



**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS CINAMALDEÍDO E CITRONELAL
EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE
RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA**

Valderlandia Oliveira dos Santos

**Sobral-CE
2021**

Valderlandia Oliveira dos Santos

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS CINAMALDEÍDO E CITRONELAL
EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE
RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.
Orientador: Prof. Dr. Jomar Patrício Monteiro.**

Sobral
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

SANTOS, VALDERLANDIA OLIVEIRA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS CINAMALDEÍDO E CITRONELAL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA [recurso eletrônico] / VALDERLANDIA OLIVEIRA SANTOS. -- Sobral, 2021.

1 CD-ROM: il. ; 4 ³/₄ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato pdf do trabalho acadêmico com 46 folhas.

Orientação: Prof. Ph.D. Jomar Patrício Monteiro.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

1. Cinamaldeído. 2. Citronelal. 3. *Haemonchus contortus*. 4. Resistência anti-helmíntica. 5. Controle. I. Título.

Valderlandia Oliveira dos Santos

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS CINAMALDEÍDO E CITRONELAL
EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE
RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA**

Esta Dissertação foi julgada adequada como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú

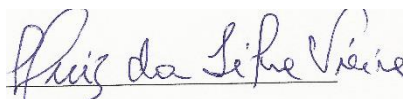
Embrapa Caprinos e Ovinos, 13 de setembro de 2021.

Profa. Dra. Cláudia Goulart de Abreu,
Coordenadora do Curso

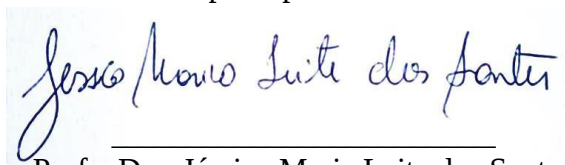
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jomar Patrício Monteiro
Orientador
Embrapa Caprinos e Ovinos



Dr. Luiz da Silva Vieira
Embrapa Caprinos e Ovinos



Profa. Dra. Jéssica Maria Leite dos Santos
Centro Universitário INTA – UNINTA

Este trabalho é dedicado à memória do meu pai,
Ademar Pereira Luz Santos, falecido em 22/07/2002 e a
minha mãe Valcilene Oliveira dos Santos. Exemplos de
vida, simplicidade e honestidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai amado de infinito amor e misericórdia, ele que permitiu que tudo isso acontecesse, que o sonho se concretizasse. OBRIGADA SENHOR!

A minha mãe Valcilene, pelo seu amor incondicional, por toda motivação, confiança e serenidade. Ao meu pai Ademar (*in memoriam*), que foi a base da minha educação com ensinamentos que estarão sempre presentes em minha vida. Não tenho palavras para descrever o meu AMOR e GRATIDÃO.

Aos meus irmãos Alexandre, Almira e Valcicleide pela amizade, compreensão, dedicação e carinho que me fortaleceram na busca de realizar esse sonho, por todo o apoio, amor, preocupação e acima de tudo, união sempre. Ao meu cunhado José Welder por sua dedicação. Aos meus sobrinhos Wanda, João Lucas, Wesley e Jean Guilherme Muito Obrigada!

Aos meus avós tios (as) e primos (as) pela disposição de ajudarem sempre que necessário, torcendo e acreditando em minha vitória, meu muito obrigada.

Ao meu namorado Alexandre Sampaio por toda dedicação, incentivo e paciência. Obrigada por todo apoio e por sempre estar ao meu lado.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú e Embrapa Caprinos e Ovinos pela oportunidade de estudo e formação profissional.

A Fundação Cearense de apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico –FUNCAP, pelo apoio financeiro concedido durante o Mestrado.

Ao meu orientador Jomar Patrício Monteiro pela cooperação, incentivo, sabedoria e pelo apoio científico que me concedeu, pela compreensão e dedicação. Meu muitíssimo OBRIGADA por ter acreditado em mim e por toda a confiança depositada.

Obrigada Jéssica Leite, Luiz Vieira e João Batista Cajazeiras pela participação em minha banca, pela prontidão em repassar um pouco do conhecimento de vocês e por todas as sugestões com o intuito de melhorar o trabalho desenvolvido.

Aos laboratoristas Helena (Dona Helena), Felipe (Felipão), Lidiane, Jamile e João Ricardo pela colaboração e apoio nas atividades em laboratório.

Aos meus colegas de pesquisa Fernando, Graciele, Igor, Janaelia, Rovane e Jessica, obrigada por todo companheirismo e amizade.

Aos estudantes de iniciação científica Laísa, Breno, Pedro, Nayane e aos demais estudantes que contribuíram para o desenvolvimento da minha pesquisa, muito obrigada.

A Cláudia Goulart e Joyce Sampaio da Coordenação da Pós-graduação em Zootecnia UVA, pela sua disponibilidade e atenção.

“Transportai um punhado de areia todos os dias e fareis
uma montanha”.
(Confúcio)

RESUMO

O parasitismo por nematoides gastrintestinais é um desafio na produção de pequenos ruminantes no mundo inteiro. Ocasiona grandes perdas produtivas e econômicas, principalmente devido à resistência anti-helmíntica. Os compostos naturais com atividade antiparasitária são potenciais alternativas para o controle desses parasitos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade biológica dos compostos orgânicos cinamaldeído e citronelal em isolados de *Haemonchus contortus* com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica. Para tal foram realizados testes de eclosão de ovos (TEO) e testes de desenvolvimento larvar (TDL) em minicoproculturas. Os testes foram realizados utilizando o isolado de *H. contortus* resistente a anti-helmínticos Kokstad (KOK), o isolado suscetível Inbred-Strain-Edinburgh (ISE) e o isolado suscetível Echevarria (ECH). Foram calculadas as concentrações efetivas para inibir 50% (CE₅₀) e 95% (CE₉₅) da eclodibilidade dos ovos e do desenvolvimento larvar. Os resultados das CE₅₀ dos TEOs para cinamaldeído apresentaram baixas variações entre os isolados KOK (133.6 µM), ISE (142.8 µM) e ECH (133.2 µM). O mesmo ocorreu com os resultados de CE₅₀ dos TEOs para o composto citronelal (KOK 294.5 µM; ISE 308.7 µM; e ECH 350.6 µM). Já a CE₉₅ para citronelal apresentaram maiores variações entre os isolados estudados (KOK 1,083.1 µM; ISE 3,317.3 µM e ECH 2,008.2 µM). Resultados de CE₅₀ no TDL em minicoproculturas para cinamaldeído (KOK 7,396 µM; ISE 7,232 µM e ECH 6,542 µM) e citronelal (KOK 28,422 µM; ISE 28,883 µM e ECH 31,816 µM) também mostraram pouca variação entre os isolados estudados. Contudo, os resultados de CE₉₅ (Cinamaldeído: KOK 21,594 µM; ISE 14,115 µM e ECH 13,031 µM e Citronelal: KOK 99,284 µM; ISE 53,319 µM e ECH 81,654 µM) apresentaram maior variação entre os isolados do que os resultados de CE₅₀. De maneira geral o citronelal e cinamaldeído mostraram eficácia sobre ovos e larvas de isolados de *H. contortus* com diferentes perfis de resistência a anti-helmínticos.

Palavras-Chave: Cinamaldeído, citronelal, nematoides gastrintestinais, controle.

ABSTRACT

Parasitism by gastrointestinal nematodes is a challenge in the production of small ruminants worldwide. It causes large productive and economic losses, mainly due to anthelmintic resistance. Natural compounds with antiparasitic activity are potential alternatives for controlling these parasites. Thus, the aim of this study was to evaluate the biological activity of organic compounds cinnamaldehyde and citronellal in *Haemonchus contortus* isolates with different levels of anthelmintic resistance. For this purpose, egg hatch tests (TEO) and larval development tests (TDL) were performed in minicoprocultures. Tests were performed using the anthelmintic-resistant *H. contortus* isolate Kokstad (KOK), the susceptible isolate Inbred-Strain-Edinburgh (ISE) and the susceptible isolate Echevarria (ECH). The effective concentrations to inhibit 50% (EC_{50}) and 95% (EC_{95}) of egg hatchability and larval development were calculated. The EC_{50} results of the TEOs for cinnamaldehyde showed low variations between the isolates KOK (133.6 μ M), ISE (142.8 μ M) and ECH (133.2 μ M). The same happened with the EC_{50} results of the TEOs for the citronellal compound (KOK 294.5 μ M; ISE 308.7 μ M; and ECH 350.6 μ M). The EC_{95} for citronellal showed greater variations among the isolates studied (KOK 1,083.1 μ M; ISE 3,317.3 μ M and ECH 2,008.2 μ M). EC_{50} results in TDL in minicoprocultures for cinnamaldehyde (KOK 7.396 μ M; ISE 7.232 μ M and ECH 6.542 μ M) and citronellal (KOK 28.422 μ M; ISE 28.883 μ M and ECH 31.816 μ M) also showed little variation among the studied isolates. However, the EC_{95} results (Cinnamaldehyde: KOK 21.594 μ M; ISE 14.115 μ M and ECH 13.031 μ M and Citronellal: KOK 99.284 μ M; ISE 53.319 μ M and ECH 81.654 μ M) showed greater variation between the isolates than did the EC_{50} results. In general, citronellal and cinnamaldehyde showed efficacy on eggs and larvae of *H. contortus* isolates with different anthelmintic resistance profiles.

Key words: Cinnamaldehyde, Citronellal, gastrointestinal nematodes, control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ovos do nematoide <i>Haemonchus contortus</i>	17
Figura 02: Vulva de <i>Haemonchus</i> sp. e bolsa copulatória de <i>Haemonchus</i> sp.	18
Figura 03: Ciclo de vida do nematoide gastrintestinal <i>Haemonchus contortus</i>	19
Figura 04: Estrutura química do cinamaldeído	25
Figura 05: Estrutura química do citronelal	27
CAPITULO I	
Figura 1: Curvas de regressão não linear dos TEOs com cinamaldeído (painel A) e citronelal (painel B) e curvas de regressão não linear dos TDLs com cinamaldeído (painel C) e citronelal (painel D) para os isolados de <i>H. contortus</i> KOK, ISE e ECH. R ² : Coeficiente de determinação	40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Concentrações efetivas de cinamaldeído e citronelal para inibir 50% e 95% da eclosão dos ovos (CE ₅₀ e CE ₉₅) e seus intervalos de confiança a 95% (IC 95%) nos isolados de <i>Haemonchus contortus</i> KOK, ISE e ECH	40
Tabela 2: Concentrações efetivas de cinamaldeído e citronelal para inibir 50% e 95% do desenvolvimento larvar (CE ₅₀ e CE ₉₅) e seus intervalos de confiança a 95% (IC 95%) nos isolados de <i>Haemonchus contortus</i> KOK, ISE e ECH	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celsius
µg: Micrograma
µM: Micromolar
BZ: Benzimidazóis
CE₅₀: Concentração efetiva para inibir 50% da eclosão de larvas
CL₅₀: Concentração letal
DMSO: Dimetilsulfóxido
ECH: Echevarria
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IC: Intervalo de confiança
ISE: Inbred-Strain-Edinburgh
KOK: Kokstad
LC: Lactonas macrocíclicas
L1: Larva de 1º estágio
L2: Larva de 2º estágio
L3: Larva de 3º estágio
mL: Mililitro
Ng: Nanograma
OPG: Ovos por grama de fezes
R²: Coeficiente de determinação
TBZ: Tiabendazol
TDL: Teste de desenvolvimento larvar
TEO: Teste de eclosão de ovos
TRCOF: Teste de Redução de Contagem de Ovos nas Fezes
VG: Volume globular
WAAVP: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 <i>Haemonchus contortus</i>	17
2.2 Anti-helmínticos e resistência	19
2.3 Diagnóstico da resistência anti-helmíntica	20
2.3.1 Teste de eclosão de ovos (TEO)	21
2.3.2 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)	21
2.3.3 Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF)	21
2.4 Compostos orgânicos na medicina veterinária	22
2.5 Compostos orgânicos com atividade sobre nematoides gastrintestinais	24
2.5.1 Cinamaldeído	25
2.5.2 Citronelal	26
2.6 REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO I	
3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS CINAMALDEÍDO E CITRONELAL EM ISOLADOS DE <i>Haemonchus contortus</i> COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA	35
3.1 RESUMO	35
3.2 ABSTRACT	36
3.3 INTRODUÇÃO	36
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.5 RESULTADOS	39
3.6 DISCUSSÃO	41
3.7 CONCLUSÃO	42
3.8 CONFLITO DE INTERESSES	43
3.9 RECONHECIMENTOS	43
4. REFERÊNCIAS	43
5. ANEXO A	46

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes mais predominantes nos rebanhos do nordeste brasileiro são *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum* e *Strongyloides papillosus* (COSTA & VIEIRA, 1984). *Haemonchus contortus* é o nematoide de maior importância dos sistemas produtivos de caprinos e ovinos, ocasionando altas taxas de mortalidades nos rebanhos. É mais prevalente em regiões de clima tropicais, subtropicais e temperados, os quais favorecem a sobrevivência dos estágios de vida livre do parasito (BESIER *et al.*, 2016).

A principal forma de controle desses parasitos é através de drogas antiparasitárias. Os principais grupos químicos utilizados são os benzimidazóis (BZ), as lactonas macrocíclicas (LM) e os imidazotiazóis. Porém a utilização destes fármacos leva inevitavelmente ao desenvolvimento da resistência anti-helmíntica e o uso indiscriminado dessas drogas acelera esse processo (GASSER & VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016). A descoberta e produção de novas drogas é um processo lento, caro e trabalhoso o que agrava ainda mais o problema (GEARY, 2016).

O desenvolvimento da resistência anti-helmíntica ocorre quando nematoides gastrintestinais sobrevivem a tratamentos com anti-helmínticos, os quais deveriam ser letais para os mesmos. Essa resistência é transmitida para as próximas gerações e aumenta a frequência de indivíduos resistentes na população, o que leva à falha do controle anti-helmíntico (PRICHARD *et al.*, 1980). Já existem relatos de *H. contortus* resistentes a todas as classes de anti-helmínticos disponíveis no mercado (KOTZE & PRICHARD, 2016).

O crescente problema com a resistência anti-helmíntica justifica a busca por novas alternativas de controle (BARONE *et al.*, 2018). Os compostos de origem vegetal estão sendo estudados quanto a suas características antiparasitárias. Os óleos essenciais de algumas plantas demonstraram atividade sobre nematoides gastrintestinais, podendo ser utilizados como alternativas para o controle desses parasitos (ANDRÉ *et al.*, 2018).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* possui atividade ovicida sobre ovos de *H. contortus* (MACEDO *et al.*, 2015). O citronelal (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2018) possui atividade sobre os ovos e larvas de *H. contortus* e o cinamaldeído (KATIKI *et al.*, 2017) possui atividade sobre a eclosão de ovos. Contudo, os estudos relatando as eficácias dos compostos orgânicos sobre nematoides gastrintestinais ainda são relativamente poucos, sendo necessário a realização de mais pesquisas que comprovem suas eficácias. Dessa forma, o objetivo desse

trabalho foi avaliar a atividade biológica dos compostos cinamaldeído e citronelal em isolados de *H. contortus* com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica dos compostos cinamaldeído e citronelal em isolados de *H. contortus* com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade *in vitro* dos compostos cinamaldeído e citronelal sobre a eclosão de ovos em isolados de *H. contortus* sensíveis e resistentes.
- Avaliar a atividade *in vitro* dos compostos cinamaldeído e citronelal sobre o desenvolvimento larvar em isolados de *H. contortus* sensíveis e resistentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus é o nematoide gastrointestinal de maior importância nos sistemas produtivos de pequenos ruminantes, devido sua patogenicidade e capacidade de ocasionar grandes perdas econômicas. Infecta principalmente caprinos e ovinos e está presente no mundo inteiro, em regiões de climas tropicais, subtropicais e temperados. O estágio adulto habita o abomaso dos animais, alimentando-se de sangue dos capilares da mucosa. Vermes adultos podem ingerir em média de 30 a 50 µl de sangue por dia por parasito no abomaso. Em ovelhas, após 11 dias de infecção com 10.000 larvas infectantes, a perda de sangue diária pode chegar a 30 mL (MONTEIRO, 2007; AMARANTE, 2014; GASSER & VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016).

Os ovos de *Haemonchus* têm formato de barril, tamanho médio de 74 µm de comprimento por 44 µm de largura (Figura 01). As larvas de terceiro estágio (L3) são infectantes, possuem a cabeça arredondada e estreita. A cauda da bainha tem tamanho médio, termina afiladamente e moderadamente curva (MONTEIRO, 2007).



Figura 01: Ovos do nematoide *Haemonchus contortus*.

Fonte: Arquivo pessoal.

O parasito adulto pode chegar a medir de 1 a 3 cm de comprimento (AMARANTE, 2014). Os adultos apresentam extremidade anterior afilada, cápsula bucal pequena com a presença de uma lanceta em seu interior. Machos e fêmeas apresentam papilas cervicais

proeminentes e dirigidas para trás. Os machos possuem bolsa copulatória (Figura 02) bem desenvolvida com raio dorsal em forma de forquilha e espículos com ganchos. As fêmeas possuem na região vulvar um apêndice que pode ser linguiforme (Figura 02), liso e formato de botão (MONTEIRO, 2007).

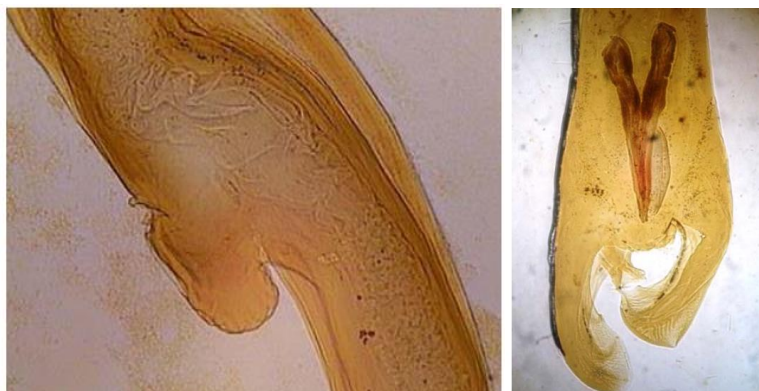


Figura 02: Vulva de *Haemonchus* sp. fêmea e bolsa copulatória de *Haemonchus* sp. macho.
Fonte: Monteiro, 2007.

O ciclo de vida do *Haemonchus* (Figura 03) é direto, possui uma fase de vida livre e outra parasitária. As fêmeas depositam ovos no abomaso que são eliminados nas fezes do hospedeiro. No meio ambiente e sob boas condições as larvas de primeiro estágio (L1) eclodem dos ovos (cerca de 1 dia), sendo liberadas na pastagem e se desenvolvem em larvas de segundo estágio (L2) até L3, em um período de no mínimo 5 dias (GASSER & VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016). Esse período pode ser afetado por condições climáticas como o frio, podendo levar semanas ou meses. O animal se infecta quando ingere pastagem contaminada com as L3 infectantes. No rúmen as larvas perdem a bainha, sofrem muda para larva de quarto estágio (L4) e depois para adultos. Antes da última muda ocorre o desenvolvimento da lanceta perfurante, usada para realizar o repasto sanguíneo, responsável pelo desenvolvimento da sintomatologia. O período pré-patente varia de 18 a 21 dias (AMARANTE, 2014).

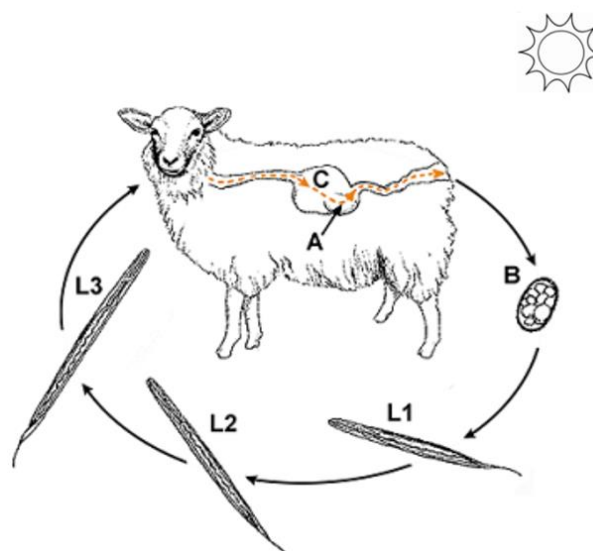


Figura 03: Ciclo de vida do nematoide gastrointestinal *Haemonchus* sp.

Fonte: Adaptado de Monteiro, 2007.

Por realizar hematofagia, *H. contortus* pode ocasionar gastrite hemorrágica, anemia grave, letargia, diferentes graus de edema subcutâneo devido à perda de albumina, redução no desempenho reprodutivo, no ganho de peso e na produção de leite, redução na produção de lã e em alguns casos diarreia. Pode ocorrer óbito, principalmente em animais jovens que apresentam carga parasitária elevada (GASSER *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2019; SCHWARZ EYAL, 2013).

H. contortus possui maior distribuição nos rebanhos, apresentando mais de 80% de prevalência em caprinos e ovinos (NEVES *et al.*, 2008). No Brasil, *H. contortus* é o nematoide mais prevalente e patogênico (SANTOS *et al.*, 2014).

2.2 Anti-helmínticos e Resistência

As verminoses afetam tanto animais de companhia como de produção. Como solução para o controle foi lançado no mercado na década de 1960 o primeiro anti-helmíntico do grupo dos benzimidazóis, o tiabendazol (TBZ) e posteriormente o albendazol, oxfendazol, fenbendazol e mebendazol. Os imidazotiazóis foram lançados no final da década de 1960 (BESIER *et al.*, 2016), seguidos pelas lactonas macrocíclicas (LMs) (ivermectina, milbemicina e moxidectina) no início dos anos 1980, sendo considerados eficazes por anos. Porém, surgiram relatos de resistência anti-helmíntica a essas drogas, devido a isso mais três princípios ativos foram disponibilizados para comercialização: o monepantel (Zolvix[®]), derquantel em combinação com abamectina (Startect[®]) e emodepside em combinação com praziquantel (Profender[®]) (BESIER *et al.*, 2016; EPE; KAMINSKY, 2013).

Atualmente o controle dos nematoides gastrintestinais é realizado quase que exclusivamente por anti-helmínticos. As exposições a essas drogas levam inevitavelmente a seleção de parasitos resistente (ANDRÉ *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017).

A resistência anti-helmíntica é um problema relatado em todo o mundo, ocorre com todos os grupos de drogas utilizadas no controle de nematoides como os imidazotiazóis, BZ e LMs. Hoje, praticamente todos os parasitos de campo apresentam algum grau de resistência aos antiparasitários, existindo relatos de vermes resistentes a múltiplas drogas. Em *H. contortus*, muitos anti-helmínticos utilizados para realizar seu controle apresentam menos de 95% de eficácia. Existe *H. contortus* resistente até ao mais novo anti-helmíntico, o monepantel (TAYLOR *et al.*, 2002; KOTZE & PRICHARD, 2016).

A resistência anti-helmíntica é causada por mutações genéticas que alteram a capacidade dos parasitos sobreviverem a tratamentos com doses recomendadas de anti-helmínticos que deveriam ser letais para indivíduos de uma população sensível. Os mecanismos de resistências a LM, BZ e imidazotiazóis, podem ocorrer devido a mutações nos genes envolvidos com a desintoxicação e permeabilidade das células ou através de alterações nos genes que codificam alvos específicos de drogas. Essa resistência é transmitida para as gerações futuras através dos cruzamentos dos helmintos que sobreviveram à exposição ao medicamento (MELO & BEVILAQUA, 2005; SANTOS, 2017; MICKIEWICZ *et al.*, 2019).

Existem algumas alternativas de controle que ajudam a melhorar o problema da resistência anti-helmíntica, como o pastejo misto ou alternado com hospedeiros sensíveis e resistentes, seleção de animais geneticamente resistentes, suplementação com dietas ricas em concentrado, confinamento de animais susceptíveis e manejo das pastagens (MOLENTO *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2010). Os produtos naturais também são estudados como possíveis alternativas de controle (ANDRÉ *et al.*, 2018).

2.3 Diagnóstico da resistência anti-helmíntica

Existem testes que podem ser usados para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica em nematoides, como os testes *in vitro* (TEO e TDL) e *in vivo* (TRCOF). Os testes *in vitro* são utilizados como alternativas aos testes *in vivo*, sendo considerados mais econômicos, menos laboriosos e de rápida obtenção dos resultados (BATISTA *et al.*, 2016).

2.3.1 Teste de Eclosão de Ovos (TEO)

É utilizado para a detecção da resistência a benzimidazóis e verificar se outros compostos possuem atividade ou não sobre ovos de parasitos (COLES *et al.*, 2006). Os ovos de nematoides são cultivados em diluições seriadas da droga ou composto a ser testado. O benzimidazol impede o embrionamento e consequentemente o desenvolvimento das larvas. Não apresenta sensibilidade caso uma população de parasitos tenha menos de 25% de nematoides resistentes. Possui a limitação de poder ser realizado no máximo até três horas após a coleta dos ovos, depois desse período os ovos devem ser armazenados anaerobicamente (TAYLOR *et al.*, 2002). O ponto de corte para diagnóstico da resistência a TBZ é 0,1 µg/mL, parasitos com CE₅₀ acima desse valor são considerados resistentes. É utilizado em testes com isolados de *Teladorsagia circumcincta*, *H. contortus*, *T. colubriformis*, *Cooperia* e *Oesophagostomum* (COLES *et al.*, 2006).

2.3.2 Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL)

O TDL é um método de diagnóstico sensível e prático, mede a capacidade de uma substância inibir o desenvolvimento de larvas (KOTZE & PRICHARD, 2016; ALEMÁN GAINZA *et al.*, 2019). Cultivam-se as L1 até L3 na presença de um anti-helmíntico ou outro composto a ser testado. Após, realiza-se a contagem do número de L1, L2 e L3 em cada concentração testada para determinação das eficiências e CE₅₀ (BATISTA *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2002). É um método de diagnóstico confiável para a detecção da resistência a levamisol (COLES *et al.*, 2006) e ivermectina (TAYLOR *et al.*, 2002). Uma das suas vantagens é permitir a análise simultânea de diferentes antiparasitários ao mesmo tempo e não depender de ovos não embrionados como no TEO (ALEMÁN GAINZA *et al.*, 2019; TAYLOR *et al.*, 2002; COLES *et al.*, 2006).

2.3.3 Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF)

É utilizado para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica *in vivo*, sendo considerado um teste simples e eficaz. Nesse teste realiza-se uma estimativa da eficácia das drogas através da contagem dos ovos antes e após a administração dos antiparasitários. É utilizado em animais naturalmente infectados, podendo ser aplicado a todos os nematoides que eliminam ovos através das fezes. Possui a limitação de não apresentar sensibilidade caso em uma população

contenha menos de 25% de parasitos resistentes. Pode ser realizado para diagnosticar a resistência a todos os anti-helmínticos (COLES *et al.*, 1992).

2.4 Compostos orgânicos na medicina veterinária

Desde a antiguidade os seres humanos aprenderam a diferenciar plantas comestíveis, tóxicas e com propriedades curativas. O uso de plantas medicinais para combater diversas patologias é utilizado há séculos por todas as civilizações (HOSTE *et al.*, 2015). A fitoterapia baseia-se no uso de plantas medicinais para realizar o tratamento de enfermidades. Tradicionalmente os medicamentos fitoterápicos conservam a composição original da planta, já os medicamentos industrializados derivados de plantas, apresentam apenas o componente que apresentou propriedades terapêuticas (FALZON & BALABANOVA, 2017).

A etnoveterinária é uma ciência que vem se desenvolvendo com o tempo, de forma que os medicamentos caseiros que eram utilizados para tratar doenças em humanos e mostravam eficácia, passaram a ser usadas em animais também. O uso de medicamentos fitoterápicos possui as vantagens de não deixarem resíduos na carne e no leite, ter baixo custo, estar prontamente disponível e ser sustentável. Na medicina veterinária há evidências de algumas espécies de plantas que podem ter atividades sobre nematoides gastrintestinais (BAKARE *et al.*, 2020).

Para a correta utilização dessas plantas na medicina veterinária é necessário a confirmação de sua eficácia e garantia de segurança para uso em animais. A primeira etapa para validar a atividade desses produtos naturais é a realização de testes *in vitro*. Os testes *in vitro* são etapas preliminares para a determinação da atividade anti-helmíntica dos prováveis compostos das plantas e são realizados antes dos testes *in vivo*. Para realização dos testes *in vivo*, é necessário realizar a análise de toxicidade com base nos dados obtidos nos testes *in vitro*, visando determinar a dose segura para uso na espécie estudada. O teste *in vivo* demonstra a ação direta do composto sobre o parasito presente no tubo digestivo do animal, diferentes das condições encontradas em testes *in vitro* (ARAÚJO-FILHO, 2017; QI *et al.*, 2015).

Os testes *in vivo* são considerados mais preciso que os *in vitro*, porém, são mais caros para executar, demoram mais tempo e possuem menor reprodutibilidade e precisão devido as variações entre animais e a farmacodinâmica que ocorrem no organismo dos animais. Os testes *in vitro* utilizando os estágios de vida livre dos parasitos, são considerados alternativas

promissoras para realizar testes com compostos naturais em animais. Os testes *in vitro* e *in vivo* se complementam, sendo necessário as duas metodologias para a realização de estudos com fitoterápicos (QI *et al.*, 2015).

Na realização dos testes *in vitro*, *H. contortus* é o nematoide modelo dentro do grupo do tricostrongilídeos. Devido sua alta diversidade genética em uma população e em diferentes países, sua capacidade de desenvolver resistência a anti-helmínticos e facilidade de disseminar essa resistência para as gerações futuras (GASSER & VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016).

Na natureza as plantas produzem dois tipos de metabólitos. Os metabólitos primários são substâncias essenciais para formação, manutenção e reprodução das plantas. Já os secundários ajudam na proteção contra vírus, bactérias, fungos, nematoides, insetos e animais herbívoros (BOURGAUD, 2001; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011).

Os metabólitos secundários também dão origem aos óleos essenciais. Estes óleos são misturas complexas, compostas por constituintes naturais, voláteis, de odor forte e característico (DHAKAD *et al.*, 2017). Podem ser líquidos incolores, lípidos, solúveis em solventes orgânicos e de baixo peso molecular. A composição dos óleos essenciais é variável, alguns componentes estão em maiores quantidades que outros, normalmente dois ou três componentes apresentam maiores concentrações, sendo denominados componentes majoritários. Os efeitos dos compostos orgânicos podem ser atribuídos a um componente do óleo ou podem ser pelas interações de dois ou mais (ARAÚJO-FILHO, 2017).

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas estruturas como flores, raízes, galhos, brotos, folhas, sementes e caule (CARNEIRO *et al.*, 2015). São utilizados como repelentes, herbicidas e inseticidas e por serem biodegradáveis não permanecem na água e no solo por muito tempo, sendo menos tóxicos para mamíferos (DHAKAD *et al.*, 2018). Algumas plantas produzem óleos essenciais com prováveis efeitos sobre nematoides gastrintestinais. Estudos demonstraram atividade parasiticida desses óleos, podendo ser utilizados como alternativas para o controle de vermes (KATIKI *et al.*, 2017).

A extração dos óleos essenciais pode ser de várias formas, cada método possui vantagens e determina as propriedades físico-químicas e propriedades biológicas do óleo extraído (AZIZ *et al.*, 2018). Os métodos de extração mais utilizados são extração por solventes

orgânicos, hidrodestilação, destilação a vapor, prensagem a frio, dentre outro (SILVEIRA *et al.*, 2012).

2.5 Compostos orgânicos com atividade sobre nematoides gastrintestinais

Usando o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (MACEDO *et al.*, 2015) em *H. contortus* no TEO, os autores encontraram uma CE_{50} de 0,46 mg/mL e eficácia média de 99,05% na concentração de 1,25 mg/mL. Compostos presentes na vagem de *Acacia farnesiana* apresentaram excelentes resultados em testes *in vitro*, com *H. contortus*, apresentando quase 100% de eficácia nas atividades ovicida e larvicida nas concentrações de 3,12 mg/mL e 6,25 mg/mL respectivamente (ZARZA-ALBARRÁN *et al.*, 2019).

Realizando testes com o óleo essencial de *Zanthoxylum simulans*, em isolados de *H. contortus*, no teste de eclosão de ovos (concentrações de 1,25 a 40 mg/mL) foi obtida CL_{50} de 3,98 mg/mL e eficácia de 100% sobre a eclosão dos ovos na concentração de 40 mg/mL. No teste de desenvolvimento larvar em minicoproculturas (mesmas concentrações) a CL_{50} foi de 4,02 mg/mL, sendo obtido eficácia de 99,8% na concentração de 40 mg/mL (QI H *et al.*, 2015).

O extrato de *Anacardium occidentale*, testado nas concentrações de 6 mg/mL a 0,125 mg/mL sobre *H. contortus*, apresentou 100% de eficácia na inibição da eclosão dos ovos na concentração de 0,5 mg/mL e DL_{50} de 0,0255 mg/mL. Apresentou paralisia em 100% das larvas na concentração de 6 mg/mL e DL_{50} de 0,196 mg/mL (DAVULURI *et al.*, 2019).

Em estudos *in vitro* com extrato de taninos hidrolisáveis obtido da *Castanea sativa*, (2-50 mg/mL) sobre *H. contortus* adultos coletados do abomaso de ovelhas, foram observadas algumas alterações. Foi observado evisceração, ruptura das cutículas ao redor da boca e de órgãos reprodutivos. Além disso, 100% de mortalidade de *H. contortus* foi alcançado com 25 mg/kg. A DL_{50} foi de 3,54 mg/mL e DL_{90} de 10 mg/mL (CARMEN ACEVEDO-RAMÍREZ *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais de *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* também demonstraram atividade em *H. contortus*. Para o teste de incubação de ovos, nas concentrações de 1,25 mg/mL, 0,62 mg/mL e 0,31 mg/mL, a concentração de 1,25 mg/mL inibiu a eclosão de ovos em 98%. O TDL realizado em minicoproculturas nas concentrações de 20 mg/mL a 1,25 mg/mL, na dose

de 10 mg/mL foi observado inibição de 90% do desenvolvimento larvar (CAMURÇA & VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Da mesma forma (MACEDO *et al.*, 2009) estudando os efeitos do *Eucalyptus globulus* sobre *H. contortus* através do TEO (2,71-21,7 mg/mL), foi obtido 99,07% de eficácia sobre os ovos na concentração 21,75 mg/mL e CE₅₀ de 8,3 mg/mL. No TDL em minicoproculturas (2,71-43,5 mg/mL) obteve-se 98,7% de eficácia na concentração de 43,5 mg/mL e CE₅₀ de 6,92 mg/mL.

Alguns dos fatores que pode limitar o uso de produtos naturais como parasiticidas são as variações quantitativas e qualitativas que podem ocorrer na composição das plantas. As variações podem ser resultados da estação do ano, clima, tipo de solo, estágios fenológicos e parte da planta que está sendo utilizada. Outra importante fonte de variação dos resultados é a heterogeneidade dos diferentes isolados de *H. contortus*, podendo ocorrer variações de resposta de um isolado para o outro (ARAUJO-FILHO, 2017).

2.5.1 Cinamaldeído

O cinamaldeído é um álcool terpeno cíclico, considerado o principal componente ativo do óleo essencial da canela. É utilizado na indústria como aromatizante natural, em sorvetes, pães, goma, bebidas, cereais, doces e cosméticos (SILVA *et al.*, 2017; BANG *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017).

A canela é obtida a partir de plantas do gênero *Cinnamomum* sp, (Figura 04) pertence à família das Lauráceas, existindo mais de 250 espécies descritas, porém, nem todas são utilizadas como especiarias. A canela é oriunda do Sri Lanka, Java, Índia e Malásia, conhecida por suas propriedades medicinais, sendo bastante utilizada na China, Egito e Roma. As espécies *C. verum* (denominada de canela verdadeira) e *C. cassia* (conhecida como Cassia ou canela chinesa), possuem maiores concentrações de cinamaldeído, apresentando 90,5% e 85,3% respectivamente (DOYLE & STEPHENS, 2019; DUARTE, 2014; SILVA, 2018).

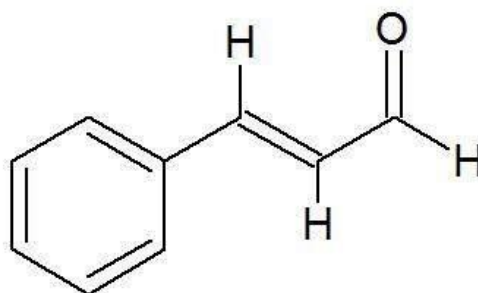


Figura 04: Estrutura química do cinamaldeído.

Fonte: <https://brainanswers.br.com/quimica/um-dos-ismeros-do-composto-conhecido-23967750>

O cinamaldeído demonstrou eficácia contra *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus*, *Laetiporus sulfuroso*, *Coriolus versicolor*, *Aspergillus ochraceus* e *Candida* spp (DOYLE & STEPHENS, 2019). Possui atividade antimicrobiana de amplo espectro de ação, sendo eficaz sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 310 µg/mL (SHEN *et al.*, 2015) e atividade anticancerígena contra melanoma em camundongos (KWON *et al.*, 2010). Estudando o cinamaldeído em ratos diabéticos durante 45 dias, foi observado redução na taxa de glicose do sangue, do colesterol total sérico e dos níveis de triglicerídeos, ocorreu ainda um aumento dos níveis de insulina plasmática (BABU *et al.*, 2007).

Na parasitologia, possui ação comprovada sobre ovos de nematoides. Em estudo realizado com isolados de *H. contortus* resistentes, testando o cinamaldeído, linalol, eugenol, carvona, anetol, vanilina, carvacrol, cineol, timol, eugenol e limoneno, verificou-se que o cinamaldeído necessitou de uma menor concentração para apresentar o mesmo efeito ovicida que os demais compostos (KATIKI *et al.*, 2017).

2.5.2 Citronelal

O citronelal é um álcool monoterpenoide, principal componente do óleo essencial de *E. citriodora* (60-80%), sua extração é realizada a partir de folhas secas da planta. É utilizado por perfumarias e na indústria de cosméticos (CARNEIRO *et al.*, 2015; ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2012).

O *Eucalyptus* (Figura 05) é uma planta nativa da Austrália, porém se encontra distribuída por todo o mundo, sendo cultivado por países de clima tropical, subtropical e temperado. É cultivado principalmente por sua madeira, produção de tábuas, painéis e celulose. Esse grande gênero pertencente à família Myrtaceae, composto por cerca de 900 espécies e subespécies. São conhecidos por seus óleos essenciais, sendo extraídos por vapor ou hidrodestilação. Os óleos comumente utilizados são os das espécies: *Eucalyptus citriodora*, *E. globulus*, *E. polybractea* e *E. camaldulensis* (ELAISSI *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2012; BATISH *et al.*, 2008).

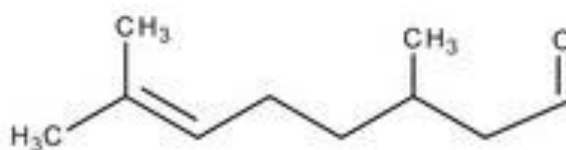


Figura 05: Estrutura química do citronelal.

Fonte: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Citronellal,MDA_CHEM-814575

Em estudo realizado com *E. citriodora* em *Lutzomyia longipalpis* foi obtida 94,68% de eficácia sobre a eclosão de ovos na concentração de 40 mg/mL (MACIEL *et al.*, 2010). Em estudo com larvas de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens* com extratos de *E. citriodora*, foi demonstrado atividade acaricida satisfatória com 53,1% de eficácia para o *A. cajennense* e de 100% para *A. nitens* (CLEMENTE *et al.*, 2010).

Ainda não se tem o conhecimento definido da atividade anti-helmíntica do citronelal sobre *Haemonchus*. Possivelmente a ação do citronelal seja através de alterações de estruturas internas, podendo causar distúrbios fisiológicos e morte do nematoide (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2018). Estudos *in vitro* comprovam que o óleo de *E. citriodora* em *H. contortus* promoveu a inibição da eclosão de ovos em 98,9% na concentração de 5,3 mg/mL e sobre o desenvolvimento larvar de 99,71% na dose de 10,6 mg/mL. Esses efeitos observados podem ter ocorrido pelas interações sinérgicas existentes entre os constituintes do óleo essencial ou apenas do citronelal (KATIKI *et al.*, 2017; MACEDO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2014).

2.6 REFERÊNCIAS

- AMARANTE, A. F. T. **Classe nematoda. In: Os parasitas de ovinos** [online]. São Paulo: Editora UNESP, 2014, pp. 13-97.
- ANDRÉ, W. P. P., RIBEIRO, W. L. C., OLIVEIRA, L. M. B. D., MACEDO, I. T. F., RONDON, F. C. M., & BEVILAQUA, C. M. L. Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 1-14, 2018.
- ARAÚJO-FILHO, J. V. **Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e citronelal sobre isolados de *Haemonchus contortus* sensível e resistente a anti-helmínticos sintéticos.** Dissertação. Universidade Estadual do Ceará. P 69. 2017.
- ARAÚJO-FILHO, J. V.; RIBEIRO, W. L.; ANDRÉ, W. P.; CAVALCANTE, G. S.; DE CM GUERRA, M.; MUNIZ, C. R.; MACEDO, I. T. F.; RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L. & DE OLIVEIRA, L. M. Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. **Industrial crops and products**, v. 124, p. 294-299, 2018.
- ALEMÁN GAINZA, Y., FANTATTO, R., de ALBUQUERQUE, A. C. A., do AMARANTE, A. F. T., FERRAZ JUNIOR, R. S., NICIURA, S., & CHAGAS, A. D. S. Padronização do teste de desenvolvimento larvar (TDL) para diagnóstico da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. **Embrapa Pecuária Sudeste-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2019.
- Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., ... & Ashraf, G. M. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. **Current drug metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100-1110, 2018.
- BABU, P. S., PRABUSEENIVASAN, S., & IGNACIMUTHU, S. Cinnamaldehyde-a potential antidiabetic agent. **Phytomedicine**, 2007, 14.1: 15-22.
- BAKARE, A. G., SHAH, S., BAUTISTA-JIMENEZ, V., BHAT, J. A., DAYAL, S. R., & MADZIMURE, J. Potential of ethno-veterinary medicine in animal health care practices in the South Pacific Island countries: a review. **Tropical animal health and production**, p. 1-11, 2020.
- BARONE, C. D.; ZAJAC, A. M.; MANZI-SMITH, L. A.; HOWELL, A. B.; REED, J. D.; KRUEGER, C. G.; & PETERSSON, K. H. (2018). Anthelmintic efficacy of cranberry vine extracts on ovine *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 253, p. 122-129, 2018.
- BATISTA, E. K. F.; NEVES, C. A.; MENDONÇA, I. L. Resistência anti-helmíntica em ovinos e caprinos uma revisão. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**. 1-15, 2016.
- BATISH, D. R., SINGH, H. P., KOHLI, R. K., & KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest ecology and management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BANG, H. B., LEE, Y. H., KIM, S. C., SUNG, C. K., & JEONG, K. J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cinnamaldehyde. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 16, 2016.

BESIER, R. B., KAHN, L. P., SARGISON, N. D., & VAN WYK, J. A. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. In: *Advances in Parasitology*. **Academic Press**, 2016. p. 181-238.

BOURGAUD, F. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839–851, 2001.

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

CARNEIRO, J. N. P., ALBUQUERQUE, R. S., LEITE, N. F., MACHADO, A. J. T., DE BRITO, D. I. V., ROLÓN, M., ... & MORAIS-BRAGA, M. F. B. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 2, p. 29-36, 2015.

CARMEN ACEVEDO-RAMÍREZ, P. M; HALLAL-CALLEROS, C; FLORES-PÉREZ, I; ALBA-HURTADO, F; MENDOZA-GARFÍAS, M. B; DEL CAMPO, N. C & BARAJAS, R. Anthelmintic effect and tissue alterations induced *in vitro* by hydrolysable tannins on the adult stage of the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 266, p. 1-6, 2019.

COSTA, C. A. F., & VIEIRA, L. D. S. Controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos no estado do Ceará. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 1984.

COLES, G. C; JACKSON, F; POMROY, W. E; PRICHARD, R. K; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G; SILVESTRE, A; TAYLOR, M. A; VERCRUYSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

COLES, GC, BAUER, C., BORGSTEEDE, FHM, GEERTS, S., KLEI, TR, TAYLOR, MA, & WALLER, PJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Parasitologia veterinária**, v. 44, n. 1-2, pág. 35-44, 1992

CLEMENTE, M. A., DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M., SCORALIK, M. G., GOMES, F. T., DE AZEVEDO PRATA, M. C., & DAEMON, E. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 107, n. 4, p. 987-992, 2010.

DHAKAD, A. K., PANDEY, V. V., BEG, S., RAWAT, J. M., & SINGH, A. Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 3, p. 833-848, 2018.

DAVULURI, T., CHENNURU, S., PATHIPATI, M., KROVVIDI, S., & RAO, G. S. *In vitro* anthelmintic activity of three tropical plant extracts on *Haemonchus contortus*. **Acta Parasitologica**, p. 1-8, 2019.

DOYLE, A. A; & STEPHENS, J. C. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. **Fitoterapia**, 2019, 104405.

DUARTE, R. C. **Estudo dos compostos bioativos em especiarias (*Syzygium aromaticum* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Myristica fragans* Houtt) processadas por radiação ionizante**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

EPE, Christian; KAMINSKY, Ronald. New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 3, p. 129-134, 2013.

ELAISSI, A; MOUMNI, S; ROELEVELD, K & LARBI KHOUJA, M. Chemical Characterization of Five Tunisian Eucalyptus Essential Oils Species. **Chemistry & Biodiversity**, 2019.

FALZON, C. C., & BALABANOVA, A. Phytotherapy: an introduction to herbal medicine. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 2, p. 217-227, 2017.

GASSER, R. B., SCHWARZ, E. M., KORHONEN, P. K., & YOUNG, N. D. Understanding *Haemonchus contortus* better through genomics and transcriptomics. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 2016. p. 519-567.

GASSER R. B; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. *Haemonchus contortus* and Haemonchosis: Past, Present and Future Trends. **Advances in Parasitology**. v. 93, n. 3-4, 2016.

GEARY, T. G. *Haemonchus contortus*: applications in drug discovery. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 2016. p. 429-463.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M. E., NDOMBASI-BOKUY, M., CUQUERELLA, M., & ALUNDA, J. M. Immunization with recombinant rHc23 partially protects lambs against trickle infections by *Haemonchus contortus*. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 333, 2019.

HOSTE, H., TORRES-ACOSTA, J. F. J., SANDOVAL-CASTRO, C. A., MUELLER-HARVEY, I., SOTIRAKI, S., LOUVANDINI, H., ... & TERRILL, T. H. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. **Veterinary parasitology**, v. 212, n. 1-2, p. 5-17, 2015.

KATIKA, L. M; BARBIERI, A. M. E; ARAUJO, R. C; VERÍSSIMO, C. J; LOUVANDINI, H & FERREIRA, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47-51, 2017.

KOTZE, A. C; PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 2016. p. 397-428.

KWON, H. K; HWANG, J. S; SO, J. S; LEE, C. G; SAHOO, A; RYU, J. H., ... & PARK, Z. Y. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF κ B and AP1. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 392, 2010.

MACIEL, M. V., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L., SILVA, R. A., BARROS, R. S., SOUSA, R. N., ... & SOUZA-NETO, M. A. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 1, p. 1-7, 2010.

MACEDO, I. T., BEVILAQUA, C. M., OLIVEIRA, L., CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L., VIEIRA, L. D. S., OLIVEIRA, F. R., ... & CHAGAS, A. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F; BEVILAQUA, C. M. L; OLIVEIRA, L. M. B; CAMURÇAVASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L.S; AMÓRA, S. S. A. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.3, p.223-227, 2011.

MACEDO, I. T. F; OLIVEIRA, L. M. B. D; RIBEIRO, W. L. C; SANTOS, J. M. L. D; SILVA, K. D. C; ARAÚJO-FILHO, J. V. D; ... & BEVILAQUA, C. M. L. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 268-275, 2015.

MAZID, M., KHAN, T. A., & MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and medicine**, v. 3, n. 2, p. 232-249, 2011.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, Claudia Maria Leal. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus* Genetic approach of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p. 141-146, 2005.

MICKIEWICZ, M., CZOPOWICZ, M., MOROZ, A., SZALUŚ-JORDANOW, O., GÓRSKI, P., VÁRADY, M., KÖNIGOVÁ, A., SPINU, M., LEFKADITIS, M., KABA, J. Development of resistance to eprinomectin in gastrointestinal nematodes in a goat herd with pre-existing resistance to benzimidazoles. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 22, n. 4, p. 753-760, 2019.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. 2. ed. 370 p – Rio de Janeiro: Roca, 2007.

MOLENTO, M. B; VERÍSSIMO, C. J; AMARANTE, A. T; VAN WYK, J. A; CHAGAS, ADS, DE ARAÚJO, JV; & BORGES, F, A. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico** , v. 80, n. 2, p. 253-263, 2013.

NEVES, M. R. M; VIEIRA, L., & ANDRIOLI, A. Controle do parasitismo em cabras leiteiras criadas a pasto. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2008.

PRICHARD, R. K., HALL, C. A., KELLY, J. D., MARTIN, I. C. A., & DONALD, A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian veterinary journal**, v. 56, n. 5, p. 239-250, 1980.

QI, H., WANG, W. X., DAI, J. L., & ZHU, L. *In vitro* anthelmintic activity of *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 211, n. 3-4, p. 223-227, 2015.

RIBEIRO, J. C; RIBEIRO, W. L. C; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F; MACEDO, I. T. F; SANTOS, J. M. L; PAULA, H. C. B; ARAÚJO-FILHO, J. V; MAGALHÃES, R. D; BEVILAQUA, C. M. L. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. **Veterinary parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 243-248, 2014.

SANTOS, J. M. L; MONTEIRO, J. P; RIBEIRO, W. L. C; MACEDO, I. T. F; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F; DA SILVA VIEIRA, L & BEVILAQUA, C. M. L. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 199, n. 3-4, p. 160-164, 2014.

SANTOS, J. M. L. Desenvolvimento e diagnóstico da resistência anti-helmíntica em populações de *Haemonchus contortus* no estado do Ceará. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Tese/dissertação (ALICE)**, 2017.

SANTOS, J. M. L; VASCONCELOS, J. F; FROTA, G. A; RIBEIRO, W. L. C; ANDRÉ, W. P. P; DA SILVA VIEIRA, TEIXEIRA, M; BEVILAQUA, C. M. L; MONTEIRO, J. P. *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. **Veterinary parasitology**, v. 248, p. 90-95, 2017.

SCHWARZ, E. M; KORHONEN, P. K; CAMPBELL, B. E; YOUNG, N. D; JEX, A. R; JABBAR, A; HALL R. S; MONDAL, A; HOWE, A. C; PELL, J; HOFMANN, A; BOAG P, R; ZHU, X. Q; GREGORY, T. R; LOUKAS, A; WILLIAMS, B. A; ANTOSHECHKIN, I; BROWN, C. T; STERNBERG, P. Q; GASSER, T. B. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. **Genome biology**, v. 14, n. 8, p. R89, 2013.

SHEN, S., ZHANG, T., YUAN, Y., LIN, S., XU, J., & YE, H. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, v. 47, p. 196-202, 2015.

SILVA, A. L. S. A. D. Efeitos da suplementação com canela (*Cinnamomum verum*) sobre parâmetros endócrinos-metabólicos em mulheres na pós-menopausa com sobrepeso ou obesidade, 2018.

SILVA, C. S; FIGUEIREDO, S; DE OLIVEIRA, P. V; DE SILVA SAMINEZ, W. F; DINIZ, R. M; RODRIGUES, J. F. S., ... & GRISOTTO, M. A. G. Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 9, n. 2, p. 192-197, 2017.

SILVEIRA, J. C., BUSATO, N. V., COSTA, A. O. S., & JÚNIOR, E. F. C. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 2012.

SINGH, H. P; KAUR, S; NEGI, K; KUMARI, S; SAINI, V; BATISH, D. R; & KOHLI, R. K. Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **LWT-Food science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 237-241, 2012.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary parasitology**, v. 103, n. 3, p. 183-194, 2002.

VIEIRA, L. S.; BENVENUTI, C. L.; DAS NEVES, M. R. M. Resistência parasitária e método FAMACHA como alternativa de controle de *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes no Nordeste brasileiro. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

ZARZA-ALBARRÁN, M. A., OLMEDO-JUÁREZ, A., ROJO-RUBIO, R., MENDOZA-DE GIVES, P., GONZÁLEZ-CORTAZAR, M., TAPIA-MARURI, D. TAPIA-MARURI, J. MONDRAGON-ANCELMO, C. GARCÍA-HERNÁNDEZ, EVER A. BLÉ-GONZÁLEZ, A. ZAMILPA. Galloyl flavonoids from *Acacia farnesiana* pods possess potent anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. **Journal of ethnopharmacology**, p. 112402, 2019.

ZHU, R., LIU, H., LIU, C., WANG, L., MA, R., CHEN, B., ... & GAO, S. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. **Pharmacological research**, v. 122, p. 78-89, 2017.

CAPÍTULO I

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS CINAMALDEÍDO E CITRONELAL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS CINAMALDEÍDO E CITRONELAL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

Valderlandia Oliveira dos Santos^a; Gracielle Araújo Frota^a; Breno Reinaldo Oliveira^b; Laísa Bastos Albuquerque^b; Fernando Raul Correia de Vasconcelos^b; Adelino Carneiro Silva^b; Luiz da Silva Vieira^c; Jéssica Maria Leite dos Santos^b; Jomar Patrício Monteiro^{c*}

^a Programa de Pós-Graduação em Zootecnia/Universidade Estadual Vale do Acaraú, Avenida da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral, CE, Brasil

^b Centro Universitário INTA-UNINTA, Rua Antônio Rodrigues Magalhães, 359, Dom Expedito, Sobral, CE, Brasil

^c Embrapa–Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04. Caixa Postal 145, CEP: 62010-970, Sobral, CE, Brasil

*Autor correspondente: jomar.monteiro@embrapa.br

3.1 RESUMO

A infecção por nematoides gastrintestinais é um dos principais desafios na produção de pequenos ruminantes. Ocasiona perdas produtivas principalmente devido à resistência anti-helmíntica. Bioativos com atividade anti-helmíntica são potencial alternativa para o controle desses parasitos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade biológica do cinamaldeído e citronelal em isolados de *Haemonchus contortus* com diferentes perfis de resistência anti-helmíntica. Foram realizados testes de eclosão de ovos (TEO) e testes de desenvolvimento larvar em minicoproculturas (TDL) utilizando o isolado Kokstad (resistente a todos os anti-helmínticos), o isolado Inbred-Strain-Edinburgh (suscetível) e o isolado Echevarria (suscetível). Foram calculadas as concentrações efetivas para inibir 50% (CE₅₀) e 95% (CE₉₅) da eclodibilidade dos ovos e do desenvolvimento larvar. Resultados de TEO para cinamaldeído apresentaram baixa variação entre os isolados estudados. O mesmo ocorreu com os resultados de CE₅₀ de TEO para citronelal. Já a CE₉₅ para citronelal apresentou maior variação entre os isolados estudados. Resultados de TDL também mostraram pouca variação entre os isolados estudados. Em geral, os resultados de CE₉₅ apresentaram maior variação entre os isolados do que os resultados de CE₅₀. O citronelal e cinamaldeído mostraram eficácia sobre ovos e larvas de isolados de *H. contortus* com diferentes perfis de resistência a anti-helmínticos.

Palavras-chave: cinamaldeído, citronelal, *Haemonchus contortus*, resistência anti-helmíntica.

3.2 ABSTRACT

Parasitism by gastrointestinal nematodes is a challenge for small ruminant farming worldwide. It causes productive and economic losses, especially due to parasite resistance to conventional anthelmintics. Natural compounds with antiparasitic activity are a potential alternative for controlling these parasites. Our objective was to evaluate the activity of cinnamaldehyde and citronellal on *Haemonchus contortus* isolates with different levels of anthelmintic resistance. Cinnamaldehyde and citronellal were tested using egg hatch assays (EHAs) and larval development tests (LDTs) on mini-fecal cultures, on the *Haemonchus contortus* isolates Kokstad (resistant to all anthelmintics), Inbred-Strain-Edinburgh (susceptible to all anthelmintics) and Echevarria (susceptible to all anthelmintics). Effective concentrations to inhibit 50% (EC₅₀) and 95% (EC₉₅) of egg hatching and larval development were calculated. Cinnamaldehyde EHA EC₅₀ and EC₉₅ results both showed low variation among the studied isolates. Citronellal also had a similar effect on EHA EC₅₀ results. However, citronellal EC₉₅ results showed higher variation between the isolates studied. The results from LDTs also showed little variation between the different isolates. In general, EC₉₅ results showed higher variation among the isolates studied than did EC₅₀ results. Both cinnamaldehyde and citronellal showed efficacy against egg hatching and larval development of *H. contortus* isolates, with different profiles of anthelmintic resistance.

Keywords: cinnamaldehyde, citronellal, *Haemonchus contortus*, anthelmintic resistance.

3.3 INTRODUÇÃO

Os nematoides gastrintestinais são a principal causa de perdas produtivas e econômicas nos sistemas produtivos de ovinos e caprinos. *Haemonchus contortus* é considerado o parasito mais patogênico, podendo ocasionar anemia fatal em animais com alta carga parasitária (ZAJAC & GARZA, 2020; SALGADO & SANTOS, 2016).

A principal forma de controle desses nematoides é através de drogas antiparasitárias, porém o uso dessas substâncias estão comprometidos, muitas populações de parasitos já desenvolveram resistência anti-helmíntica (GAUDIN et al., 2016). Além disso, aumentou a demanda por produtos de origem animal provenientes de sistemas sustentáveis e orgânicos

(ZAJAC & GARZA, 2020), fazendo-se necessário a busca por novas alternativas de controle (BARONE et al., 2018).

Os óleos essenciais oriundos de plantas aromáticas têm sido estudados quanto aos seus efeitos terapêuticos e nematocidas. A canela (*Cinnamomum* spp.) pertencente à família Lauraceae, oriunda do sul e sudeste da Ásia é utilizada tradicionalmente na culinária e como planta medicinal (BAKAR et al., 2020). Seu componente majoritário o cinamaldeído demonstrou eficácia contra algumas espécies de fungos (DOYLE & STEPHENS, 2019), atividade antimicrobiana sobre bactérias da família das *Enterobacteriaceae* resistente a quinolonas (DHARA & TRIPATHI, 2019), sobre ovos de *H. contortus* (KATIKI et al., 2017) e nematoides como o *Caenorhabditis elegans* (LU et al., 2020).

O citronelal é o componente majoritário do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*. Possui eficácia comprovada como antimicrobiano (BEZERRA et al., 2019), ação repelente contra *Anopheles gambiae* s.s. (WU et al., 2020), atuação sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Echerichia coli* (BORGES et al., 2017) e sobre ovos e larvas de nematoides (ARAÚJO-FILHO et al., 2018). Nesse sentido o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade biológica dos compostos orgânicos cinamaldeído e citronelal em isolados de *H. contortus* sensíveis e resistentes a anti-helmínticos.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Isolados de *Haemonchus contortus*

Foram utilizados isolados de *H. contortus* sensíveis e resistentes a anti-helmínticos, mantidos através de infecções experimentais contínuas. O isolado ISE (Inbred-Strain-Edinburgh) foi utilizado como referência de suscetibilidade a todos os anti-helmínticos comerciais (ROOS et al., 2004), o isolado KOK (originário de Kokstad - África do Sul) foi utilizado como referência de resistência a múltiplas drogas (BARRÈRE et al., 2014) e o isolado nativo Echevarria (ECH), sem histórico de resistência, oriundo de uma propriedade rural do Rio Grande do Sul - Brasil (ECHEVARRIA et al., 1991).

Foram utilizados 12 ovinos adultos livre de parasitos após serem submetidos a uma desparasitação bem sucedida (ivermectina 200 µg/kg, oxfendazol 5 mg/kg, monepantel-2,5 mg/kg e levamisol 7,5 mg/kg). Os animais foram divididos em 4 grupos (n=3) sendo que cada grupo foi infectado com um dos isolados de *H. contortus* e o último grupo foi mantido como controle não infectado. Cada animal recebeu cerca de 5.000 larvas infectantes de terceiro estágio (L3) por via oral. Os monitoramentos das infecções experimentais foram realizados

semanalmente através da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e volume globular (VG). Todos os procedimentos que envolveram animais experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos sob protocolo 04/2018.

3.4.2 Teste de Eclosão de Ovos (TEO)

As recuperações de ovos e os TEOs foram realizados seguindo o protocolo da World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) disponível em (COLES et al., 1992). Para os TEOs foram utilizados 250 µL de suspensão de ovos (~100 ovos/100 µL), mais 250 µL de uma solução de tratamento (cinamaldeído ou citronelal) para um volume final de 500 µL/poço. As placas foram incubadas a 27 ± 1 °C por 48 h e após os ovos e larvas de primeiro estágio (L1) em cada poço foram contados utilizando microscópio invertido.

O cinamaldeído (concentrações finais: 378,33; 189,16; 94,58; 47,29; 23,65 e 11,82 µM) e o citronelal (concentrações finais: 25.931,93; 6.482,98; 1.620,75; 405,19; 101,30; 25,32, 6,33 e 1,58 µM) foram diluídos em Tween 80 a 0,25%. Ambos os compostos foram testados com seis réplicas para cada concentração nos isolados KOK, ISE e ECH. Nos controles negativos foram usados Tween 80 a 0,25% e controles positivos tiabendazol (TBZ) (0,025 mg/mL diluído em DMSO a 0,3%). Cinamaldeído e citronelal foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.4.3 Teste de Desenvolvimento Larvar em Minicoproculturas

Os TDLs em minicoproculturas foram realizados como previamente descrito (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007) com pequenas modificações. Os ovos recuperados foram incubados por 24 horas a 27 ± 1 °C para obtenção das larvas L1. A seguir, 500 µL da solução de larvas L1 (~250 larvas), mais 100 µL de meio nutritivo (*Escherichia coli* liofilizada, extrato de levedura e anfotericina B 0,49 µg/mL) e 600 µL do tratamento (cinamaldeído ou citronelal) foram adicionados a duas gramas de fezes (oriundas de animais livre de parasitos), homogeneizados e incubados por mais 6 dias a 27 ± 1 °C e umidade ideal (>80%). As recuperações de larvas infectantes foram realizadas como previamente descrito (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950). As larvas L3 foram recuperadas e transferidas para placas de 24 poços e realizada a leitura por meio de microscópio invertido.

O cinamaldeído (concentrações finais: 22.699,75; 15.133,17; 11.349,87; 7.566,68; 5.674,93; 3.783,29 e 1.891,64 µM) foi diluído em tween 80 0,4% e o citronelal (concentrações finais: 64.829,82; 32.414,91; 16.207,45; 8.103,72; 4.051,86; 2.025,93; 1.012,96 e 506,48 µM) em Tween 80 a 1,1 %. Os testes foram realizados com cinco réplicas para cada concentração

testada. Foi realizado um controle branco (água destilada e meio nutritivo), controle sem tratamento (solução de lavras, meio nutritivo e água destilada), controle negativo (solução de larvas, meio nutritivo e diluente) e controle positivo (ivermectina a 0,008 mg/mL).

3.4.4 Análise de dados:

As eficácias dos tratamentos por poço nos TEOs foram calculadas usando a seguinte fórmula:

$$(\text{número de ovos/número de ovos} + \text{número de larvas L1}) \times 100$$

As eficácias dos tratamentos nos TDLs foram calculadas usando a seguinte fórmula (ARAÚJO-FILHO et al., 2019):

$$(\bar{x}_{\text{larvas L3 ctrl. negativo}} - \text{larvas L3 com tratamento} / \bar{x}_{\text{larvas L3 ctrl. negativo}}) \times 100$$

As concentrações efetivas para inibir 50% (CE₅₀) e 95% (CE₉₅) da eclosão de ovos e do desenvolvimento de larvas foram calculadas após transformação logarítmica usando análise de regressão não linear (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

3.5 RESULTADOS

Os resultados de TEOs e TDLs com uso de cinamaldeído e citronelal nos isolados de *H. contortus* KOK, ISE e ECH são mostrados na Figura 1.

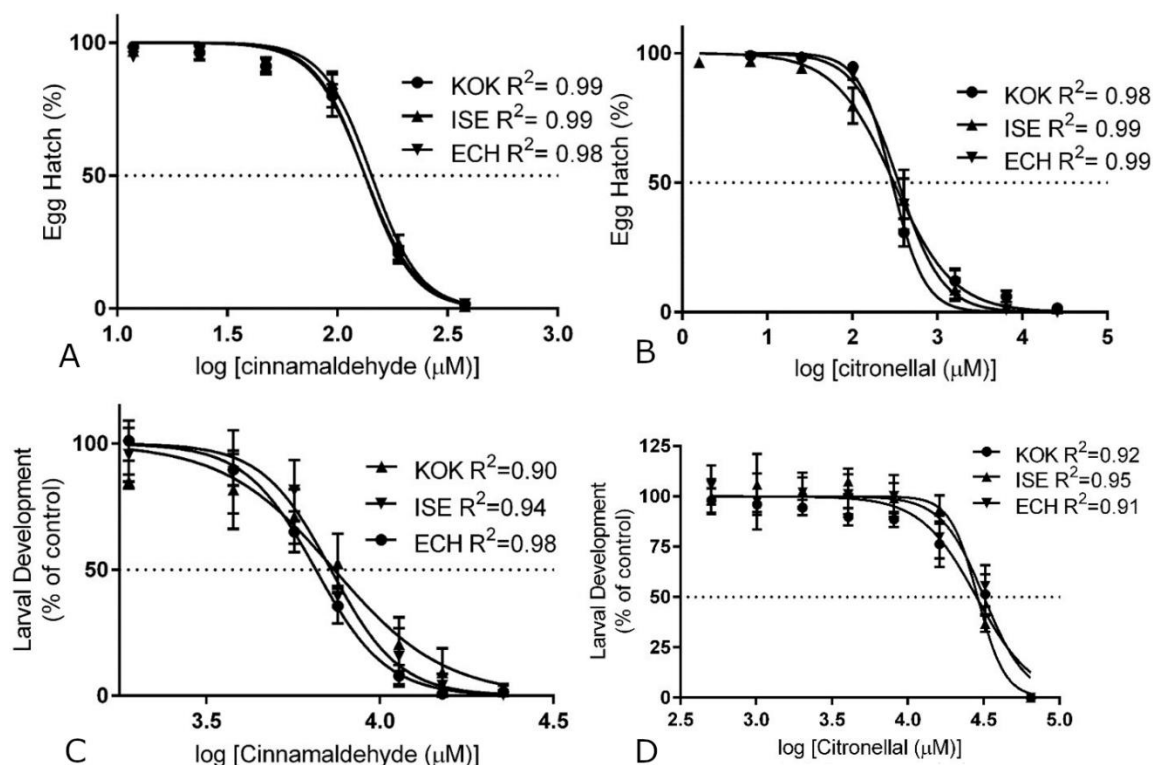


Figura 1: Curvas de regressão não linear dos TEOs com cinamaldeído (painel A) e citronelal (painel B) e TDLs com cinamaldeído (painel C) e citronelal (painel D) para os isolados de *H. contortus* KOK, ISE e ECH. R^2 : Coeficiente de determinação.

Os resultados da CE_{50} e CE_{95} e seus intervalos de confiança a 95% (IC) dos TEOs e TDLs com cinamaldeído e citronelal nos isolados de *H. contortus* KOK, ISE e ECH são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Concentrações efetivas de cinamaldeído e citronelal para inibir 50% e 95% da eclosão dos ovos (CE_{50} e CE_{95}) e seus intervalos de confiança a 95% (IC 95%) nos isolados de *Haemonchus contortus* KOK, ISE e ECH.

	Isolados <i>H. contortus</i>	CE_{50} (μ M)	95% IC	CE_{95} (μ M)	95% IC
Cinamaldeído	KOK	133,6	128,5 – 138,9	295,6	263,5 – 337,6
	ISE	142,8	137,7 – 148,1	301,1	270,4 – 340,8
	ECH	133,2	126,7 – 140,0	283,2	245,8 – 335,8
Citronelal	KOK	294,5	268,6 – 322,9	1.083,1	801,9 – 1.615,2
	ISE	308,7	276,6 – 344,5	3.317,3	2.300,2 – 5.120,1
	ECH	350,6	322,4 – 381,3	2.008,2	1.494,2 – 2.892,9

CE_{50} : concentração efetiva para inibir 50% da eclosão dos ovos; CE_{95} : concentração efetiva para inibir 95% da eclosão dos ovos; IC de 95%: intervalo de confiança a 95%

Tabela 2: Concentrações efetivas de cinamaldeído e citronelal para inibir 50% e 95% do desenvolvimento larval (CE₅₀ e CE₉₅) e seus intervalos de confiança a 95% (IC 95%) nos isolados de *Haemonchus contortus* KOK, ISE e ECH.

	Isolados <i>H. contortus</i>	CE ₅₀ (μM)	95% IC	CE ₉₅ (μM)	95% IC
Cinamaldeído	KOK	7.396	6.766 – 8.083	21.594	16.127 – 32.738
	ISE	7.232	6.787 – 7.706	14.115	11.510 – 19.164
	ECH	6.542	6.319 – 6.772	13.031	11.529 – 15.183
Citronelal	KOK	28.422	25.363 – 31.850	99.284	69.237 – 167.158
	ISE	28.883	26.809 – 31.117	53.319	41.555 – 86.254
	ECH	31.816	28.463 – 35.565	81.654	57.513 – 148.312

CE₅₀: concentração efetiva para inibir 50% do desenvolvimento larval; CE₉₅: concentração efetiva para inibir 95% do desenvolvimento larval; IC de 95%: intervalo de confiança a 95%

3.6 DISCUSSÃO

Os potenciais de alguns óleos essenciais e seus componentes majoritários têm sido estudados quanto aos seus efeitos sobre nematoides gastrintestinais, com foco em especial sobre *H. contortus* (HELAL et al., 2020). Porém esse conhecimento ainda é limitado, sendo necessário o desenvolvimento de mais pesquisas para tentar desenvolver novas substâncias que possam combater os parasitos.

Em fungos *Saccharomyces cerevisiae*, o cinamaldeído exerceu seu efeito através de interferências na síntese da parede celular. Ocasionalmente inibição das isozimas da quitina sintase na parede celular e inibindo a síntese de β-glucano (SHREAZ et al., 2016). Como os ovos de *Haemonchus* também possuem quitina na sua composição (MANSFIELD et al., 1992), sugere-se que o cinamaldeído ocasione danos na estrutura dos ovos e assim promova seu efeito ovicida.

O cinamaldeído foi estudado em isolados de *H. contortus* multirresistente (ivermectina, moxidectina, closantel, albendazol, fosfato de levamisol e triclorfon), através do TEO, sendo obtida CE₅₀ de 136,19 μM (KATIKI et al., 2017). Resultado similar aos obtidos na pesquisa para os três isolado em estudo (Figura 1-Painel A, Tabela 1). Em nossa pesquisa também não foram observadas diferenças nas CE₅₀ e CE₉₅ dos isolados (KOK, ISE e ECH) (Tabela 01). Como os resultados foram muito próximos para os nematoides com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica, supõe-se que o mecanismo de ação associado a resistência anti-helmíntica não tenha efeito sobre a ação do cinamaldeído sobre os ovos de diferentes isolados de *H. contortus*. Da mesma maneira, os resultados de TDLs com cinamaldeído também foram equivalentes para os diferentes isolados estudados (Figura 2-Painel C, Tabela 2).

A dose letal para o nematoide de vida livre *C. elegans* foi determinada em 6.058,27 μM após 4 horas de exposição, induzindo múltiplas alterações de expressão gênica envolvendo

principalmente genes de metabolismo da glutatona (LU et al., 2020). A exposição de *Ascaris suum* ao extrato de *Cinnamomum verum* (cinamaldeído 7,8%) levou a danos na camada muscular e no tubo digestivo, sem muitas alterações na cutícula do parasito (WILLIAMS et al., 2015). Isto indica que o mecanismo de ação pode ser através de alterações nas estruturas internas após sua ingestão. Seria interessante determinar se o mesmo procede para *H. contortus*. Além dos efeitos sobre nematoides de pequenos ruminantes e suínos o cinamaldeído também foi eficaz sobre o nematoide da soja *Meloidogyne incógnita* (JARDIM et al., 2018). Exposição ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (cinamaldeído 83%) levou a 100% de mortalidade e imobilidade sobre as larvas na concentração de 389,37 μ M. Avaliações de fornecimento de cinamaldeído na dieta de vacas leiteiras, mostraram que esse composto foi seguro nas concentrações de 0,2 a 4 mg/kg de peso corporal. Não ocasionou alterações no consumo de ração, fermentação ruminal, pH ruminal, composição e produção de leite e não afetou a digestão dos nutrientes da dieta (CHAPMAN et al., 2019). Portanto, esse composto pode ser seguro para testes *in vivo* com pequenos ruminantes. Como o cinamaldeído mostrou efeito nematicida em diferentes espécies de nematoides que habitam ambientes diferentes e é potencialmente seguro para pequenos ruminantes, permanece como um bom candidato para futuros experimentos.

Os efeitos do citronelal na eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas também foram equivalentes nos isolados estudados (Figura 1-Painéis B e D, Tabela 1 e 2). Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* (71,77% de citronelal) também foi efetivo na inibição da eclosão de ovos de *H. contortus* e desenvolvimento larval (MACEDO et al., 2011). Da mesma forma, o citronelal também mostrou efeito ovicida e inibiu o desenvolvimento larval em *H. contortus* sensível e resistente a anti-helmínticos (ARAÚJO-FILHO et al., 2018). Nossos resultados estão em concordância com os mostrados na literatura. É importante mencionar que testes de redução de contagem de ovos nas fezes utilizando óleo essencial de *E. citriodora* (67.5% de citronellal) e nanoencapsulamento reduziram as contagens de ovos em 40.5% e 55.9% para o óleo livre e nanoencapsulado respectivamente (RIBEIRO et al., 2014).

3.7 CONCLUSÃO

Até o momento, os mecanismos de ação do cinamaldeído e citronelal permanecem desconhecidos, mas demonstraram atividade ovicida e larvicida em isolados de *H. contortus* com diferentes perfis de resistência anti-helmíntica. É possível que os mecanismos de resistência aos anti-helmínticos comerciais não apresentem ação contra compostos estudados fazendo dos mesmos interessantes candidatos alternativos aos anti-helmínticos comerciais.

3.8 CONFLITO DE INTERESSES:

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

3.9 RECONHECIMENTOS:

Os autores agradecem a Funcap (BP3-0139-00359.01.00/18 e BMD-0008-01351.01.06/20) pelo apoio financeiro e a Embrapa (projeto número 22.16.04.038.00.03.001) pelo apoio e infraestrutura.

4 REFERÊNCIAS

- Araújo-Filho JV, Ribeiro WLC, André WPP, Cavalcante GS, Guerra MCM, Muniz CR, et al. Effects of Eucalyptus citriodora essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. *Ind Crops Prod* 2018; 124: 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.059>
- Barrère V, Beech RN, Charvet CL, Prichard RK. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 2014; 44(3-4): 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.12.004>
- Bakar A, Yao PC, Ningrum V, Liu CT & Lee SC. Beneficial biological activities of *Cinnamomum osmophloeum* and its potential use in the alleviation of oral mucositis: A systematic review. *Biomedicines* 2020; 8(1): 3. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8010003>
- Barone CD, Zajac AM, Manzi-Smith LA, Howell AB, Reed JD, Krueger CG, et al. Anthelmintic efficacy of cranberry vine extracts on ovine *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2018; 253: 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.016>
- Bezerra RV, Oliveira HMBF, Lima CMBL, Diniz MDFFM, PÊSSOA HDLF, Oliveira FAA. Atividade antimicrobiana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal, (S)-(-)-citronelal e 7-hidroxicitronelal contra cepa de *Bacillus Subtilis*. *Revista Uningá* 2019; 56(2): 62-69. <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/2132>
- Borges A, Lopez-Romero JC, Oliveira D, Giaouris E, Simões, M. Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils. *J Appl Microbiol* 2017; 123(1): 104-115. <https://doi.org/10.1111/jam.13490>
- Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilacqua CML, Morais SM, Maciel MV, COSTA CTC, Macedo ITF, et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet Parasitol* 2007; 148(3-4): 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.012>

- Chapman CE; Ort SB; Aragona KM, Cabral RG, Erickson PS. Effect of cinnamaldehyde on feed intake, rumen fermentation, and nutrient digestibility, in lactating dairy cows. *J Anim Sci* 2019; 97(4): 1819-1827. <https://doi.org/10.1093/jas/skz050>
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992; 44(1-2): 35-44. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)
- Dhara L, Tripathi A. Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39(1): 65-73. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03692-y>
- Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia* 2019; 139: 104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Echevarria FAM, Aamour J, Duncan JL. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectinresistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 1991; 39(3-4): 279-284. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90044-V](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90044-V)
- Gaudin E, Simon M, Quijada J, Schelcher F, Sutra JF, Lespine A, et al. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Vet Parasitol* 2016; 227: 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.002>
- Helal MA, Abdel-Gawad AM, Kandil OM, Khalifa MM, Cave GW, Morrison AA, et al. Nematocidal Effects of a Coriander Essential Oil and Five Pure Principles on the Infective Larvae of Major Ovine Gastrointestinal Nematodes *In Vitro*. *Pathogens* 2020; 9(9): 740. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090740>
- Jardim IN, Oliveira DF, Silva GH, Campos VP, Souza PE. (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. *J Pest Sci* 2018; 91(1): 479-487. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0850-3>
- Katiki LM, Barbieri AME, Araujo RC, Veríssimo CJ, Louvandini H, Ferreira JFS. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. *Vet Parasitol* 2017; 243: 47-51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.008>
- Lu L, Shu C, Chen L, Yang Y, Ma S, Zhu K, et al. Insecticidal activity and mechanism of cinnamaldehyde in *C. elegans*. *Fitoterapia* 2020; 146: 104687. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104687>

- Macedo ITF, Bevilaqua CML, Oliveira LMB, Camurça-Vasconcelos ALF, Vieira LS, Amóra SSA. Evaluation of Eucalyptus citriodora essential oil on goat gastrointestinal nematodes. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011;20(3): 223-227. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300009>
- Mansfield LS, Gamble HR, Fetterer RH. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*--I. Structural components. *Comp Biochem Physiol B* 1992; 103(3): 681. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90390-d](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90390-d)
- Roos MH, Otsen, M, Hoekstra R, Veenstra JG, Lenstra JA. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 2004; 34(1): 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.002>
- Salgado JA, Santos CDP. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25(1): 3-17. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016008>
- Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia* 2016; 112: 116-131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>
- Williams AR, Ramsay A, Hansen TV, Ropiak HM, Mejer H, Nejsun P, et al. Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A-and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Sci Rep* 2015; 5(1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep14791>
- Wu W, Li S, Yang M, Lin Y, Zheng K, Akutse KS. Citronellal perception and transmission by *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) females. *Sci Rep* 2020; 10(1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75782-3>
- Zajac AM, Garza J. Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2020; 36(1): 73-87. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.005>

ANEXO A

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Revista Brasileira de
Parasitologia Veterinária
Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

**Biological activity of cinnamaldehyde and citronellal
compounds on *Haemonchus contortus* isolates with
differing resistance and susceptibility to anthelmintics**

Journal:	<i>Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Article
Keyword:	cinnamaldehyde, citronelal, <i>Haemonchus contortus</i> , anthelmintic resistance

SCHOLARONE™
Manuscripts