA of 0.07; 0.29 and 0.18 uL/mL to *C. schoenanthus*, *M. piperita* and *C. martinii* essential oils respectively, considering

that 1 mg is equivalent to 1 μ L.

For trichostrongylids, the L₃ exsheathment is a key process in the life cycle because it is the step making the transition for the free living to the parasitic stages. Studies on the kinetics of larvae exsheathment have emphasized that any disturbing factors or toxic compounds might reduce the parasite establishment in the host. Brunet and Hoste (2006) found different activity of exsheathment amongst types of monomers of condensed tannins and concluded that the number of free hydroxyl groups of condensed tannins monomers is a key factor. We found a clear difference in LC₅₀ for *C. schoenanthus* (27.10 μ L/mL), *C. martinii* (32.02 μ L/mL) and *M. piperita* (68.06 μ L/mL) values. Maybe these differences can be associated to the higher amount of compounds found in *C. schoenanthus* essential oil.

Terpene is a chemical class of essential oils. *C. schoenanthus* has approximately 20 constituents being the major compound geraniol, geranial and neral, *C. martinii* is rich in geraniol and geranyl acetate and *M. piperita* has menthol and menthone as the major constituents. Terpenoid compounds are known to be active against a range of organisms and the synergy of several terpenoids can be effective on several targets because they are a complex mixture of compounds that can interact with multiple molecular targets on the various developmental stages of the parasite (Marie-Magdaleine et al., 2009).

Despite its great facilities in the use of trichostrongylids immature forms to screening products for anthelmintic use, there are some difficulties in performing the test due to day to day variation of LC₅₀ values during patent period. These changes were observed in EHA by Kerboeuf et al. (1989), in LDA by Amarante et al (1997) and in LFIA by Alvarez-Sanchez et al. (2005). To deal with this situation, Varady et al. (2007) used the criterion of LC₉₉ concentration to evaluate the sensitivity to thiabendazole in egg hatch and larval development assay because the comparison of LC₅₀ values was not significantly different in field screening. LC₉₉ concentration able to differentiate group SS (susceptible) and group SN (susceptible

heterozygote). Our LC₉₉ results showed the same pattern of activity of the LC₅₀.

5-Conclusion

The *in vitro* methods provide means to screen rapidly for potential anthelmintic activities of different plant extracts and to analyze the possible mechanisms involved in the interactions between active compounds and parasites. *C. schoenanthus* showed the best anthelmintic activity *in vitro*. However due to divergence in conditions encountered *in vivo* and *in vitro* (availability) and/or concentrations of any active compound, metabolic transformation, etc, the results remain indicative and have to be confirmed through *in vivo* studies with experimental nematode infections in target hosts species which is greatly influenced by the differences in the physiology and the bioavailability of plant preparations within animal hosts.

6-References

- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 804 pp.
- Álvarez-Sánchez, M.A., Pérez García, J., Bartley, D., Jackson, F., Rojo-Vázquez, F.A., 2005. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Exp. Parasitol.*, 110, 56-61.
- Amarante, A.F.T.; Pomroy, W.E.; Charleston, W.A.G.; Leathwick, D.M., Torneros, M.T.T., 1997. Evaluation of a larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. *Int. J. Parasitol.* 27, 305-311.
- Ansari, M.A., Vasudevan, P., Tandon, M., Razdan, R.K., 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresource Technol.*, 71, 267-271.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agr.Food Chem.*, 54, 7481-7487.
- 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., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet. Parasitol.* 148, 288-294.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet.Rec.*, 130, 442-446.
- Jackson, F., Hoste, H., 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies.

- Springer Netherlands, 25-45.
- Ketoh, G.K., Glitho, A.I., Huignard, J., 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (coleopteran:Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera:Pteromalidae) to three essential oils. J. Econ. Entomol., 95 (1), 174-182.
- Kerboeuf, D.;ubert, J.; Mallet, S., 1989. *Haemonchus contortus*: infectivity and resistance to benzimidazoles. Vet. Rec. 124, 399-400.
- Ketzis, J.K.; Taylor, A.; Bowman, D.D.; Brown, D.L.; Warnick, L.D.; Erb, H.N., 2002. Chenopodium ambrosioides and its essential oil as treatments for Haemonchus contortus and mixed adult-nematode infections in goats. Small Rum,Res., 44, 193-200.
- Koba, K., Poutouli, P.W., Nenonene, Y.A., Songai, M.S., 2007. Chemical composition and anti-termite activity of three tropical essential oils against termite species termitodes. Sci. Technol., 5, 39-46.
- Kumaran, A.M., D'Souza, P., Agarwal, A., Bokkolla, R.M., Balasubramanian, M., 2003. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. Phytother.Res., 17, 957-957.
- Macedo, I.T.F.; Bevilacqua, C.M.L.; Oliveira, L.M.B.; Camurça-Vasconcelos, A.L.F.; Vieira, L.S.; Oliveira, F.R.; Queiroz-Junior, E.M.; Portela, B.G.; Barros, R.S.; Chagas, A.C.S., 2009. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18, 62-66.
- Marie-Magdeleine, C., Hoste, H., Mahieu, M., Varo, H., Archimede, H., 2009. *In vitro* effects of *Curcubita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol., 161, 99-105.
- Molan, A.C., Waghorn, W.C., McNabb, W.C., 2002. Effect of condensed tannins on egg

- hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. *Vet. Rec.*, 150, 65-69.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N., Kumar, S., 2000. Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. *J. Phytopathol*, 148, 501-502.
- Pessoa, L.M.; Morais, S.M.; Bevilaqua, C.M.; Luciano, J.H.S. 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 109, 59-63.
- Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juven, B., Zisman, U., Pissarev, V., 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *J.Chem.Ecol.*, 17, 1573-1561.
- Varady, M., Cudeková, P., Corba, J., 2007. In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. *Vet. Parasitol.*, 149, 104-110.
- Varady, M., Corba, J., Letkova, V., Kovac, G., 2009. Comparison of two versions of larval development test to detect anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, 160, 267-271.

Table 1: CL₅₀ (µL/mL) and confidence limits of *Cymbopogon schoenanthus*, *Mentha piperita* and *Cymbopogon martinii* essential oils in egg hatch assay (EHA), larval development assay (LDA), larval exsheathment assay (LEA) and larval feeding inhibition assay (LFIA) against gastrointestinal nematodes of sheep.

	<i>C. schoenanthus</i>	<i>M. piperita</i>	<i>C. martinii</i>
EHA	0.05 (0.04 – 0.06)	0.29 (0.27 – 0.31)	0.15 (0.13 – 0.17)
LDA	0.07 (0.06 – 0.08)	0.29 (0.26 – 0.33)	0.18 (0.17 – 0.19)
LEA	27.10 (21.37 – 32.38)	68.06 (61.34 – 75.37)	32.02 (29.87 – 34.47)
LFIA	0.01 (0.01 – 0.02)	0.08 (0.07 – 0.09)	0.04 (0.04 . – 0.05)

Table 2: CL₉₉ (µL/mL) and confidence limits of *Cymbopogon schoenanthus*, *Mentha piperita* and *Cymbopogon martinii* in egg hatch assay (EHA), larval development assay (LDA), larval exsheathment assay (LEA) and larval feeding inhibition assay (LFIA) against gastrointestinal nematodes of sheep.

	<i>C. schoenanthus</i>	<i>M. piperita</i>	<i>C. martinii</i>
EHA	0.3 (0.2-0.4)	1.1 (0.9 – 1.4)	0.7 (0.5 – 1.0)
LDA	0.3 (0.2 – 0.4)	1.0 (0.8 – 1.4)	0.4 (0.4 – 0.5)
LEA	59.6 (44.2 – 166.7)	264.0 (206.1 – 381.9)	64.4 (55.1 – 82.7)
LFIA	0.2 (0.2 – 0.3)	0.2 (0.2 – 0.3)	0.2 (0.2 – 0.3)

Table 3: Composition (%) and retention index (RI) of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Compound	RI	<i>C. martinii</i>	<i>C. schoenanthus</i>	<i>M. piperita</i>
alpha-pinene	935	-	-	0.6
sabinene	975	-	-	0.2
beta-pinene	978	-	-	0.9
6-methyl-5-heptenone	989	-	0.5	-
myrcene	993	0.4	-	-
3-octanol	995	-	-	0.1
p-cymene	1027	-	-	0.4
limonene	1031	0.3	-	2.0
1.8-cineole	1033	-	-	4.6
<i>cis</i> -ocimene	1040	0.4	-	-
<i>trans</i> -ocimene	1050	1.7	-	-
n.i.	1061	-	-	0.1
sabinene <i>cis</i> -hydrate	1070	-	-	0.1
linalool	1101	2.6	1.3	0.1
n.i.	1142	-	0.1	-
isopulegol	1149	-	-	0.2
n.i.	1153	-	0.1	-
citronelal	1156	-	0.5	-
menthone	1158	-	-	27.4
menthofuran + isomenthone	1167	-	-	9.7
menthol	1178	-	-	42.5
4-terpineol	1181	-	-	1.3
n.i.	1185	-	0.3	-
isomenthol	1186	-	-	0.4
alfa-terpineol	1192	-	-	0.2
decanal	1206	-	0.3	-
nerol	1228	0.1	-	-
citronelol	1232	-	3.6	-
pulegone	1242	-	-	1.8
neral	1244	0.2	8.2	-
piperitone	1257	-	-	0.2
geraniol	1262	81.4	62.5	-
geranial	1275	2.1	12.5	-
neo-menthyl acetate	1277	-	-	0.2
menthyl acetate	1295	-	-	4.6
geranyl formiate	1303	-	0.2	-
isomenthyl acetate	1309	10.1	-	0.1
citronelyl acetate	1356	-	0.1	-
eugenol	1360	-	0.2	-
beta-bourbonene	1384	-	-	0.1
geranyl acetate	1385	-	2.0	-
beta-elemene	1392	-	0.3	0.1
(<i>E</i>)-beta-caryophyllene	1418	0.8	3.4	1.6
alfa-humulene	1453	-	0.4	0.1
germacrene D	1480	-	-	0.1
gamma-humulene	1479	-	0.2	-
alpha-murolene	1498	-	0.2	-
n.i.	1501	-	0.1	-
gamma-cadinene	1511	-	0.5	-
delta-cadinene	1522	-	0.9	-
n.i.	1523	-	-	0.1
elemol	1549	-	0.4	-
caryophyllene oxide	1581	-	0.6	0.2
epi-alfa-cadinol	1640	-	0.3	-

alpha-cadinol	1653	-	0.4	-
n.i.	1842	-	0.1	-

n.i.: not identified.

|

CAPÍTULO 3

TRABALHO CIENTÍFICO

Improved in vitro test using *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts for potential use against nematodes of veterinary importance

Trabalho a ser enviado para a revista *Veterinary Parasitology*

(Normas para publicação da revista presentes no anexo)

Improved in vitro test using *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts for potential use against nematodes of veterinary importance

Luciana M. Katiki^a, Jorge F.S. Ferreira^{b*}, Anne M. Zajac^c, Carol Masler^d, David S.Lindsay^c, Ana Carolina S.Chagas^e, Alessandro F.T.Amarante^f

^a Instituto de Zootecnia (SAA,APTA), Rua Heitor Penteado 56, Nova Odessa-SP, cep13460-000, Brazil

^b Appalachian Farming Systems Research Center (USDA-ARS), 1224 Airport Rd., Beaver, WV 25813, USA

^c Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg VA 24060

^d Nematology Laboratory, USDA-ARS, BARC-West, Bldg. 011A, Rm. 165B, Beltsville, MD 20705-2350

^e Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz km 234, São Carlos, SP-Brazil

^f UNESP - Univ Estadual Paulista, Departamento de Parasitologia - IB, Botucatu - SP, Brazil

* **Corresponding author at:** 1224 Airport Rd., Beaver, WV 25813-USA. Tel. +1 304 256-2827; Fax: +1 304 256-2921. E-mail address: Jorge.Ferreira@ars.usda.gov

Código de campo alterado

Subtitle: *C. elegans* as a screening model for anthelmintic plant extracts

Keywords: *C. elegans*, anthelmintic plants screening, gastrointestinal nematodes, plant extracts.

ABSTRACT

The most challenging obstacles to testing plant products for their anthelmintic activity are: 1) establishing a suitable nematode *in vitro* assay from which results can be indicative of potential use against a parasitic nematode of interest, and 2) preparing the extracts in a way that, once lyophilized, they can be redissolved in solvents that are miscible in the test medium, and at concentrations well tolerated by the nematode system used for screening. The use of parasitic nematodes as a screening system is hindered by the difficulty of keeping them alive for long periods outside their host and by the need to keep infected animals as sources of

eggs or adults when needed. This method uses the free-living soil nematode *Caenorhabditis elegans* as a system to screen plant extracts for their potential anthelmintic effect against small ruminant gastrointestinal nematodes, including *Haemonchus contortus*. This modified method uses only liquid axenic medium, instead of agar plates inoculated with *E. coli*, and two selective sieves to obtain adult nematodes. During screening, the use of a balanced salt solution (M-9), instead of distilled water, resulted in 95-100% motile adults and improved results obtained with plant extracts. Adults could be produced to screen at least six plant extracts within a week. Extracts could be tested at five concentrations each, every 48 hours. Plant extracts prepared in water, ethanol:water (70:30), and acetone:water (70:30, with 0.5% acetic acid) were easily redissolved in the M-9 solution with 1% DMSO. While adult worms tolerated DMSO, ethanol, methanol, and Tween 80 at 1 and 2%, Labrasol (a bioenhancer with low toxicity to mammals) and Tween 20 were very toxic to *C. elegans* even at 1%. The high availability, ease of culture, and rapid proliferation of *C. elegans* make it a useful screening system to test plant extracts and other plant products to investigate their potential anthelmintic activity against parasitic nematodes.

1. Introduction

Caenorhabditis elegans is a free-living nematode naturally found in temperate climate soils. Experimentation with this nematode began in 1960 when researchers were looking for a multicellular organism, with a few cells, easy to raise and reproduce for embryonic developmental studies. Since then, *C. elegans* has become one of the most studied nematode in many areas of biology.

The Order Rhabditida, to which *C. elegans* belongs, is closely associated with the Order Strongylida, which contains the important trichostrongyle parasites of ruminants, including *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus* spp. The rhabditid and strongylid nematodes have been placed in Clade V based on genetic analysis. Other common nematodes of domestic animals and humans are less closely related and have been placed in other clades, for example, ascarid and filarial worms are in Clade III, and *Trichinella* and *Trichuris* in Clade I (Geary et al., 2001).

Simpkin and Coles (1981) examined the effect of commercial anthelmintics using *C. elegans* as an experimental model and concluded that this nematode satisfies many of the criteria needed for an *in vitro* test because it is cheap, readily available, and easy to work with. Since then, other parasitologists have also used this model to screen anthelmintic drugs

(McGaw et al., 2007). Besides the nematocidal effect, the mode of action of anthelmintic drugs can be evaluated *in vitro* through nematode behavior, locomotion, and reproduction. If tested drugs are effective in *C. elegans* cultures at low concentrations, it is reasonable to assume that they also will have anthelmintic activity against related nematodes, including *Haemonchus contortus* (Thompson et al., 1996).

Gastrointestinal parasitism is a serious problem in small ruminant production due to high morbidity and high mortality caused by *H. contortus* and related nematodes. This problem has been aggravated by the growing reports of multi-drug resistant gastrointestinal parasites worldwide (Jackson and Coop, 2000; Zajac and Gipson, 2000; Kaplan, 2004). The best test to determine if a compound has anthelmintic activity for veterinary use would be to use infections in the natural ruminant host. However, this requires livestock facilities and large amounts of plant material, making extensive screening not feasible. To facilitate initial screening of products, several *in vitro* assays have been used extensively to assess potential anthelmintic activity of natural compounds, including the egg hatch assay, the larval motility assay, and others (Jackson and Hoste, 2006; Egualé et al., 2007; Brunet et al., 2008). However, these assays do not involve testing products against late larval and adult stages, which are the parasitic stages in the definitive host. Using a *C. elegans* model for screening provides the advantages of a low cost *in vitro* laboratory method combined with the ability to examine activity of compounds against those nematode stages that are parasitic in related nematode species. The purpose of this work was to test *C. elegans* grown and selected (adults) with sieving, using only axenic liquid cultures, as a model to screen crude plant extracts for their potential anthelmintic activity.

2. Materials and methods

2.1 Maintenance of *C. elegans*.

Strain N2 (wild type) acquired from the USDA Nematology Laboratory, Beltsville, MD, was raised in an axenic culture medium composed of 90 mL distilled water, 3.0 g yeast extract (catalog No. Y1625, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), 3.0 g soy peptone (Sigma P-0521), 1.0 g dextrose, 0.25 mL cholesterol (Sigma cat. No. C8667) solution (5 mg cholesterol per 1.0 mL 95% ethanol). The medium was autoclaved and then supplemented with 10 mL of a hemoglobin stock solution containing 0.5% hemoglobin (Sigma cat. No. H-2500) in 100 mL 0.001M KOH filter-sterilized through a 0.45 µm filter, then through a 0.22 µm sterile filter, and frozen until needed. Worms were sub-cultured each week by transferring

two drops from a one-week-old culture to a sterile scintillation vial containing 1.0 mL of fresh medium, and incubated at 24°C.

2.2 Isolation of adult nematodes

Four vials containing 1.0 mL of *C. elegans* axenic culture 5-7 day old were transferred to a 50-mL tube and the volume was completed with sterile distilled water. All stages of the life cycle were present and the tube was placed in a rack for three minutes to allow settling of the largest nematodes. The surface water containing smaller floating nematodes was then removed to reduce the volume to approximately 0.5 mL. Nematodes were separated according to their size using two sieves. Sieves were created by inserting filter cloth between 2 pieces of PVC pipe of 2.1 and 1.9 cm diameter. First, we used a sterile 38 µm sieve to allow all remaining smaller nematodes to migrate through the sieve and retain all the larger ones. More distilled water (about 10 mL) was used to facilitate the migration. This procedure retained young adults, adults, and large dead nematodes. Nematodes retained in the 38 µm sieve were washed with 50 mL sterile water onto a larger mesh 53-µm sieve. In this procedure all active nematodes (adults and young adults) passed through the mesh and all dead and inactive nematodes were retained because they were unable to migrate. The selection process was performed twice with each sieve, resulting in a suspension in which 95% of the adult nematodes were alive and active. The final solution had a concentration of approximately 50 nematodes/20 µl. Nematodes were identified as adults, L₄ or L₁-L₃ by size and vulva development. The development of the vulva was observed with an inverted microscope. The L₄ could be recognized by the incomplete development of the vulva, which was present as a clear area with a semi-circular shape in the genital area midway along the length of the nematode. During the change from L₄ to adult stage, the vulva becomes prominent and the clear area disappears (Bull et al., 2007). The tests were performed with young adults and adults with intact cuticle. Young adults are similar in the morphology to adults, but smaller.

2.3 Plant extract and assay preparation

Tests were performed using a balanced salt solution (M-9) as the diluent for plant extracts and for the nematode stock with 50 nematodes/20 µL. M-9 solution was composed of 1.5 g KH₂PO₄, 3 g Na₂HPO₄, 2.5 g NaCl, 0.5 mL 1 M MgSO₄, and sterile distilled water to bring the volume to 500 mL (Brenner, 1974). Tests were performed in 24-well plates with 6 replicates for each treatment. Each plant extract was tested at concentrations from 2.5 to 25 mg/mL, with a negative control (M-9 with 1% DMSO), and a positive control (levamisole 8

mg/mL, Sigma No. 196142). Each well contained approximately 50 *C. elegans*. The 24-well plates were covered with transparent plastic, and incubated at 24°C for 24 hours. The M-9 medium produced better nematode survival in the control group and higher anthelmintic efficacy of the plant extracts than using distilled water, perhaps because the medium better preserved the nematode's osmotic balance.

2.4 Assay evaluation

After incubation at 24°C for 24 hours, plates were read using an inverted microscope and all nematodes counted and determined as motile or nonmotile. They were considered motile when they exhibited any movement, and as non-motile when there were no tail, head, or pharyngeal movement during 5 seconds of observation (Skantar et al., 2005). It is important to differentiate motility in adult nematodes from movement caused by larvae hatched from eggs inside the body of dead *C. elegans*. The negative control group consistently showed 95-100% motile nematodes and the positive control (levamisole) 0% motile nematodes 24 h after incubation.

3. Results and Discussion

Our work showed that, regardless of the plant material tested, lyophilized plant material extracted with a non-polar solvent such as hexane or petroleum ether (polarity index = 0) or material in a pure solvent such as ethanol (polarity index = 5.0) was undissolved or incompletely dissolved in the aqueous M-9 with 1% DMSO (surfactant and absorption enhancer). Worms could tolerate up to 2% DMSO, ethanol, methanol, acetone or Tween 80 without loss of motility, but 2% Tween 20 and 1% Labrasol (Gatefoseé, France) were very toxic to *C. elegans* (Table 4). However, even 2% DMSO or Tween 80 could not dissolve lyophilized extracts made with low polarity solvents (e.g., dichloromethane, chloroform, pure ethanol) or non-polar solvents (e.g., hexane, petroleum ether), and those solvents were avoided for plant extract preparation. Plant extracts used in this screening system were prepared using either boiling (100°C) water, ethanol:water (70:30) at 60°C for plants without tannins, or acetone:water with 0.5% acetic acid (70:30) (at room temperature or at 50°C using pressurized liquid extraction) for plants containing tannins. Extracts made with these solvents, plus water, were fairly easy to dissolve in M-9 with 1% DMSO. The bioenhancer Labrasol® is very effective in dissolving lyophilized plant extracts for anthelmintic testing without toxicity in gerbils at 25% (Squires et al., 2010), or in mice at 66% (Ribnicky et al., 2009), but killed

Código de campo alterado

Código de campo alterado

all nematodes in this *in vitro* system even at 1% and could not be used for plant extract dissolution.

This procedure differs from previously described *C. elegans* screening tests (Stiernagle, 2006) in the following ways: 1) an axenic liquid medium instead of agar plate cultivation was used for maintenance of *C. elegans*, 2) nylon sieves of 30 and 53 μm pore size were used to select adult nematodes for testing, instead of life cycle synchronization, and 3) only adult nematodes were used, rather than multiple stages, to carry out the tests. The main advantages of using axenic liquid medium instead of agar plates with *E. coli* lawns are: 1) time and effort saved by avoiding agar plate preparation and inoculation with *E. coli* as a food source for *C. elegans*, 2) reduction in contamination and elimination of antibiotics during the screening tests, and 3) prevention of bacterial metabolism of phytochemicals in the extract (Simpkin and Coles, 1981). Additional time savings come from selecting worms through sieving and avoiding the synchronization process.

4. Conclusion

C. elegans cultured in medium containing heme (hemoglobin), replaces the use of agar plates with an *E. coli* lawn. This axenic culture method is simpler and faster method for providing large numbers of clean, active adult nematodes. By using the selective sieves described here, it is possible to collect many adults, within one week, in a small volume of medium. Freezing the culture medium in small volumes makes it rapidly available when needed, in any quantity, compared to preparation of *E. coli* inoculated agar plates. As a result, one person could screen at least six plant extracts with results available in 48 hours instead of 72-96 hours using agar plates with *E. coli*.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest. Brand names were used solely for the convenience of the reader and do not imply USDA-ARS endorsement over similar products.

Acknowledgements

This work received financial support from CAPES. We greatly appreciate the support of Dr. David Chitwood (USDA-ARS Nematology Lab) and his technical and scientific staff at the onset of this work. We are also grateful for the efforts of Mr. Marc Peele (AFSRC, USDA-ARS) who also assisted with maintenance of *C. elegans* cultures.

References

- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38, 783–790.
- Bull, K., Cook, A., Hopper, N.A., Harder, A., Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2007. Effect of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.* 37, 627-636.
- Eguale, T., Tilahun, G., Debella, A., Feleke, A., Makonnen, E., 2007. *Haemonchus contortus*: *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. *Exper. Parasitol.* 116, 340–345.
- Geary, T.G., Thompson, D.P., 2001. *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Vet. Parasitol.* 101, 371-386.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253-261.
- Jackson, F., Coop, R.L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120, S95–S107.
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20, 477–481.
- McGaw, L.J., Van der Merwe, D., Eloff, J.N., 2007., *In vitro* anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. *Vet. J.* 173, 366-372
- Ribnicky, D.M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Zuberi, A., Cefalu, W.T., Raskin, I., 2009. Improved absorption and bioactivity of active compounds from an anti-diabetic extract of *Artemisia dracuncululus* L. *Int. J. Pharmaceutics* 370, 87-92.
- Simpkin, K.G., Coles, G.C.C., 1981. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *J. Chem. Technol. Biotech.* 31, 66-69.
- Skantar, A.M., Agama, K, Meyer, S.L.F., Carta, L.K., Vinyard, B.T., 2005. Effects of geldanamycin on hatching and juvenile motility in *Caenorhabditis elegans* and *Heterodera glycines*. *J. Chem. Ecol.* 31, 2481-2491.

Squires, J.M., Ferreira, J.F.S., Lindsay, D.S., Zajac, A.M., 2010, Effects of artemisinin and artemisia extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* (In press) DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.09.011.

Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

Thompson, D.P., Klein, R.D., Geary, T.G., 1996. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. *Parasitology* 113, S217-S238.

Zajac, A.M., Gipson, T.A., 2000. Multiple anthelmintic resistance in a goat herd. *Vet. Parasitol.* 87, 163–172.

Código de campo alterado

Table 4. Effect of solvents (DMSO, ethanol, methanol, acetone, Labrasol[®], Tween 20 and Tween 80) in the adult *C.elegans* motility test. Results are the averages (two tests with six replicates each) in percent (%) of motile worms observed at each solvent concentration. Average % motile adult larvae in the M-9 control medium ranged from 95-100% 24 hours after incubation.

Solvent concentration	1%	2%	4%	6%
DMSO	91.89%	82.86%	45.74%	33.77%
Ethanol	95.85%	87.45%	82.32%	44.05%
Methanol	90.76%	81.11%	83.98%	54.08%
Acetone	90.71%	82.52%	73.58%	56.25%
Labrasol	0%	0%	0%	0%
Tween 20	29.55%	9.23%	9.28%	9.53%
Tween 80	94.28%	94.10	70.30%	44.14%

CAPÍTULO 4

TRABALHO CIENTÍFICO:

Anthelmintic activity of Cymbopogon schoenanthus, Cymbopogon martinii and Mentha piperita essential oils against Strongyloides venezuelensis in artificially infected Wistar rats.

Trabalho a ser enviado para a revista Veterinary Parasitology

Normas para publicação da revista presentes no anexo

Anthelmintic activity of *Cymbopogon schoenanthus*, *Cymbopogon martinii* and *Mentha piperita* essential oils against *Strongyloides venezuelensis* in artificially infected Wistar rats.

L.M. Katiki^a, A.C.S. Chagas^b, H.R. Bizzo^c, J.F.S. Ferreira^d, A.F.T. Amarante^e

^a IZ - Instituto de Zootecnia (SAA, APTA), Rua Heitor Penteadó 56, Nova Odessa - SP, CEP13460-000, Brazil

^b EMBRAPA - Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz km 234, São Carlos, SP- CEP 13560-970, Brazil,

^c EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 – Rio de Janeiro - RJ, CEP 23020-470, Brazil

^d USDA-ARS - Appalachian Farming Systems Research Center, 1224 Airport Rd., Beaver, WV 25813, USA

^e UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Parasitologia – IB, Botucatu-SP, CEP 18618-970, Brazil

* **Corresponding author:** Rua Heitor Penteadó, 56. CEP 13460-000, Nova Odessa – SP – Brazil. Tel. +55 19 34669400, Fax: +55 19 34661279. **E-mail address:** lmkatiki@iz.sp.gov.br

Keywords: *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus*, *Mentha piperita*, essential oil, *Strongyloides venezuelensis*, anthelmintic

Abstract

The anthelmintic activity of *Cymbopogon schoenanthus*, *Cymbopogon martinii* and *Mentha piperita* essential oils in doses of 1.5 mL/kg or 2.3 mL/kg were evaluated against *Strongyloides venezuelensis* in artificially infected Wistar rats. Three doses of essential oils with intervals of 24 hours were given to 10 rats in each treatment. Animals were fasted for eight hours before and for three hours after each treatment. Fecal egg count was performed daily and total worm count done at the fifth day after the first treatment. Negative control received Sorbitol (diluent) and positive control received albendazole (10 mg/kg of body

weight). The essential oils, at the dosages tested in the current study, had no anthelmintic effect against *S. venezuelensis* in rats. On the other hand, albendazole was highly effective and demonstrated that this model is a reliable system for assessing in vivo anthelmintic efficacy.

1-Introduction

Anthelmintic resistance developed by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus* spp. has caused several economic losses resulting in reduction of productivity in small ruminant industry. For this reason, there is an urgency to find new anthelmintic compounds for veterinary use, especially for sheep and goats.

Bioassays with rats artificially infected with nematodes are a feasible and fast way to screen plant products for their potential anthelmintic activity. This is the case of rodents infected with *Strongyloides venezuelensis*, which can be used as a nematode model to evaluate anthelmintic activity. *S. venezuelensis* is a parasite naturally found in rats, which life cycle and pathogenicity are well established (Marra et al., 2010). Bioassays using rodents have the advantage of providing a controlled environment and employ smaller amounts of drugs or plant extracts than those needed in the target species.

The anthelmintic effect of several plant extracts have been evaluated against different pathogens. This is the case of plants of *Cymbopogon* genus that belongs to Poaceae family and its origin is from Southeast Asia with about 40 species. The distribution of *Cymbopogon* species occurs in warm regions from tropics and subtropics (Yentéma et al., 2007). *Mentha* genus belongs to Lamiaceae family and is cultivated from temperate to tropical climates. *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils are used for production of food, pharmacy and cosmetics industry. It is rich in monoterpenes and its composition can be highly influenced by ambiental conditions (Souza et al., 2006).

M. piperita, *C. martinii* and *C. schoenanthus* essential oils had their effect previously tested *in vitro* using larval stages of *H. contortus* and *Caenorhabditis elegans* (Katiki et al., unpublished results). Beside results from *in vitro* tests, some parasiticide effects were reported, such as: *M. piperita* essential oil had insecticidal activity against four major Coleopterans that attack stored grains (Shaaya et al., 1991) and larvicidal and mosquito repellent (Ansari et al., 2000); *C. martinii* essential oil had nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* (Pandey et al., 2000) and *C. elegans* (Kumaran et al., 2003); and *C.*

schoenanthus essential oil had both insecticidal activity against termites (**Reticulitermes speratus**) (Koba et al., 2007) and bruchids (*Callosobruchus maculatus*) (Ketoh et al., 2002).

The aim of this work was evaluate the anthelmintic activity of *M. piperita*, *C. martinii* and *C. schoenanthus* essential oils against Wistar rats artificially infected with the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis*.

2-Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats 25-days-old and weighing approximately 100 g were acquired from Central Bioterium-IB-UNESP-Botucatu. Animals were arranged in groups of 5 in plastic boxes with rodent chow and water provided *ad libitum*.

All experimental protocols were approved by the FMVZ-UNESP-Botucatu Animal Care and Use Committee.

2.3. *Strongyloides venezuelensis*

It was used a *S. venezuelensis* strain maintained in Wistar rats at the Parasitology Department-UNESP-Botucatu since its isolation in the 80's. Fecal cultures were made in Petri dishes (3 days at 25 °C) for production of infective larvae (L₃), which were collected by baermanization (25 µm sieve and water at 40°C).

2.4. Artificial infection

Rats were infected with 2.000 L₃ of *S. venezuelensis* mixed in 0.1 mL of distilled water, subcutaneously, in the fold between the belly and the thigh using an insulin syringe. Animals were kept in the bioterium under controlled light and temperature during 7 days until infection was confirmed through fecal examination.

2.5. Essential oils:

Oils were acquired from WNF Ind. & Com. LtdaR. Dr. Mario Pinto Serva, 64, Sao Paulo-SP, Brazil). Details of the oils are the following: *Mentha piperita* oil lot no.164, density (d)=0.919; *Cymbopogon martinii* oil lot no. 081, d=0.884 and *Cymbopogon schoenanthus* oil lot no.10608, d=0.911.

2.5.1. GC-MS analysis

Analyses of the essential oils chemical composition were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry using an Agilent 5973N GC-MS system equipped a HP5MS capillary column (5%-difenil-95%-dimetilsilicone, 30m X 0,25mm X 0,25µm). The injector was set at 250°C and the oven programmed to go from 60 to 240°C at an increase of 3°C/min. Mass detector was operated in electronic ionization mode, at 70eV. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0mL/min. Sample volume was 1.0µL, and consisted of 1% essential oil in dichloromethane. A split ratio of 1:100 was used. Mass spectra were compared with data from Wiley 6th ed library. The retention indexes were calculated based on data generated by a series of alkenes (C₇-C₂₆) injected in the same column and conditions specified above and compared to those found in the literature (Adams, 2007). Identification was based in both mass spectrum and retention index. Mentone, menthol, geraniol and geranial were also identified by injection of authentic standards.

2.5.2. GC-FID analysis

For quantification of components, the oils were analyzed in an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a HP5 capillary column (5%-difenil-95%-dimetilsilicone, 30 m X 0.32 mm X 0.25 µm). Hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min. All other parameters were the same as described above. Results were reported in relative percentage of peak area.

2.6. Pilot test to establish toxicity of essential oils

The doses 0.03; 0.06; 0.1; 0.15; 0.2; 0.5; 0.7; 1; 2; 3; 4; 5; 6 and 7 mL/kg of *M. piperita*, *C. martinii* and *C. schoenanthus* essential oils were diluted in Tween 80 at 8% and water in a total volume of 1.000 µL and given by gavage to two rats infected with *S. venezuelensis* for each concentration. Rats were kept on fasting for eight hours pre-treatment and three hours post-treatment. They were evaluated at 1, 2, 4, 12, 24 and 48 hours after dosage, looking for abnormalities in clinical signs. Fecal egg counts (FEC) were also performed to evaluate possible effects on number of eggs shed in feces. If death occurred, necropsies were done to register important pathological finds.

2.7. Experiment

The intensity of *S. venezuelensis* infection was determined by counting the FEC. The rats were allocated into experimental groups based on their previous stratification according to their FEC. The animals were classified into 10 FEC classes of 8 animals each. Randomly, one rat of each class was allocated to groups with ten animals each. The groups were: Group 1 – control, sorbitol; Group 2 – treated with albendazole at 10 mg/kg (0.1 mL/kg body weight (BW), Valbazen®, Fort Dodge); Group 3 – treated with *C. schoenanthus* essential oil (1.5 mL/kg BW); Group 4 – treated with *C. schoenanthus* essential oil (2.3 mL/kg BW); Group 5 – treated with *C. martinii* essential oil (1.5 mL/kg BW); Group 6 – treated with *C. martinii* essential oil (2.3 mL/kg BW); Group 7 – treated with *M. piperita* essential oil (1.5 mL/kg BW); and Group 8 – treated with *M. piperita* essential oil (2.3 mL/kg BW). Animals were given treatment solutions orally by gavage in a total volume of 1 mL using Sorbitol as a vehicle, once a day for three consecutive days, except for the albendazole group, in which animals received a single dose. Animals were fasted for eight hours before and for three hours after each treatment.

2.8. Fecal examination

Fecal samples (0.5 g) from each animal were collected on the treatment day and again every day until 48 h after the third treatment administration. Samples were individually processed using the modified McMaster technique with a sensitivity of 300 eggs/g.

2.9. Parasite recovery

At the end of the experiment (five days after the first treatment), rats were euthanized by a lethal dose of a mixture of ketamine and xylazine. All digestive system was removed and the first 1/3 of the intestine was opened longitudinally, rolled up in a piece of wire, hanged in a 50 mL tube, covered on its totally with saline solution 0.9% and incubated at 39°C for 4 hours. The incubation fluid was preserved with formaldehyde (5%) for later count of *S. venezuelensis* parasites in an aliquot of 10% of each sample using a dissecting microscope. (Ueno and Gonçalves, 1998)

2.10. Statistics

Significant differences between groups were assessed by one-way analysis of variance using the statistical software, Minitab 11.21 (Minitab Inc., USA). Results of FEC or worm

burden were analyzed under logarithmic transformation ($\text{Log}(x + 1)$) and group means were compared using the Tukey test at $P < 0.05$.

3-Results

The potential effective and safe doses of the essential oils given to rats were defined by a pilot experiment conducted with rats artificially infected with *S. venezuelensis* dosed at concentrations ranging from 0.03 mL to 7 mL of essential oil/kg diluted in water plus Tween[®] 80. As there was no published information about the LD₅₀ for the essential oils to be used, results from those experiments indicated toxic and lethal concentrations, and doses that could be tolerated by the animals and that could result in a reduction in FEC after oral intake. Rats started to die at 3 mL/kg of *M. piperita*; 4 mL/kg of *C. martinii* and 5 mL/kg of *C. schoenanthus*.

One animal from the group *Mentha piperita* at 2.3 mL/kg died during the experiment with signs of intoxication. Neither the control group nor the essential oil groups had any significant reduction in FEC, while the Albendazole (0.1mL/kg) group had 100% reduction in FEC (Table 5).

There was no significant difference between the worm burden of groups treated with the essential oils in comparison with the control group (Table 6). In contrast, Albendazole reduced the worm count in 100%.

Oxygenated monoterpenes were the major constituents of the essential oils tested. *Mentha piperita* oil had approximately 42% menthol, followed by 27% menthone. *Cymbopogon martinii* oil had approximately 81% of geraniol and 10% geranyl acetate, *Cymbopogon schoenanthus* oil had approximately 62.5% geraniol, followed by 12.5% geranial and 8.2% neral (Table 7).

4-Discussion

Although safety margin was established during the pilot experiment one animal from the group given *M. piperita* oil at 2.3 mL/kg died with signs of intoxication. The observed signs

of intoxication from *M. piperita* were sudden excitement after oral dosing followed by dyspnea, lethargy and lateral decumbency. These were also the symptoms of *C. martinii* intoxication, while lethargy and lateral decumbency were the observed symptom of *C. schoenanthus*. At the end of pilot experiments all three emulsion of essential oils were found in the stomach of all necropsied rats in larger or smaller amount depending on the dose. The stomach mucosae were hyperemic and the external blood vessels were enlarged. We concluded that the essential oils went no further than the stomach. This probably prevented that the oils reached the small intestine, at doses that could be lethal for the target nematode. To improve the contact of essential oils with *S. venezuelensis*, we opted to use Sorbitol solution at 35% as the vehicle for the oils. Sorbitol is an osmotic cathartic saccharide which is used to accelerate the expulsion of substances from the upper gastrointestinal tract. The recommended dose is 4.3 mL/kg of pure sorbitol (American Academy of Clinical Toxicology, 2004), or 3.5 mL/kg of sorbitol 70% (Adams et al., 2006). Rats from all treatments received Sorbitol diluted with essential oils in a quantity to complete 1 mL (770 µl or 850 µl equivalent dose of 7.7 mL/kg or 8.5 mL/kg of sorbitol 70%). No signs of increase in intestinal motility or soft feces was observed in treatments with sorbitol.

In the present study, the nematode *S. venezuelensis* was chosen because it is a well known model system to study interactions between nematodes and their hosts, which are rats (Takamura, 1995). After subcutaneous injection, *S. venezuelensis* migrates subcutaneously or intramuscularly towards the upper body and eventually arrives in the lung 45 hours post infection. The larva passes through the trachea and appears in the small intestine after 60 hours, where it attaches to the mucosa and evolves to the adult form (Takamura, 1995). The nematode reaches adulthood and eggs are found in feces 5 days after infection (with peak infection at day 8). The FEC stays high until day 14th and, after that, there is a remarkable decline. In our experiment, animals were treated during three days starting in the 7th day, with total of three daily administration of essential oils in order to increase the peak of drug concentration in the attempt to achieve anthelmintic activity. However no significant reduction in FEC was found with any essential oil treatment. *S. venezuelensis* established itself in the forth initial portion of the small intestine where 95.5% to 97.4% of nematodes are found (Nakai and Amarante, 2001). In this regard, the third and fourth initial portions of the intestine were dissected and digested to recover all nematodes. No significant difference between any treatments with essential oils and control group was found, while Albendazole treatment eliminated all nematodes.

Infected rodents are a good model for testing anthelmintic products and sometimes it leads to promising results. For instance, Squires et al. (2010a) treated gerbils artificially infected with *H. contortus* with orange oil emulsion orally at 1200 mg/kg for 5 days. Orange oil emulsion caused 87.8% reduction in parasites. The orange Valencia oil was mixed with terpene oil, polysorbate 80, hydrogen peroxide and water (patented formula). This oil contains approximately 95% d-limonene and the authors attributed the effects to terpenes that may cause inhibitory effects on growth, parasite enzymes or plasma membrane pumps and interference with metabolic pathways. Two of our tested essential oils had d-limonene as a constituent, although at much smaller percentages than that reported by Squires et al. (2010a). *M. piperita* had the highest percentage of d-limonene (2%).

In other published reports, products tested for anthelmintic activity in rodents did not show anthelmintic activity. According to Squires et al. (2010b), in a similar experiment with gerbils infected with *H. contortus*, there was no anthelmintic effect of ethanolic extracts of *Artemisia* spp. or the essential oil of *A. annua*. None of the following plant extracts had any significant anthelmintic effect in the infected mice: *Chenopodium ambrosioides* crude extract 20% and infusion at 5 and 10% in mice infected with *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* (Borba and Amorim, 2004); *Luxemburgia octandra* ethanolic, methanolic and ethyl acetate extracts on mice naturally infected with *Aspiculuris tetraptera* and *Vampirolepis nana* (Silva et al., 2005); *Albizia anthelmintica*, *Azadirachta indica*, *Aframomum sanguineum*, *Dodonea angustifolia*, *Hildebrandtia sepalosa*, *Myrsine africana* and, *Rapanea melanophloeos* water extract in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus* (Githiori et al., 2003b). According to classification by the efficacy index proposed by the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, a synthetic product is effective when the action is above 90%, moderately effective when its action ranges between 80% and 90%, not very effective when the action ranges between 60% and 80%, and not effective at levels below 60% (Wood et al., 1995). However, if the effect of a plant extract or essential oil is unknown, a reduction of 70% in FEC or total worm count (TWC) can be used as a cut-off point for biological significance because we are not testing one individual compound, but a crude mixture of natural compounds (GITHIORI et al., 2003a). All essential oils showed less than 70% of reduction in both FEC and TWC in this experiment. However, almost 70% activity was obtained by *Lippia sidoides* essential oil in mice naturally infected with *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*, at doses of 1.200 and 1.600 mg/kg, with a reduction in worm burden of 57.6% and 68.9%, respectively (Camurça-Vasconcelos et al., 2007).

These facts support the use of rodents naturally or artificially infected with parasites as models for testing anthelmintic action of plants or products and indicates that the search for an effective anthelmintic oil should not be abandoned, as illustrated by the recent results published by Squires et al. (2010a).

In conclusion, the essential oils, at the dosages tested in the current study, had no anthelmintic effect against *S. venezuelensis* in rats. On the other hand, albendazole was highly effective and demonstrated that this model is a reliable system for assessing *in vivo* anthelmintic efficacy.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest. Brand names were used solely for the convenience of the reader and do not imply endorsement over similar products.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Mauricio Etechebere and Camila Olivo Carvalho for providing technical support.

References

- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 804 pp.
- Adams, B., Mann, M.D., Aboo, A., Isaacs, S., Evans, A., 2006. The effects of sorbitol on gastric emptying half-times and small intestinal transit after drug overdose. *Am. J. Emerg. Med.*, 24, 130-138.
- American Academy of Clinical Toxicology and European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists, 2004. Position Paper: Cathartics. *J.Toxicol.Clin.Toxic.*, 42, 243-253.
- Ansari, M.A., Vasudevan, P., Tandon, M., Razdan, R.K., 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresource Technol.*, 71, 267-271.
- Borba, H.C., Amorim, A, 2004. Avaliação da atividade de extratos aquosos de *Chenopodium ambrosioides* (erva de santa Maria) em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspicularis tetraptera*. *Rev. Bras. Parasitol.Vet.*, 13, 4, 133-136.
- 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., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet. Parasitol.*, 148, 288-294.
- Githiori, J.B., Høglund, J., Waller, P.J., Baker, R.L., 2003a. The anthelmintic efficacy of the plant, *Albizia anthelmintica*, against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Vet. Parasitol.*, 116, 23-34.
- Githiori, J.B., Høglund, J., Waller, P.J., Baker, R.L., 2003b. Evaluation of anthelmintic properties of extracts from some plants used as livestock dewormers by pastoralist and smallholder farmers in Kenya against *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Vet. Parasitol.*, 118, 215-226.
- Ketoh, G.K., Glitho, A.I., Huignard, J., 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (coleopteran: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *J. Econ. Entomol.*, 95, 174-182.

- Koba, K., Poutouli, P.W., Nenonene, Y.A., Songai, M.S., 2007. Chemical composition and anti-termite activity of three tropical essential oils against termite species *trinervitermes geminates*. *J. Sci. Technol.*, 5, 39-46.
- Kumaran, A.M., D'Souza, P., Agarwal, A., Bokkolla, R.M., Balasubrananiam, M., 2003. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. *Phytother. Res.*, 17, 957-957.
- Marra, N. M.; Chiuso-Minicucci, F.; Machado, G. C.; Zorzella-Pezavento, S. F. G.; França, T. G. D.; Ishikawa, L. L. W.; Amarante, A. F. T.; Sartori, A.; Amarante, M. R. V., 2010. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105, 57 - 61.
- Nakai, E.S., Amarante, A.F.T., 2001. Experimental infection in mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus norvegicus*) by *Strongyloides venezuelensis*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 10, 1-6.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N., Kumar, S., 2000. Essential oils as potent sources of nematocidal compounds. *J. Phytopathol.*, 148, 501-502.
- Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juven, B., Zisman, U., Pissarev, V., 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *J. Chem. Ecol.*, 17, 1573-1561.
- Silva, S.L.C., Alves, C.C.F., Borba, H.R., Carvalho, M.G., Bonfim, T.C.B., 2005. Evaluation of the anthelmintic activity of extracts from *Luxemburgia octandra* in mice naturally infected with *Aspicularis tetraptera* and *Vampirolepis nana*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 14, 106-108.
- Souza, W.P., Queiroga, C.L., Sartoratto, A., Honorio, S.L., 2006 Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* durante o período diurno em cultivo hidropônico. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8, 108-111.
- Squires, J.M., Foster, J.G., Lindsay, D.S., Caudell, D.L., Zajac, A.M., 2010a. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. *Vet. Parasitol.*, 172, 95-99.

- Squires, J.M., Ferreira, J.F.S., Lindsay, D.S., Zajac, A.M., 2010b. Effects of artemisinin and artemisia extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Vet. Parasitol. (In press) DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.09.011.
- Takamure, A., 1995. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. Int. J. Parasitol., 25, 907-911.
- Ueno, H.; Gonçalves, P.C. , 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4th ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone Jr., J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). Vet.Parasitol. 58, 181--213
- Yentéma, O., Alioune, O., Dorosso, S.A., 2007. Chemical composition and physical characteristics of the essential oil of *Cymbopogon schoenanthus* of Burkina Faso. J. Appl. Sci., 7, 503-506.

Table 5: Mean (standard deviation) of eggs per gram (EPG) of feces (transformed data (\log_{10} (EPG + 1) from Wistar rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis* and treated with albendazole, *Cymbopogon schoenanthus*, *Cymbopogon martinii* and *Mentha piperita* essential oils.

Group	doses	n	before	24 h after 1 ^o dose	24 h after 2 ^o dose	24 h after 3 ^o dose	48h after 3 ^o dose
Albendazole*	0.1mL/kg	10	4.75 (0.16) _a	0 (0) _b	0 (0) _b	0 (0) _b	0 (0) _b
Control #	1 mL	10	4.59 (0.15) _a	4.60 (0.16) _a	4.59 (0.39) _a	4.40 (0.19) _a	4.41 0.18 _a
<i>C. schoenanthus</i>	1.5 mL/kg	10	4.61 (0.15) _a	4.62 (0.24) _a	4.56 (0.24) _a	4.36 (0.22) _a	4.24 0.23 _a
<i>C. schoenanthus</i>	2.3 mL/kg	10	4.56 (0.15) _a	4.83 (0.26) _a	4.65 (0.36) _a	4.46 (0.27) _a	4.30 0.27 _a
<i>M. piperita</i>	1.5 mL/kg	10	4.63 (0.16) _a	4.81 (0.19) _a	4.82 (0.34) _a	4.68 (0.30) _a	4.37 0.22 _a
<i>M. piperita</i>	2.3 mL/kg	9	4.55 (0.16) _a	4.93 (0.23) _a	5.02 (0.23) _a	4.67 (0.26) _a	4.66 0.47 _a
<i>C. martinii</i>	1.5 mL/kg	10	4.56 (0.13) _a	4.59 (0.28) _a	4.56 (0.32) _a	4.44 (0.35) _a	4.19 0.17 _a
<i>C. martinii</i>	2.3 mL/kg	10	4.59 (0.16) _a	4.79 (0.20) _a	4.79 (0.25) _a	4.57 (0.23) _a	4.26 0.28 _a

Values with different letters in the column are significantly different by Tukey test at 5%.

#Animals from control group received 1mL of Sorbitol (diluent)

*Valbazen® (Pfizer) conc: 10g Albendazole/100mL

Table 6: Mean (standard deviation) worm burdens from small intestine of Wistar rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis* after treatment with albendazole, *Cymbopogon schoenanthus*, *Cymbopogon martinii*, and *Mentha piperita* essential oils.

Groups	doses/kg BW	nworm	average (standard deviation)
Control (sorbitol)	#	10	93.10 (39.80) _a
<i>M. piperita</i>	1.5 mL/kg	10	104.9 (57.14) _a
<i>M. piperita</i>	2.3 mL/kg	9	103.33 (29.80) _a
<i>C. schoenanthus</i>	1.5 mL/kg	10	70.40 (32.74) _a
<i>C. schoenanthus</i>	2.3 mL/kg	10	81.70 (24.21) _a
<i>C. martinii</i>	1.5 mL/kg	10	84.20 (35.64) _a
<i>C. martinii</i>	2.3 mL/kg	10	90.30 (33.05) _a
Albendazole*	0.1mL/kg	10	0 ± 0 _b

Values with different letters in the column are significantly different by Tukey test at 5%.

Animals from control group received 1mL of Sorbitol (diluent)

*Valbazen® (Pfizer)conc: 10g albendazole/100mL

Table 7: Composition (%) and retention index (RI) of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Compound	RI	<i>C. martinii</i>	<i>C. schoenanthus</i>	<i>M. piperita</i>
alpha-pinene	935	-	-	0.6
sabinene	975	-	-	0.2
beta-pinene	978	-	-	0.9
6-methyl-5-heptenone	989	-	0.5	-
myrcene	993	0.4	-	-
3-octanol	995	-	-	0.1
p-cymene	1027	-	-	0.4
limonene	1031	0.3	-	2.0
1.8-cineole	1033	-	-	4.6
<i>cis</i> -ocimene	1040	0.4	-	-
<i>trans</i> -ocimene	1050	1.7	-	-
n.i.	1061	-	-	0.1
sabinene <i>cis</i> -hydrate	1070	-	-	0.1
linalool	1101	2.6	1.3	0.1
n.i.	1142	-	0.1	-
isopulegol	1149	-	-	0.2
n.i.	1153	-	0.1	-
citronelal	1156	-	0.5	-
menthone	1158	-	-	27.4
menthofuran + isomenthone	1167	-	-	9.7
menthol	1178	-	-	42.5
4-terpineol	1181	-	-	1.3
n.i.	1185	-	0.3	-
isomenthol	1186	-	-	0.4
alfa-terpineol	1192	-	-	0.2
decanal	1206	-	0.3	-
nerol	1228	0.1	-	-
citronelol	1232	-	3.6	-

pulegone	1242	-	-	1.8
neral	1244	0.2	8.2	-
piperitone	1257	-		0.2
geraniol	1262	81.4	62.5	-
geranial	1275	2.1	12.5	-
neo-menthyl acetate	1277	-	-	0.2
menthyl acetate	1295	-	-	4.6
geranyl formiate	1303	-	0.2	-
isomenthyl acetate	1309	10.1	-	0.1
citronelyl acetate	1356	-	0.1	-
eugenol	1360	-	0.2	-
beta-bourbonene	1384	-	-	0.1
geranyl acetate	1385	-	2.0	-
beta-elemene	1392	-	0.3	0.1
(<i>E</i>)-beta-caryophyllene	1418	0.8	3.4	1.6
alfa-humulene	1453	-	0.4	0.1
germacrene D	1480	-	-	0.1
gamma-humulene	1479	-	0.2	-
alpha-muurolene	1498	-	0.2	-
n.i.	1501	-	0.1	-
gamma-cadinene	1511	-	0.5	-
delta-cadinene	1522	-	0.9	-
n.i.	1523	-	-	0.1
elemol	1549	-	0.4	-
caryophyllene oxide	1581	-	0.6	0.2
epi-alpha-cadinol	1640	-	0.3	-
alpha-cadinol	1653	-	0.4	-
n.i.	1842	-	0.1	-

n.i.: not identified.

CAPÍTULO 5

TRABALHO CIENTÍFICO

***Anthelmintic activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil against
Haemonchus contortus in artificially infected lambs.***

Trabalho a ser enviado para a revista Veterinary Parasitology

Normas para publicação da revista presentes no anexo

**Anthelmintic activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil against
Haemonchus contortus in artificially infected lambs**

L. M. Katiki^{a*}, A. C. S. Chagas^b, R. K. Takahira^c, H.R. Juliani^d, J.F.S. Ferreira^e

A. F. T. Amarante^f

^a IZ - Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteado 56, CEP 13460-000, Nova Odessa-SP, Brazil

^b EMBRAPA - Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP-Brazil

^c UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, CEP 18618-970, Botucatu-SP, Brazil

^d Rutgers University- Department of Plant Biology - School of Environmental and Biological Sciences, New Jersey, 08901-8520, USA

^e Appalachian Farming Systems Research Center (USDA-ARS), 1224 Airport Rd., Beaver, WV 25813, USA

^f UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Parasitologia, IB, CEP 18618-970, Botucatu-SP, Brazil

* **Corresponding author at:** Rua Heitor Penteado, 56, CEP 13460-000, Nova Odessa – SP – Brazil. Tel. +55 19 34669400, Fax: +55 19 34661279. **E.mail address:** lmkatiki@iz.sp.gov.br

Keywords: *Cymbopogon schoenanthus*, essential oil, *Haemonchus contortus*, ovine, anthelmintic, nematicide

Abstract:

Hematophagous gastrointestinal parasites are responsible for significant economical losses in small ruminant grazing systems. The fast development of parasites with resistance to all classes of commercial anthelmintic drugs calls for intensive research on alternative treatments for the prophylaxis of gastrointestinal nematode infections in small ruminants. Lambs were artificially infected with a multidrug-resistant *Haemonchus contortus* strain and treated with *Cymbopogon schoenanthus* essential oil to evaluate its anthelmintic potential. Eighteen animals were allocated into three groups of six animals each that received one of the following treatments: Group 1 – control, no treatment; Group 2 – *C. schoenanthus* essential oil (0.2 mL/kg body weight (BW)); and Group 3 – *C. schoenanthus* essential oil (0.4 mL/kg BW). Animals received the oil once a day for 3 consecutive days. Lambs were evaluated clinically before, at 1, 5, 10, 15 and 20 days after treatment when the slaughter occurred. Although there was no statistically-significant reduction in fecal egg count (FEC) or in total worm count after both treatments, the dose of 0.2 mL/kg resulted in lower FEC and total worm count when compared to the higher dose and to the control. The 0.2 mL/kg treatment group also presented significantly higher levels of both packed-cell volume (PCV) and total seric protein (TSP), suggesting a positive physiological effect of the essential oil. There was no statistical difference among group means regarding to blood levels of urea, creatinine, albumine, alkaline phosphatase, aspartate amino transferase and gamma glutamyl transferase. The results indicate that the essential oil of *C. schoenanthus* is not toxic at the doses used and provides a beneficial effect on PCV and TSP of lambs infected with a drug-resistant *H. contortus* strain, although without significant reductions in FEC and worm burden.

1-Introduction

Haemonchus contortus is a hematophagous gastrointestinal parasite that represents the most serious sanitary problem in grazing sheep production systems in the tropics. The hot and humid climate favors larval development, increasing the reinfection rates of animals grazing in contaminated pastures. The severe blood loss caused by this parasite can result in anemia, anorexia, reduction in body weight, depression, and death.

The multiple drug resistance of this nematode to several commercial anthelmintics worsen this scenario (Rowe et al., 2008)

The search for alternative methods of parasite control and for products with anthelmintic activity is an urgent necessity for small ruminant production. Several researchers have approached this problem, and this study gives sequence to our previous work, in which anthelmintic activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil was evaluated *in vitro* by the egg hatch, larval development, larval feeding, and larval exsheathment assays performed with ovine trichostrongyles (Katiki et al., unpublished results).

C. schoenanthus is a Graminae that shows sedative, digestive and perfumed properties, with strong characteristic aroma. Some studies proved its action in biological control against insects (Keto et al., 2002; Koba et al., 2007). Although it was not found any study on the toxicity of *C. schoenanthus* essential oil to animals, the use does not need to be approved by regulatory agencies prior to use in food for humans and doesn't have limit for use but must conform to good manufacturing practices (FDA, 2006).

The objectives of this work were to evaluate the anthelmintic action of *C. schoenanthus* essential oil. *In vitro* evaluation included the inhibition of egg hatch and the larval development from oils given orally at 0.2 and 0.4 mL/kg to lambs artificially infected with *H. contortus* resistant strain. *In vivo* evaluation included the fecal egg count, total worm count, total plasmatic protein, packed cell volume, body weight and evaluation of eventual intoxication measured by changes in liver enzymes and kidney profile after the ingestion of essential oils.

2-Materials and Methods

A pilot test was carried out with a purpose to determine the best dose/effect of *C. schoenanthus* essential oil against nematodes in lambs. Eighteen East Friesian lambs naturally infected (94% *Haemonchus* spp and 6% *Trichostrongylus* spp) were divided in three homogeneous groups. Animals received oil at the doses of 0.2 mL/kg or 0.4 mL/kg and a control group received only water. In this pilot test it was observed a significant reduction in EPG ($P < 0.05$) at the 7th day after treatment for the 0.2 mL/kg group in comparison to group 0.4 mL/kg and water. Because of this significant previous

result, it was proposed the following experiment with artificial infection of *H. contortus* in lambs with the same treatments.

2.1. Animals

Eighteen lambs of Santa Ines breed with about three months of age, males, were kept indoors in collective stalls, where they were fed with coast-cross grass hay, mineral salt and water “*ad libitum*”.

All experimental protocols were approved by the FMVZ-UNESP-Botucatu Animal Care and Use Committee.

2.2. Removing parasite infection

Animals received levamisole phosphate (Ripercol F[®], Fort Dodge, Brazil) and albendazole (Valbazen[®], Pfizer, Brazil) at double prescription dose at every 24 hours during three consecutive days to remove any natural infection by nematodes. After this treatment, fecal samples were collected directly from the rectum of each animal for fecal examination, to confirm their worm-free status.

2.3. Artificial infection

One donor sheep was maintained with monoespecific infection with *H. contortus* Pratânia multiresistant strain (levamisole, albendazole, ivermectin, moxidectin, closantel and triclorfon), which was described by Almeida et al. (2010). Fecal cultures were done to obtain infective larvae (L₃). Each lamb was infected orally with 4,000 L₃ of *H. contortus*.

2.4. Groups:

Twenty-six days after infection, the sheep were weighed and nematode fecal egg counts (FEC) were carried out in a fecal sample of each animal. The lambs were

allocated into experimental groups based on their previous stratification according to their FEC. The animals were classified into 6 FEC classes of three animals each. Randomly, one lamb of each class was allocated to groups with six animals each. The groups were: Group 1 – control, no treatment; Group 2 – treated with *C. schoenanthus* essential oil (0.2 mL/kg body weight (BW)); and Group 3 – treated with *C. schoenanthus* essential oil (0.4 mL/kg BW). Animals were fasted for eight hours pre-treatment and four hours post-treatment. Groups received 0.2mL/kg or 0.4mL/kg of *C. schoenanthus* essential oil and water to complete 10 mL in a syringe, while the control group received just water (10 mL). Water was used to make a sufficient volume to carry the oil inside the animal body without any loss. This procedure was done three times in intervals of 24 hours.

2.5. Essential oil

Cymbopogon schoenanthus oil was acquired from WNF Ind. & Com. Ltda (R. Dr. Mario Pinto Serva, 64, Sao Paulo-SP, Brazil), Lot no.10608, d=0.911.

The oil was analyzed by gas chromatography (GC) coupled to a mass spectrometry (MSD) and flame ionization (FID) detectors (Agilent GC System 6890 Series, Mass Selective Detector, Agilent 5973 Network, FID detector). It was run in two separate columns (HP-5, 30m, 0.25 mm ID, 0.25µm Film), attached to the MSD and the FID. The conditions for both inlets and columns were the same: Helium constant flow was set at 1 mL/min. Inlet temperature was 220°C, temperature program, 60°C 1 min, 4°C/min, 200 °C 15 min. The temperature for the FID was set at 220°C and for MSD at 280°C. Qualitative analysis was based on a comparison of retention times and indexes on both columns and mass spectra with corresponding data in the literature and mass spectral libraries (Wiley 275)

2.6. Pre and post-treatment clinical evaluation:

Feces were collected to determine EPG, blood was collected by jugular puncture with vacuum tubes containing EDTA sodium to determine packed cell volume (PCV) and vacuum tubes without anticoagulant to evaluate total serum protein, albumin and liver enzymes (alkaline phosphatase-AP, gamma glutamyltransferase-GGT, aspartate

aminotransferase-AST) and kidney profile (urea, creatinine) at pre determined moments: before, 1, 5, 10, 15 and 20 days after treatment.

2.7. *In vitro* assays:

Fecal samples collected directly from the rectum of the lambs were mixed and five grams from each experimental group were washed to collect eggs and prepare *in vitro* assays according to Jackson and Hoste (2010) at the moments: before, 1, 5, 10 and 15 days after treatments.

2.7.1. *Egg hatching assay (EHA)*:

Around one hundred eggs from each group were added to wells and completed with distilled water to a final volume of 500 μ L. Each treatment had six replications. They were performed in 24 wells plate and incubated for 24 hours at 27°C and read in an inverted microscope to evaluate if treatments caused inhibition of egg hatching.

2.7.2. *Larval development assay (LDA)*:

Around one hundred eggs plus nutritive medium (*Escherichia coli*, yeast extract, amphotericin), were added to each well, according to Hubert and Kerbouef (1992). Each treatment had six replications. They were performed in 24 wells plate and incubated at 27°C for five days, read in an inverted microscope to evaluate the larval development under treatments.

2.8. *Total worm count*:

Twenty days after the last treatment lambs were euthanized in an abattoir. They were fasted previously for 24 hours. The abomasum were separated, its apertures were closed with a string, identified, packed individually in plastic bags and sent to laboratory in polystyrene box with ice for worm count. Males and female parasites were enumerated separately.

An incision in the major curvature of the abomasum was done and the content was deposited in a graduated bucket (20 liters). The mucosa was washed with tap water

and this water was collected until complete the volume of 2 litres. Mixing the solution and using a small scoop, samples were taken from the bucket and placed in flasks to complete a 200-mL aliquot, which corresponds to 10% of total volume of abomasums content. Formaldehyde (5%) was added to preservation and posterior counting.

Abomasum was immersed with the mucosa turned down in 200 mL of 0.9% saline solution pre-heated at 40°C and kept in an incubator at 40°C during 4 hours for liberation of nematodes enclosed to the mucosa. After incubation the solution was placed in flasks and added formaldehyde for preservation and posterior counting (Ueno and Gonçalves, 1998).

2.9. Statistics:

Significant differences between groups were assessed by one-way analysis of variance using the statistical software, Minitab 11.21 (Minitab Inc., USA). Results of FEC or worm burden were analyzed under logarithmic transformation ($\text{Log}(x + 1)$) and group means were compared using the Tukey test at $P < 0.05$.

3-Results

There was no significant difference in FEC, TWC, and total male and total female counts between control and treated group means (Table 8). However, control group had higher FEC and TWC in comparison to treated group 0.2 mL/kg (Fig. 6 and Fig. 7). This fact reflects in significant higher plasmatic protein and PCV in group 0.2 mL/kg in comparison to control group at 20 days after treatment (Table 9). mL

The elimination of essential oil in feces and its activity against *H. contortus* eggs and larvae were evaluated by EHA and LDA. It was observed low activity 1 day after treatment with 0.4 mL/kg of *C. schoenanthus* (Table 10).

There was no significant difference between group means for hepatic or kidney profiles after treatment with essential oil (Table 11 and Table 12).

Gas chromatography analysis indicated geraniol (59.42%), geranial (13.49%) and neral (8.98%) as the major constituents of the oil (Table 13).

4-Discussion

The reason for *C. schoenanthus* essential oil has been chosen to be evaluated *in vivo* against ovine nematode is because previously, *in vitro* tests it was detected anthelmintic activity of the oil against ovine trichostrongylids (Katiki et al., unpublished results). In the present experiment, 0.2 or 0.4 mL/kg of essential oil or water did not cause significant reduction in FEC or TWC as expected, however lambs from group 0.2 mL/kg presented higher reduction in FEC and TWC than 0.4 mL/kg or water groups. Total seric protein and PCV were also significantly higher in 0.2 mL/kg group. All lambs from all groups began the experiment with high FEC, which remained high during all experiment. Possibly, as a consequence of the parasite infection, the absence of protein supply in the diet and low age of the animals, the decrease in PCV and TSP values were observed.

C. schoenanthus essential oil is a complex mixture of terpenes. In this study the oil is composed by 19 different substances and geraniol, geranial and neral are predominant. Some studies have reported activity of geraniol against the nematode *Caenorhabditis elegans* (Kumaran et al., 2003). Studies with Valencia orange oil, with 95% terpene limonene, was very efficient in reduce FEC. A single dose of 600 mg/kg reduce FEC in 97.4% compared to control (Squires et al., 2010). These authors found better results using single doses 1 mL/kg (in which 60% of formulation is essential oil) than daily treatments of 1 mL/kg for three days. Their dose is quite similar to ours. FEC reduction of 76.57% also occurred in goats 15 days after treatment with *Eucalyptus staigeriana* essential oil (0.5mL/kg), which major constituent is limonene (28%) (Macedo et al., 2010). In contrast, *C. schoenanthus* used in the present study does not have limonene.

One reason to be worried about using natural products in treatment of illness is problems related to intoxication. Depending on the lethal dose (LD₅₀), signs of intoxication can be observed in low doses. For instance, Ketzis et al (2002) used 0.1, 0.2 and 0.4 mL/kg of *Chenopodium ambrosioides* essential oil without anthelmintic effect but with high toxicity due to ascaridol, its major constituent. No information about the LD₅₀ of *C. schoenanthus* oil was found in literature. In our previous work, rats could stand doses under 5 mL/kg without deaths. In lambs of the present experiment, this oil

did not cause any significant alteration in hepatic (albumin, AST, AP, GGT) or renal (urea, creatinine) profiles. However, the increase of *C. schoenanthus* dose, in order to obtain improvement of anthelmintic activity, could cause intoxication, because animals from group 0.4 mL/kg presented visible discomfort with signs of apathy and drowsiness for at least 4 hours post-treatment, contradicting the statement that some essential oils do not need to be approved by regulatory agencies prior to use in food for humans and don't have limit for use (FDA, 2006). No abnormal behavior was observed in group treated with 0.2 mL/kg.

According to our results, group 0.2 mL/kg had mean values of AST (128.0 ± 174.2) and GGT (50.50 ± 20.37) at the 20th day. Although those values are higher than those described by Meira Jr et al. (2009) as normal for Santa Inês lambs under 6 months of age (AST (U/L) of 49.9 ± 12.86 and GGT (U/L) of 33.43 ± 11.76), it is usual to observe considerable differences between values reported in different studies. For example, Pugh (2005) gives the AST reference of 60-280 U/L, Meyer and Harvey (2004), 98-278 U/L for AST and Kaneko (1997) gives the GGT reference as 20-52 (U/L) for adult ovine. Therefore, we conclude that animals were clinically healthy because the mean values remained within the reference interval for the species and no differences were found in comparison to control group.

Interestingly lambs from all groups presented high serum urea values before treatment, but not higher than the reference interval, and had a marked reduction after one day post treatments returning gradually to normality after 5 days. The urea is synthesized on liver resulting from protein catabolism that is changed into ammonia and eliminated through kidney. This fact occurred as a response for their fast pre and post treatment and a hypothesis of a change in kidney activity was declined because no abnormality was found in creatinine. Serum creatinine is a non proteic nitrogen substance resulting from muscular metabolism and it is not influenced by protein catabolism or diet (Kaneko, 1997). Although no difference was observed in three groups in terms of seric urea, it is known that the essential oils had an intense bactericide effect (Friedman et al., 2002) and can infer on ruminal microbes survive, decreasing the ammonia production and consequently seric urea.

Lambs from Santa Inês breed, kept without any protein supplementation, were able to stand infection with *H. contortus* with FEC over to 5.000 and low PCV for a

period of 20 days without presenting clinical signs like submandibular edema, anorexia, apathy or death. This fact can be explained in terms of resilience. Santa Inês is a Brazilian hair breed more resistant to gastrointestinal nematodes in comparison to wool breeds such as Suffolk and Ile de France (Amarante et al., 2004, Rocha et al., 2004, Bricarello et al., 2005).

Every product that had anthelmintic effect *in vitro* should be tested *in vivo* because the compound not necessarily will present the same results. Active substances may be detoxified during liver passage after oral administration (Macedo et al., 2010). This may be the case of the *C. schoenanthus* oil that had high activity in *in vitro* test (Katiki et al., unpublished results), while the *in vivo* results were much more modest. Oil administered to lambs at the highest dose (0.4 mL/kg) was found partially active in feces. However, after 5 days, no activity was found by essential oils against eggs or larvae.

5- Conclusion

Although there was no statistically significant reduction in FEC or total worm count after treatments with both *C. schoenanthus* essential oil, the dose of 0.2mL/kg resulted in lower FEC and TWC when compared to the higher dose and to the control suggesting a positive physiological effect of the essential oil without toxicity to animals at these doses. We observed that the essential oil at dose of 0.4 mL/kg was eliminated into feces and inhibited partially the development of larvae which couldn't provide an additional benefit in curbing the level of re-infection of animals grazing in contaminated pasture.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest. Brand names were used solely for the convenience of the reader and not imply endorsement over similar products.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Simone Fernandes, Barbara Rubert and Camila Olivo de Carvalho for providing technical support.

References

- Almeida, F.A., Garcia, K.C.O.D., Togerson, P.R., Amarante, A.F.T., 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitology Int.* 59, 622-625.
- Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Rocha, R.A., Gennari, S.M., 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology* 120, 91-106.
- Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Cabral Filho, S.L., Huntley, J.F., Houdjik, J.G.M., Abdalla, A.L., Gennari, S.M., 2005. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Vet. Parasitol.* 134, 99-109.
- FDA (U.S. Food and Drug Administration) 2006. Food Additive Status List. Downloaded from <http://www.cfsan.fda.gov/%7Edms/opa-appa.html>, Oct 16, 2006.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteric*. *J.Food Prot.*, 2002, 65, 1545-60.
- Hubert, J. Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record* 130, 442-446.
- Jackson, F., Hoste, H., 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: *In vitro* screening of plant resources for extra- nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Springer Netherlands. 25-45
- Kaneko, J.J., 1997. *Clinical Biochemistry of domestic animal*. 5 ed. New York, Academic Press, 932 p.
- Ketoh, G.K., Glitho, A.I., Huignard, J., 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (coleopteran: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus*

- basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. J. Econ. Entomol., 95, 174-182.
- Ketzis, J.K., Taylor, A., Bowman, D.D., Brown, D.L., Warnick L.D., Erb, H.N., 2002. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. Small Rum. Res., 44, 193-200.
- Koba, K., Poutouli, P.W., Nenonene, Y.A., Songai, M.S., 2007. Chemical composition and anti-termite activity of three tropical essential oils against termite species *trinervitermes geminatus*. J. Sci. Technol., 5,39-46.
- Kumaran, A.M., D'Souza, P., Agarwal, A., Bokkolla, R.M., Balasubranianiam, M., 2003. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. Phytother. Res., 17, 957-957.
- 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., Tomé, A.R., Nascimento, N.R.F., 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol., doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.004.
- Meira Jr, E.B.S., Rizzo, H., Benesi,F.J., Gregory, L., 2009. Influência dos fatores sexuais e etários sobre a proteína sérica total, fração albumina e atividade sérica de aspartato-aminotransferase e gama-glutamilttransferase de ovinos da raça Santa Inês. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci, 46, 448-454.
- Meyer, D.J; Harvey, J.W. , 2004. Veterinary Laboratory medicine Interpretations and diagnosis - 3ed. Ed. Saunders. 351p.
- Pugh, D.G., 2005. Clinica de ovinos e caprinos. 1ed. Ed. Roca, 513p.
- Rowe, A., McMaster, K., Emery, D., Sangster, N., 2008. *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. Vet. Parasitol. 153, 285-293.
- Rocha, R.A., Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., 2004. Influence of reproduction status on susceptibility of Santa Ines and Ile de France ewes to nematode parasitism. Small Rumin. Res. 55, 65-75.

Squires J.M., Foster, J.G., Lindsay, D.S., Caudell, D.L., Zajac, A.M., 2010. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and sheep. *Vet. Parasitol.*, doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.017.

Ueno, H.; Gonçalves, P.C. , 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.4th ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency.

Table 8. Mean (standard error) of log-transformed values of fecal egg count(log FEC) at before, 1 day, 5 days, 10 days, 15 days and 20 days after treatment and log-transformed total worm count (TWC) from lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and treated with *Cymbopogon schoenanthus* essential oil at doses of 0.2 mL/kg or 0.4 mL/kg

Group	FEC before	FEC1 day	FEC5 days	FEC10days	FEC15days	FEC20days	TWC
0.2 mL/kg	3.80(0.18)	4.07(0.28)	3.81(0.89)	3.79(0.88)	3.81(0.66)	3.73(0.86)	2.79 (0.74)
0.4 mL/kg	3.76(0.23)	4.35(0.20)	4.05(0.34)	4.10(0.21)	3.93(0.41)	3.87(0.23)	2.99 (0.35)
Control	3.73(0.28)	4.26(0.22)	4.09(0.15)	4.32(0.20)	4.27(0.22)	4.15(0.23)	3.15 (0.15)

There was no significant difference among group means by Tukey test at 5%.

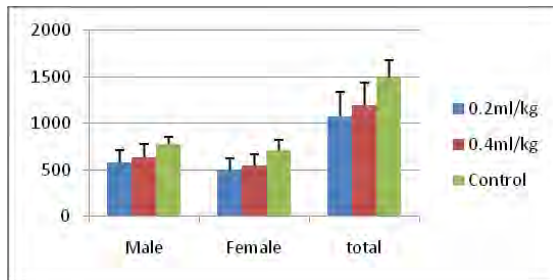


Figure 6. Mean (standard error bar) of *Haemonchus contortus* adults parasites counting (male and female) and total count in artificially infected lambs after treatment with *Cymbopogon schoenanthus* essential oil during three consecutive days at a dose of 0.2 or 0.4 mL/kg.

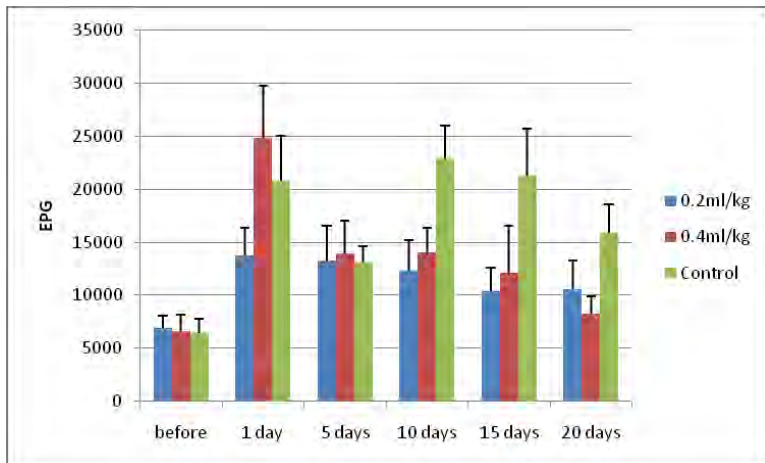


Figure 7: Mean (standard error bar) of fecal egg count (FEC) evaluated before, at 1, 5, 10, 15 and 20 days in lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* after treatment with *Cymbopogon schoenanthus* essential oil at doses of 0.2 mL/kg and 0.4 mL/kg.

Table 9. Mean (standard error) of packed cell volume (PCV) and total seric protein (TSP) evaluated before, at 5 days, 10 days and 20 days in lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and treated with *Cymbopogon schoenanthus* essential oil at doses of 0.2 mL/kg and 0.4 mL/kg.

PCV (%)	before	5 days	10 days	20 days
0.2mL/kg	26.50 (3.61)a	21.83 (3.06)a	23.16 (4.11)a	24.50 (2.74)a
0.4mL/kg	22.33 (4.59)a	21.50 (3.27)a	21.16 (2.40)a	21.17 (3.66)ab
Control	24.42 (6.42)a	21.14 (4.41)a	20.71 (3.40)a	19.14 (2.79)b
TSP (g/dL)				
0.2mL/kg	6.37 (0.27)a	6.04 (0.38)a	6.52 (0.77)a	6.97 (0.72)a
0.4mL/kg	5.79 (0.27)b	5.86 (0.44)a	6.15 (0.53)a	6.22 (0.37)ab
Control	5.70 (0.41)b	5.65 (0.42)a	5.79 (0.49)a	5.81 (0.42)b

For each variable, values with different letters in the columns are significantly different by Tukey test at 5%.

Table 10. Mean (standard error) percentage of *in vitro* test egg hatch assay (EHA) and larval development assay (LDA) of *Haemonchus contortus* in lambs at 1 day, 5 days, 10 days and 15 days after treatment with 0.2mL/kg, 0.4mL/kg *Cymbopogon schoenanthus* essential oil.

EHA (%)	1 day	5 days	10 days	15 days
0.2mL/kg	98(0)	95(2.09)	97.17(3.13)	98.66(0.81)
0.4mL/kg	94.66(1.63)a	98.66(0.81)a	99.5(0.54)	98.16(1.16)
Control	97.33(1.50)	95.33(1.03)	99.16(0.75)	97.83(1.60)
LDA (%)				
0.2mL/kg	93.33(3.44)	83(2.76)	84.33(3.61)	96.83(1.47)
0.4mL/kg	73.17(6.40)a	84.83(4.49)	87.83(3.19)	96.50(1.22)
Control	86.17(5.04)	88(5.66)	87.17(3.82)	97.33(0.81)

For each *in vitro* test, values with different letters in the columns are significantly different by Tukey test at 5%.

Table 11. Mean (standard error) of serum urea and creatinine evaluated before, at 5 days, 10 days and 20 days in lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and treated with *Cymbopogon schoenanthus* essential oil at doses of 0.2mL/kg and 0.4mL/kg.

Urea (mg/dL)	before	5 days	10 days	20 days
0.2mL/kg	42(4.38)	19.17(7.91)	21.17(0.06)	30.50(11.20)
0.4mL/kg	38.83(4.58)	18.5(4.04)	22.17(0.04)	30.17(8.08)
Control	40.57(3.05)	22.14(4.67)	27.71(0.03)	30.57(8.72)
Creatinine (mg/dL)				
0.2mL/kg	0.89(0.10)	0.92(0.10)	1.09(0.06)	0.95(0.10)
0.4mL/kg	0.79(0.09)	0.84(0.08)	0.96(0.04)	0.85(0.11)
Controle	0.84(0.07)	0.92(0.15)	1(0.03)	0.92(0.11)

There was no significant difference among group means by Tukey test at 5%.

Table 12. Mean (standard error) of albumine, liver biochemical enzymes alkaline phosphatase (AP), aspartate amino transferase (AST) and gama glutamyl transferase (GGT) evaluated before, at 5, 10 and 20 days in lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and treated with *Cymbopogon schoenanthus* essential oil at doses of 0.2 mL/kg and 0.4 mL/kg.

Albumine (g/dL)	before	5 days	10 days	20 days
0.2mL/kg	2.86(0.24)	2.75(0.15)	2.81(0.34)	2.96(0.21)
0.4mL/kg	2.65(0.17)	2.61(0.27)	2.75(0.35)	2.81(0.26)
Control	2.77(0.25)	2.81(0.21)	2.85(0.33)	2.70(0.23)
AP (UI/L)				
0.2mL/kg	104.5(46.5)	76.67(17.06)	112(74)	76.8(39.4)
0.4mL/kg	158.7(88.3)	98.8(63.2)	83(61.7)	92.8(47.7)
Control	116.3(27)	107(36.7)	93.6(29.3)	84.6(29)
AST (UI/L)				
0.2mL/kg	57(5.06)	62.17(18.58)	72.33(35.8)	128(174.2)
0.4mL/kg	50(5.93)	58(6.51)	65.67(10.89)	57.5(8.22)
Control	52.42(7.5)	57.14(15.1)	59.57(14.12)	60(11.47)
GGT (UI/L)				
0.2mL/kg	44.33(3.78)	37.17(5.71)	38.5(9.63)	50.50(20.37)
0.4mL/kg	51.33(14.14)	42.67(11.66)	40(11.45)	45(8.25)
Control	49.29(5.44)	41.71(6.10)	42.86(7.17)	43.86(6.52)

There was no significant difference among group means by Tukey test at 5%.

Table13. Retention index (RI), retention time (RT), components and their relative percentage in *Cymbopogon schoenanthus* essential oil according to Wiley 275 spectra library.

RI	RT	Component	Relative percentage
858	4.68	(E)-2-Hexenal	0.74
988	7.67	6-Methyl-5-hepten-2-one	0.40
1100	11.14	Linalool	0.99
1156	12.88	Citronellal	0.84
1206	14.61	N-Decanal	0.42
1232	15.39	Citronellol	3.18
1245	15.8	Neral	8.98
1259	16.28	Geraniol	59.42
1274	16.77	Geranial	13.49
1303	17.78	Geranyl formate	0.17
1356	19.41	Citronellyl acetate	0.33
1360	19.54	Eugenol	0.34
1385	20.37	Geranyl acetate	4.80
1425	21.61	(E) Caryophyllene	2.19
1460	22.65	α -Humulene	0.28
1504	24.01	α -Muurolene	0.13
1528	24.69	γ -cadinene	0.48
1554	25.43	Cadina 1,4 diene	0.25
1589	26.46	Caryophyllene oxide	0.43
		Total analyzed	94.09

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO GERAL

Parasitas gastrointestinais são responsáveis por perdas econômicas significantes em sistemas de produção de ovinos. O rápido desenvolvimento de resistência à todas as classes de anti-helmínticos comerciais torna necessária o desenvolvimento de métodos alternativos de profilaxia destes parasitas. O óleo essencial das plantas *Mentha piperita*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus* foram escolhidas para serem avaliadas em testes *in vitro*. Os testes realizados *in vitro* têm a vantagem de serem rápidos, simples e baratos dando o resultado inicial da atividade anti-helmíntica dos compostos. Os óleos foram previamente escolhidos devido a relatos que os indicam para fins inseticidas (KOBA et al., 2007; KETOH et al., 2002), repelentes (ANSARI et al., 2000) e nematicidas (PANDEY et al., 2000; KUMARAN et al., 2003).

Nos testes *in vitro* os nematóides foram expostos a diversas concentrações dos referidos óleos essenciais para determinação da concentração capaz de inibir 50% da atividade avaliada (CL₅₀). Nos testes *in vitro* avaliou-se a eclodibilidade, o desenvolvimento larval, a alimentação larval e o desembainhamento larval. Em todos os testes, o óleo essencial de *C. schoenanthus* demonstrou melhor atividade quando comparado ao óleo de *M. piperita* e *C. martinii*.

Embora o óleo essencial de *C. schoenanthus* tenha determinado melhor atividade anti-helmíntica em testes *in vitro*, os três óleos foram avaliados sobre ratos Wistar infectados artificialmente com parasita intestinal *Strongyloides venezuelensis*. A justificativa para a avaliação anti-helmíntica dos três óleos *in vivo* foi devido aos valores de CL₅₀ encontrados em testes *in vitro* terem sido similares. Outro fator que também motivou a avaliação dos três óleos em ratos foi o fato de que muitas divergências podem ocorrer em resultados de teste *in vitro* e testes *in vivo* devido à biodisponibilidade dos compostos ativos e a biotransformação metabólica que ocorre no organismo vivo (HOUZANGBE-ADOTE et al., 2005; BIZIMINYERA et al., 2006; ASSIS et al., 2003).



FIGURA 8: Infecção artificial subcutânea de *Strongyloides venezuelensis* em ratos Wistar na prega da virilha.

Testes *in vivo* utilizando roedores infectados artificialmente com nematóides são métodos rápidos e adequados para selecionar extratos de plantas com potencial anti-helmíntico (SQUIRES et al., 2010). Este é o caso de testes em que se utilizam ratos infectados artificialmente com *S. venezuelensis*, cujo ciclo de vida e patogenicidade estão bem esclarecidos. Além disso, ensaios com ratos têm como vantagem a utilização de menores quantidades de drogas ou extratos de plantas quando comparados com as espécies alvo e também por proporcionarem condições ambientais controladas (MARRA et al., 2010).

Os óleos essenciais de *C. schoenanthus*, *M. piperita* e *C. martinii* foram administrados nas dosagens de 1,5 mL/kg e 2,3 mL/kg a ratos artificialmente infectados com *S. venezuelensis* durante três dias. Não houve redução significativa da contagem de ovos nas fezes e também na contagem parasitária do intestino quando comparadas ao grupo controle. Animais que receberam anti-helmíntico albendazol tiveram redução de

100% dos parasitas, fato que demonstra que este modelo é adequado para se verificar atividade anti-helmíntica de produtos. SQUIRES et al. (2010) trataram gerbils (*Meriones umguiculatus*) infectados artificialmente com *Haemonchus contortus* com uma emulsão de óleo essencial de laranja. Este produto reduziu 87,8% dos parasitas, indicando que a procura por óleos essenciais efetivos possuem potencial para uso futuro no controle de parasitas gastrointestinais.

O óleo essencial de *C. schoenanthus* foi escolhido para ser avaliado em cordeiros artificialmente infectados por *H. contortus* devido aos resultados dos testes *in vitro* indicarem uma melhor atividade anti-helmíntica e também devido aos resultados significativamente positivo de um teste piloto realizado com cordeiros naturalmente infectados.

No presente estudo, os cordeiros foram artificialmente infectados com uma cepa de *H. contortus* multi-resistente aos anti-helmínticos (ALMEIDA et al., 2010) e o óleo essencial foi administrado na dosagem de 0,2 ou 0,4 mL/kg a cada 24 horas, por 3 dias. Não houve redução significativa da contagem de ovos nas fezes ou da contagem parasitária quando comparados ao grupo controle, no entanto, cordeiros que receberam 0,2 mL/kg apresentaram maior redução da contagem de ovos nas fezes e contagem parasitária do que cordeiros do grupo controle e dos que receberam 0,4 mL/kg. Essa diferença proporcionou maior valor de proteína sérica e hematócrito sugerindo benefícios fisiológicos com a menor dose a qual não apresentou toxicidade.



Fonte: arquivo pessoal

Formatado: Fonte: 8 pt

FIGURA 9: *Haemonchus contortus* adultos machos com espícula (seta para cima) e fêmea com útero em formato espiralado (seta para baixo) registrados por meio de lupa durante a contagem total de parasitas presentes no abomaso.

O óleo essencial de *C. schoenanthus* administrado na dosagem de 0,4 mL/kg em cordeiros infectados com *H. contortus* foi em parte eliminado nas fezes e inibiu *in vitro* parcialmente o desenvolvimento das larvas.

Este trabalho também introduz uma metodologia de teste *in vitro* para avaliação de atividade anti-helmíntica de extratos vegetais utilizando-se o nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans* que difere das metodologias tradicionais descritas na literatura (STIERNAGLE, 2006) no que se refere ao tipo de meio de cultura, ao método de seleção de nematóides adultos e metodologia de teste. A vantagem do uso do meio líquido ao invés de meio em Agar-gel inoculado com *Escherichia coli* é o tempo economizado na preparação dos testes, a redução na contaminação e a eliminação do uso de antibióticos durante os testes e a prevenção do metabolismo dos compostos fitoquímicos do extrato pelas bactérias. Além disso, o tempo de preparação e obtenção

dos resultados é de 48 horas ao invés de 72-96 horas quando se utilizaas placas de Agar-gel.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os sistemas de produção de pequenos ruminantes apresentam um problema real que é o parasitismo gastrintestinal e a resistência dos parasitas aos anti-helmínticos.

Este trabalho permitiu o conhecimento sobre técnicas *in vitro* e *in vivo* para detecção de atividade anti-helmíntica dos medicamentos disponíveis no mercado, bem como, a avaliação de resistência dos parasitas sobre estes medicamentos. Este mesmo procedimento que avalia os compostos farmacologicamente ativos, também pode ser utilizado para se avaliar o potencial anti-helmíntico de extratos vegetais.

O estudo da atividade anti-helmíntica de extratos vegetais e compostos fitoquímicos é fascinante, pois muitos fatores contribuem para a composição química da planta, tal como espécie, local de cultivo, época de colheita, parte da planta, luminosidade a que a planta é exposta, ataque de pragas sobre a planta, são fatores que podem interferir na qualidade de um extrato vegetal. Todos estes fatores levam ao profissional que pesquisa estes bioativos a fazer diversas parcerias, com profissionais de diversas áreas, para um melhor aproveitamento do potencial da planta. Em nossos trabalhos, os profissionais fitoquímicos foram requisitados para o melhor entendimento dos constituintes das plantas e para se fazer uma relação sobre atividade anti-helmíntica e os principais componentes sobre o aspecto da análise fitoquímica.

Os testes *in vitro* são considerados essenciais para se fazer um pré-diagnóstico sobre a atividade anti-helmíntica da planta. Testes usando-se tricostrongilídeos e testes usando-se o nematóide de solo *C.elegans* foram utilizados neste trabalho. Todos os tipos de teste são acurados para a avaliação em questão e o seu uso está relacionado com as facilidades de cada laboratório e com a qualificação dos profissionais que farão as avaliações.

Os testes *in vivo* são mais específicos, porém mais caros e são essenciais para o diagnóstico final sobre a atividade anti-helmíntica do extrato vegetal em questão.

CONCLUSÕES GERAIS

- O óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus* apresenta melhor atividade anti-helmíntica *in vitro* quando comparado aos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* e *Mentha piperita*.

- Os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita*, nas dosagens de 1,5 mL/kg ou 2,3 mL/kg, administrados via oral a cada 24 horas por três dias consecutivos, não tem atividade anti-helmíntica sobre ratos artificialmente infectados com *Strongyloides venezuelensis*.

-Em cordeiros infectados com *Haemonchus contortus*, o óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus*, na dosagem de 0,2 mL/kg, administrado via oral a cada 24 horas por três dias consecutivos, proporciona redução moderada da contagem de ovos nas fezes e na carga parasitária, enquanto que na dosagem de 0,4 mL/kg foi ineficaz.

-O óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus* não é tóxico para cordeiros nas dosagens de 0,2 e 0,4 mL/kg.

-O óleo essencial de *C. schoenanthus*, administrado na dosagem de 0,4 mL/kg para cordeiros infectados com *H. contortus*, é eliminado nas fezes onde prejudicou parcialmente o desenvolvimento das larvas do referido parasita.

- O teste *in vitro* utilizando-se o nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans* pode ser incorporado na rotina de testes *in vitro* destinados a avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos ou óleos vegetais servindo como referência na escolha de produtos naturais e extratos vegetais com potencial antihelmíntico.

BIBLIOGRAFIA

ADEMOLA, I.O.; FAGBENI, B.O.; IDOWU, S.O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, v. 122, p.151-164, 2004.

ÁLVAREZ-SANCHEZ, M.A.; PÉREZ GARCIA, J; BARTLEY, D.; JACKSON, F; ROJO-VAZQUEZ, F.A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology*, v. 110, p. 56-61, 2005.

AKDOGAN, M., KILINC, I., ONCU, M., KARAZ, E., DELIBAS, N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. *Human Experimental Toxicology*; v. 22(4), p. 213-9, 2003.

AL-GHAMDI, S.S.; AL-GHAMDI, A.A.; SHAMMAH, A.A. Inhibition of calcium oxalate nephrotoxicity with *Cymbopogon schoenanthus* . *Drug Metabolic Letters*, v 1 (4), p. 241-4, 2007.

ALMEIDA, F.A., GARCIA, K.C.O.D., TOGERSON, P.R., AMARANTE, A.F.T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitology International* v. 59, p. 622-625, 2010.

ANSARI, M. A.; RAZDAN, R.K. Relative efficacy of various oils in repelling mosquitoes. *Indian Journal of Malariology* v. 32(3),p. 104-111,1995.

ANSARI, M.A., VASUDEVAN, P., TANDON, M., RAZDAN, R.K. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresource Technology*, v. 71,p. 267-271, 2000.

ANVISA, BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução 104/99, de 26/04/1999. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 14/05/99.

AMARANTE, A.F.T. Eliminação de ovos de nematódeos gastrointestinais por ovelhas de quatro raças durante diferentes fases reprodutivas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, n.1, p.161-172, 1993.

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

ASSIS, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S.; COSTA, C.T.C.; SOUZA, J.A.L. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. Extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p43-49, 2003.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* v. 99, p.205-219, 2001.

BAHUAUD, D.; MONTELLANO, C.M.O.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*, v.132, 545-554, 2006.

BATATINHA, M.J.M.; BOTURA, M.B.; SANTOS, M.M.; ALMEIDA, M.G.A.R.; ALMEIDA, M.A.O. Efeitos do suco de alho em caprinos infectados com nematódeos gastrointestinais: aspectos clínicos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* v.27, n.2, p18-21, 2005.

BIZIMENYERA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v. 142, p.336-343, 2006.

BRENNER, S.. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* v.77, p.71-94, 1974.

BRICARELLO, P.A., AMARANTE, A.F.T., ROCHA, R.A., CABRAL FILHO, S.L., HUNTLEY, J.F., HOUDJIK, J.G.M., ABDALLA, A.L., GENNARI, S.M.. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Veterinary Parasitology*. 134, 99-109, 2005.

BRUNET, S., HOSTE, H.. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7481-7487, 2006.

BULL, K.; COOK, A.; HOPPER, N.A.; HARDER, A.; HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R.J. Effect of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 627-636, 2007.

BURKE, J.M.; WELLS, A.; CASEY, P.; MILLER, J.E. Garlic and papaya lack control over gastrointestinal nematodes in goats and lambs. *Veterinary Parasitology*, v. 159, p.171-174, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v.94, p. 223-253, 2004.

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

CAMURÇA- VASCONCELOS, A.L.F., BEVILAQUA, C.M.L., MORAIS, S.M., MACIEL, M.V., COSTA, C.T.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*, 148, 288-294, 2007.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, supl. 1, p. 156-160, 2004.

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG,J; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* v. 39, n.5, p.247-253, 2002.

CHENG, S.-S., LIU, J.-Y. ; HSUI, Y.R.; CHANG, S.T. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*. v. 97, p.306-312, 2006.

COLLINS, C.H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. *Química Nova*, v.29, n.4, p.889-890, 2006.

COSTA, C.T.C.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; SOUZA, M.M.C.; LEITE, F.K.A. Ovicidal effect of *Mangifera indica* seeds extracts on *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 11, n.2, p.57-60, 2002.

COSTA, R.L.D., BUENO, M.S.; VERÍSSIMO, C.J.; CUNHA, E.A.; SANTOS, L.E.; OLIVEIRA, S.M.; SPOSITO FILHA, E.; OTSUK, I.P. Performance and nematode infection of ewe lambs on intensive rotational grazing th two different cultivars of *Panicum maximum*. *Trop. Anim. Health Prod.* V. 39, p. 255-263, 2007.

CULLY, D.F.; VASSILATIS, D.K.; LIU, K.K.; PARESS, P.S., VAN de PLOEG, L.H., SHAEFFER, J.M.; ARENA, J.P.. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* v. 371, p. 707-711, 1994.

DEEPAK, M.; DIPANKAR, G.; PRASHANTH, D.; ASHA, M.K.; AMIT, A.; VENKATARAMAN, B.V. Tribulosin and B-sitosterol-DGlucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine* v. 9, p. 753-756, 2002.

DIEHL, M.S. ATINDEHOU, K.K.; TÉRÉ, H.; BETSCHART, B. Prospect for anthelmintic plnts in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, p.277-284, 2004.

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

DUARTE, M.C.T.; LEME DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s v. 8, p.139-143, 2006.

ECHEVARRIA, F., BORBA, M. F., PINHEIRO, A. C., WALLER, P. J. & HANSEN, J. W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.*, 62: 199-206.

EGUALE, T.; TILAHUN, G; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. *Haemonchus contortus*: *in Vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *hedera helix*. *Experimental Parasitology* v. 116, p.340-345, 2007.

FLEMING, J.T.; SQUIRE, M.D.; BARNES, T.M.; TORNOE, C.; MATSUDA, K.; AHNN, J.; FIRE, A.; SULSTON, J.E.; BARNARD, E.A.; SATTELLE, D.B.; LEWIS, J.A. *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes lev-1, unc-29 and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Journal of Neuroscience*, v.17, p. 5843-5857.

Formatado: Não Realce

FASIUDDIN A.; CAMPBELL, W.C. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) is much more sensitive than *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) to the ovicidal action of thiabendazole. *Journal of Parasitology*, v. 86(3), p.628-630, 2000.

FERNANDES, L.H.; SENO, M.C.Z.; AMARANTE, A.F.T.; SOUZA, H.; BELUZZO, C.E.C. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n.6, p.733-740, 2004.

FONSECA-SALAMANCA, F; MARTÍNEZ-GRUEIRO, M.M. Nematocidal activity of nitazoxanide in laboratory models. *Parasitology Research* v. 91, p. 321-324, 2003.

GARG, S.C.; SEEMA, N. Studies on the essential oil from the flowers of *Eupatorium triplinerve*. *Indian Perfumery* v.37, p.318-323, 1993.

GEARY, T.G.; THOMPSON, D.P.; KLEIN, R.D. Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 105-112, 1999a.

GEARY, T.G.; SANGSTER, N.C.; THOMPSON, D.P. Frontiers in anthelmintic pharmacology. *Veterinary Parasitology*, v. 84, p. 275-295, 1999b.

GEARY, T.G.; THOMPSON, D.P. *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Veterinary Parasitology* v. 101, p.371-386, 2001.

GHAFOURIAN, T.; ZANDASRAR, P.; HAMISHEKAR H.; NOKHODCHI, A. The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: a QSAR study *Journal of Control Release*, v.99, p.113-25, 2004

GITHIORI, J.B.; HOGLUND, J.; WALLER, P.J.; BAKER, R.L. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine africana* and *Rapanea melanophloeos* against the

nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p.187-191, 2002.

GITHIORI, J.B.; HOGLUND, J.; WALLER, P.J.; BAKER, R.L. The efficacy of the plant *Albizia anthelmintica* against the nematode parasite *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Veterinary Parasitology*, v.116, p.23-34, 2003.

GITHIORI, J.B.; HOGLUND, J.; WALLER, P.J.; BAKER, R.L. Evaluation of anthelmintic properties of some plants used as livestock dewormers against *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Parasitology*, v. 129, p.245-253, 2004.

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

GORDON, Y.; JACKSON, E.; BARTLEY, D.J.; JACKSON, F. In vitro studies using bioassays to examine the effect of aqueous plant extracts on *Teladorsagia circumcincta*. Proceedings of the International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 21. Anais..., p.264, 2007.

HOEKSTRA, R.; VISSER, A., OTSEN, M., TIBBEN, J., LENSTRA, J.A., ROSS, M.H.. EST sequencing of parasitic nematode *Haemonchus contortus* suggests a shift in gene expression during transition to the parasitic stages. *Molecular Biochemistry Parasitology* v. 110, p. 53-68, 2000.

HOLDEN DYE, L.; WALKER, R.J., 2007 Anthelmintic drugs, In: WormBook ed. The *C.elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.143.1, <http://www.wormbook.org>.

Hogerdegen, P.; Hertzberg, H.; Heilmann, J.; Langhans, W.; Maurer, V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p.51-60, 2003.

Hoste, H.; Rulie, A.C.; Prevot, F.; Bergeaud, J.P.; Grisez, C.; De La Farge, F.; Jacquiet, P.; Dorchies, P. Differences in receptivity to

gastrointestinal infections with nematodes in dairy ewes: influence of age and the level of milk production. *Small Ruminant Research*, v.63, 150-155, 2005.

HOUZANGBE-ADOTE, M.S., PAOLINI, V., FOURASTE, I., MOUTAIROU, K., HOSTE, H., 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*, 78, 155-160.

HOUGHTON, P.J.; HOWES, M.J.; LEE, C.C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* testis in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology* v.110, p.391-400, 2007.

HUBERT, J., KERBOUEUF, D. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, 130, 442-446, 1992.

IDRIS, U.E.; ADAM, S.E.; TARTOU, G., The efficacy of *Artemisia herba-alba* against *Haemonchus contortus* infection in goats. *National Institute of Animal Health*, v. 22, p.138-143, 2006

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; JABBAR, A.; GHAYUR, M.N.; GILANI, A.H. *In vivo* anthelmintic activity of *Butea monosperma* against Trichostrongylid nematodes in sheep, *Fitoterapia*, v. 77, p.137-140, 2006.

JACKSON, F.; GORDON, Y. Screening plants for anthelmintic activity- a challenging situation. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária., CD-ROM- Curitiba, Paraná, 2008.

JACKSON, F., HOSTE, H. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: *In vitro* screening of plant resources for extra- nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Ed. Springer Netherlands., p. 25-45, 2010.

JABBAR, A.; IQBAL, Z. KHAN, M.N. *In vitro* anthelmintic activity of *Trachyspermum ammi* seeds. *Pharmacognosy Magazine*, v. 2, p. 126-129, 2006.

KALYANI, G.A.; AITHAL, K.S.; SRINIVASAN, K.K. *In vitro* anthelmintic activity of essential oil from the fruits of *Zantoxylum limonella*. *Fitoterapia*, v.60, p.160-162, 1989.

KAMINSKY,R; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER,R.; RUFNER,L.,; BOUVIER J.; WEBER,S.S.; WENGER,A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY,N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MASER, P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes *Nature*, Vol 452, 13 March 2008

KANEKO, J.J. Clinical Biochemistry of domestic animal. 5 ed. New York, Academic Press, 1997, p. 932.

KERMANSHAI, R.; McCARRY, B.E.; ROSENFELD, J.; SUMMERS, P.S.; WERENTILNYK, E.A.; SORGER, G.J. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*, v. 57, p.427-435, 2001.

KETOH, G.K.; KOUMAGLO, H.K.; GLITHO, I.A. Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) wasp *Kinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Stored Products Research* v. 41, p.363-371, 2005.

KETZIS, J.K.; TAYLOR, A.; BOWMAN, D.D.; BROWN, D.L.; WARNICK, L.D.; ERB, H.N. *Chenopodium abrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. *Small Ruminant Research*, v.44, p.193-200, 2002.

KHADRI, A.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; NEFFATI, M.; SMITI, S. ARAÚJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L.Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and CNMR. *Food Chemistry*, v. 19, p. 630-637, 2008.

KIM, S.S.; OH, O.J; Min, H.Y. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Science*; v.73, p. 337-48, 2003

KOBA, K., POUTOULI, P.W., NENONENE, Y.A., SONGAI, M.S. Chemical composition and anti-termite activity of three tropical essential oils against termite species *trinervitermes geminatus*. *Journal es Sciences et Technologies*, v. 5, p. 39-46, 2007.

KUMARAN, A.M.; D'SOUZA, P.; AGARWAL, A.; BOKKOLLA, R.M.; BALASUBRAMANIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martini*. *Phytotherapy research*, v. 17, p. 957, 2003.

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

MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, N.; VARO, H.; ARCHIMEDE, H. In vitro effects of *Curcubita moschata* seed extracts on *H. contortus*. *Veterinary Parasitology*, v.16, p. 99-105, 2009

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, A. F. T.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. V. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 57 - 61, 2010.

MARTINS, R.M. Estudio in vitro de la accion acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em la garrapata *Boophilus microplus* *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 8, n.2, p.71-78, 2006.

MATSINGOU, T.C.; KAPSOKEFALOU, M.; SAIFOGLOU, S. In vitro antioxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Science* v.65, p.1060-5, 2000.

MATTOS, M.J.T.; OLIVEIRA, C.M.B.; GOUVEA, A.S.; ANDRADE, C.B. Sensibilidade dos nematódeos gastrointestinais de caprinos ao ivermectin na região da grande Porto Alegre – RS. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p. 155-160, 2003.

McGAW, L.J.; VAN der MERWE, D.; ELOFF, J.N. In vitro anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. *The Veterinary Journal* v. 173, p. 366-372, 2007.

McGAW, L.J.; JAGER, A.K.; VAN STAGEN, J. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, v. 72, p. 247-263, 2000.

McKAY, D.L.; BLUMBERG, J.B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, v.20, p. 619-33, 2006.

MENDONÇA, L.R. Resistência de nematódeos gastrointestinais de caprinos a ivermectina, albendazole, levamisole e abamectina nos pólos Remanso, Coité e Jaguarari no semi-árido baiano. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 19, 2005, Anais... CD-ROM, Porto Alegre. Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2005.

MOLENTO, M.B.; TASCIA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. *Ciencia Rural*, v.34, p. 1139-1145, 2004.

MUCCIARELLI, M., SCANNERINI, S.; Berteia, C.; MAFFEI, M. *In vitro and in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization *New Phytologist*, v. 158, p. 579-591, 2003.

MUKAI, D.; MASUDA, N.; YOSHIOKA, Y.; SATO, M.; YAMASAKI, T. Potential anthelmintics: polyphenols from the tea plant *Camellia sinensis* L. are lethally toxic to *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Natural Medicine*, v. 62, p. 155-159, 2008.

NATURAL RESOURCE INDUSTRIES, Essential oil of *Cymbopogon martinii* Disponível em: <http://www.msinp.com>> Acesso em 4 abr. 2007.

NIERO, R. ; MAFRA, A.P.; LENZI, A.C.; CECHINEL-FILHO, V.; TISCHER, C.A.; MALHEIROS, A.; DE SOUZA, M.M.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F. A New Triterpene with Antinociceptive Activity from *Maytenus robusta*. *Natural Products Research*, v. 20, p. 1315-1320, 2006.

NORO, M.; WOSIACKI, S.R.; LEANDRO, M.A.; CECIM, M. Influência da suplementação com alho em pó na flora ruminal e no ganho e peso de cordeiros confinados *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n.5, p.647-649, 2003

OKPEKON, T.; YOULOU, S.; GLEYE, C.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F. LAURENS, A. HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *Journal of Ethnopharmacology* v. 90, p.91-97, 2004.

OLIVETTI, S.V. *Phytomédica*, 1, 1, 2005.

Onyeyili, P.A.; Nwosu, C.O.; Amin, J.D.; Jibike, J.I. Anthelmintic activity of crude aqueous extract of *Nauclea latifolia* stem bark against ovine nematodes *Fitoterapia* v. 72, p.12-21, 2001.

PANDEY., R., KALRA, A., TANDON, S., MEHROTRA, N., SINGH, H.N., KUMAR, S. Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. *Journal of phytopathology*, v. 148, p. 501-502, 2002.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; KOLE, C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios*. V. 86, p.237-246, 1996.

PEANA, A.T.; DE MONTIS, M.G.; NIEDDU, E.; SPANO M.T.; D'AQUILA, P.S ; PIPPIA, P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *European Journal of Pharmacology*, v. 485, p. 165-174, 2004.

PERAZZO F.F., CARVALHO, J.C.T.; CARVALHO, J.E.; REHDER, L.G. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Pharmacology Research*, v.48, p. 497-502, 2003.

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

PRASHAR , A.; HILL, P.; VENESS, R.G.; EVANS, C.S. Antimicrobial action of Palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, v. 63, p.569-575, 2003.

PUGH, D.G.. *Clinica de ovinos e caprinos*. 1ed. Ed. Roca, 2005. 513p.

TAYLOR, M.A.; HURT, K.R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods *Veterinary Parasitology* v. 103, n.3, p.183-94, 2002.

RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; AVO, A. V.S.; COUTINHO, G.C.; SOUZA, A.P. Resistência de parasitos gastrointestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Rural*, v.32, 473-477, 2002.

ROGERS, J.A.JR. Essential oils. In Kirk, R.E. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3 ed. New York: Wiley-Interscience. 16, 1981.

SATRIJA, F.; NANSEN, P.; MURTINI, S.; HE, S. Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Journal Ethnopharmacology* v. 48, p. 161-164, 1995.

SEZESNY- MORAIS, F.A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K.T.; CATTO, J.B.; HOMER, M.R.; PAIVA, F. Resistencia anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.3, 229-236, 2010.

SHAAAYA, E., RAVID, U., PASTER, N., JUVEN, B., ZISMAN, U., PISSAREV, V., 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *Journal Chemical Ecology*, v.17, p. 1573-1 561.

SHARMA, A.; SHARMA, M.K.; KUMAR, M. Protective Effect of *Mentha piperita* against Arsenic-Induced Toxicity in Liver of Swiss Albino Mice, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 100, p. 249-257, 2007

SILVA BRUM, L.F.; EMANUELL, T., SOUZA, D.O.; ELISABETSKY, E. Effects of linalool glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. *Neurochemical Research*, v. 26, p. 191-194, 2001.

SIMPKIN, K.G.; COLES, G.C.C. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, v. 31, p. 66-69, 1981.

SQUIRES, J.M.; FOSTER, J.G.; LINDSAY, D.S.; CAUDELL, D.L.; ZAJAC, A.M. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 95-99, 2010.

STEPEK, G. LOWE, A.E.; BUTTLE, D.J.; DUCE, I.R. BEHNKE, J.M. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode *P. muricula* in vitro and in vivo. *Parasitology*, v. 134, p.103-112, 2007.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

TAYLOR, M.A.; HURT, K.R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, v. 103, n.3, p.183-94, 2002.

TARIQ, K.A.; CHISHTI, M.Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A.S. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*, v.9, p. 83-8, 2009

TEPE B.; SOKMEN M.; SOKMEN A.; DAFERERA D.; POLISSIOU M. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium*(Labill) Manden & Scheng. *Journal of Food Engineering*, v. 69, p. 335–342, 2005.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MICZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; SILVA, M.C.P. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, 41-47, 2004.

VEIGA-JR, 2005

VIANA, J.G. 2008. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Ovinos*, Ano 4, N° 12, Porto Alegre, Março de 2008

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R. Resistencia anti-helmíntica em rebanhos caprinos no estado do ceará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.19, 99-103, 1999.

WOLSTENHOLME, A.J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20, 10, 469 – 476, 2004

VEIGA JR, V. F., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M., Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v.28, p.519-528, 2005.

VERÍSSIMO, C.J.; NIEEESEWCIURA, S.M.; BARBOSA, C.P.; CHEBAO, D.P.; COSTA, R.L.D.; CUCI, V.M.; MOLENTO, M.B.; NARDON, R.; OLIVEIRA, D.J.; PEREIRA, J.R.; RODRIGUES, C.F.; SILVA, G.S.; UENO, T.H. Resistência múltipla

de nematóides gastrintestinais parasitos de ovinos a anti-helmínticos no estado de São Paulo. . In Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, CD-Rom, Campo Grande, MS, 2010.

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

VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nemaóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnologia e Ciencia Agropecuária*, v.2, 49-56, 2008.

WATERMAN, C; SMITH, R.A.; PONTIGGIA, L.; DERMARDEROSIAN, A. Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 (2010), p.755-759

YANG, Y.C.; LEE, H.S.; LEE, S.H.; CLARK, J.M.; AHN, Y.J. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *International Journal of Parasitology*, v. 35, p.1595-1600, 2005.

ANEXOS:

1- Normas para submissão de artigo para revista Veterinary Parasitology**Guide for Authors**

An international scientific journal and the Official Organ of the American Association of Veterinary Parasitologists (AAVP), the European Veterinary Parasitology College (EVPC) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Código de campo alterado

Código de campo alterado

Código de campo alterado

Veterinary Parasitology**Types of contributions**

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Dr F.H.M. Borgsteede
Animal Sciences Group, Wageningen UR
Division Infectious Diseases
Laboratory of Parasitic Diseases
P.O. Box 65
8200 AB Lelystad
The Netherlands

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Código de campo alterado

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Código de campo alterado

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any

writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Código de campo alterado

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to *Veterinary Parasitology* who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Código de campo alterado

Código de campo alterado

Código de campo alterado

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Código de campo alterado

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.
Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:

⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Código de campo alterado

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: ⇒ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit ⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Código de campo alterado

Código de campo alterado

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the

reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*
Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.
 - c. *For books*
Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.
 - d. *For multi-author books*
Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830 +44(0)1865 843830 , fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed

Código de campo alterado

online via the Elsevier homepage ⇨ <http://www.elsevier.com/permissions>.

Código de campo alterado

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit ⇨ <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Código de campo alterado

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from

⇨ <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site:

Código de campo alterado

☞ <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#L#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Código de campo alterado

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600 (+353) 61 709600 , Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Código de campo alterado

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage

☞ <http://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Código de campo alterado

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Veterinary Parasitology has no page charges