

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



DISSERTAÇÃO

ATIVIDADE OVICIDA *in vitro* DO ÓLEO DE *Helianthus annuus* L. E *Cuminum*
cuminum L. SOBRE *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)

MARIA ANTONIETA MACHADO PEREIRA DA SILVA

Pelotas, 2016

MARIA ANTONIETA MACHADO PEREIRA DA SILVA

ATIVIDADE OVICIDA *in vitro* DO ÓLEO DE *Helianthus annuus* L. E *Cuminum*
cuminum L SOBRE *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências (área do
conhecimento: Bioquímica e
Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia da Silva Nascente

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne

Pelotas, 2016

Maria Antonieta Pereira Machado da Silva

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586a Silva, Maria Antonieta Machado Pereira da
 Atividade ovicida *in vitro* do óleo de *Helianthus annuus* L. e
 Cuminum cyminum L. sobre *Fasciola hepática* (Linnaeus,
 1758) / Maria Antonieta Machado Pereira da Silva. – 61f. : il. –
 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bi-
 oquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas.
 Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos,
 2016. – Orientadora Patrícia da Silva Nascente ; coorientado-
 ra Maria Elisabeth Aires Berne.

1.Girassol. 2.Cominho. 3.Fasciolose. 4.Fitoterápicos.
5.Óleos vegetais I.Nascente, Patrícia da Silva. II.Berne, Maria
Elisabeth Aires. III.Título.

CDD: 665.3

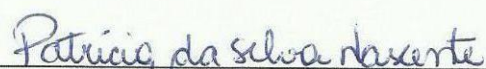
ATIVIDADE OVICIDA *in vitro* DOS ÓLEOS DE *Helianthus annuus* L. E

Cuminum cyminum L SOBRE *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 08 de setembro de 2016

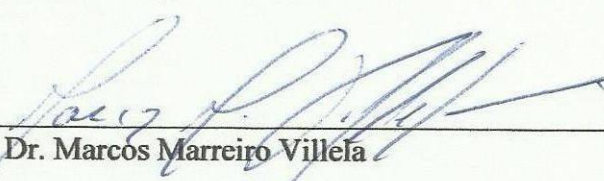
Banca examinadora:



Prof.ª Dra. Patrícia da Silva Nascente (Orientadora)

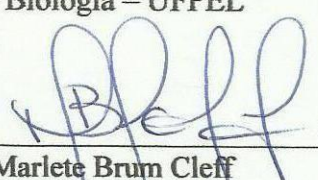
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biologia – UFPEL


Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela

Doutor em Ciências da Saúde – Doenças Parasitárias pelo Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ

Instituto de Biologia – UFPEL


Prof.ª Dra. Marlete Brum Cleff

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Veterinária – UFPEL

Ofereço

Ao meu marido Ezequiel.

Aos meus filhos, Ricardo e Renata.

Aos meus pais, Jorge e Rute,

por todo o amor, carinho, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e por toda a força recebida durante essa caminhada em busca do crescimento profissional.

À minha família, pela compreensão durante tantos momentos de ausência. Amo demais vocês.

À minha irmã, Carmen Lúcia pelo carinho e preocupação comigo, você é mais que irmã, é minha amiga.

Aos meus sobrinhos Wagner e Anderson, pelo carinho. Vocês são como filhos.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Patrícia da Silva Nascente pela oportunidade, orientação e confiança na realização desse trabalho. Foi muito bom este convívio.

À amiga e coorientadora Prof.^a Dr.^a Maria Elisabeth Aires Berne pelo carinho, incentivo e ensinamentos durante essa trajetória. Obrigada pelo apoio com sua experiência profissional, sem dúvida foi essencial.

Ao Prof. Dr.^o Cláudio Martin Pereira de Pereira, por disponibilizar o Laboratório para a extração do óleo fixo.

Ao Prof. Dr.^o Rogério Antonio Freitag, por disponibilizar o Laboratório para a extração do óleo essencial.

Ao Prof. Dr. ^o Marcos Marreiro Villela, pela disposição em participar da minha banca examinadora. Meu muito obrigado.

A prof.^a Dr.^a Marlete Brum Cleff, pela disposição em participar da minha banca examinadora. Meu muito obrigado.

Aos alunos Jéssica, Bruna e Lucas do Laboratório de Lipodômica e Biorgânica (UFPEL), por terem realizado a extração do óleo fixo e análise cromatográfica do óleo fixo.

À amiga Ivandra por ter realizado a extração e cromatografia do óleo essencial e por toda a ajuda.

Ao secretário do PPGBBIO-UFPEL Christian Manetti Geisler pela sua eficiência e atenção.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP) do Instituto de Biologia da UFPEL (IB), pelo incentivo e amizade.

Aos Pós-Graduandos do programa de Pós- graduação em Parasitologia do DEMP IB da UFPEL pelo carinho e motivação.

Aos Pós-Graduandos do programa de Pós- graduação em Entomologia da UFPEL pelo carinho e motivação.

Aos colegas e amigos Enilton, Ademir, Luis, Jerônimo, Elza, Cláudio, Josi, pela amizade, apoio e disposição em ajudar sempre que necessário.

Aos amigos Marcos, Carol, José Inácio pelo apoio na obtenção das amostras de fígados infectados. A ajuda de vocês foi essencial.

Á amiga Rosaria sempre disposta a ajudar na realização dessa pesquisa. Obrigada de coração.

Á amiga Karine, por toda ajuda na realização desse trabalho. Meu reconhecimento e gratidão.

Á colega de mestrado e amiga Fabiane pelo companheirismo, incentivo para realizar o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção e auxílio no desenvolvimento desse estudo.

Ao amigo Cristian pela motivação recebida.

As amigas Tatiana e Fabiana pela disposição em ajudar sempre que precisei. Vocês são merecedoras do meu agradecimento.

Ao amigo Tiago, pelo incentivo no começo dessa evolução profissional.

Á amiga Michele pelo incentivo e motivação.

Á amiga Vera, pela motivação e carinho. Agradeço de coração.

A professora Silvia e funcionária Laura do Laboratório de Virologia e Cultivo Celular – Faculdade de Veterinária/UFPEL, por terem realizado a análise de citotoxicidade dos óleos utilizados nesta pesquisa.

Ao Programa de Pós- graduação em Bioquímica e Bioprospecção, pela oportunidade da realização do mestrado.

Á Universidade Federal de Pelotas.

Em fim, agradeço a todos que contribuíram para realização dessa etapa de crescimento profissional sem dúvida todos ocupam um lugar no meu coração. Infinitamente OBRIGADA!

Resumo

SILVA, Maria Antonieta Machado Pereira. **Atividade ovicida *in vitro* dos óleos de *Helianthus annuus* L e de *Cuminum cyminum* L sobre *Fasciola hepatica*.** 2016. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas.

O trematódeo *Fasciola hepatica* é responsável por elevadas perdas econômicas a pecuária brasileira e mundial. Pode acometer mamíferos em geral, porém os bovinos, ovinos e caprinos são os principais hospedeiros definitivos, podendo acidentalmente infectar o homem. A forma de controle mais utilizada tem sido através de anti-helmínticos sintéticos, aos quais já tem mostrado resistência e somando-se a isso há possibilidade de resíduos destes fármacos em produtos como carne e leite, o que tem se tornando uma preocupação mundial. A busca de alternativas como produtos derivados de plantas com atividade biológica no controle dos parasitos, tem se mostrado promissor, com a possibilidade de inibir os mesmos em alguma de suas fases do ciclo de vida. Em vista disto, este estudo teve como objetivos avaliar a composição química e a ação ovicida *in vitro* de óleo fixo de *Helianthus annuus* L. (OFH) e do óleo essencial de *Cuminum cyminum* L. (OEC), bem como o possível sinergismo entre OFH e OEC, sobre ovos de *F. hepatica* e suas respectivas citotoxicidades. A ação ovicida foi avaliada através de testes *in vitro* de desenvolvimento e de eclodibilidade larval. Para isto, formas adultas de *F. hepatica* foram obtidas de fígados parasitados para obtenção de ovos, que foram expostos a concentrações de 0,25% a 0,0005% de cada um dos óleos avaliados. O ensaio foi acompanhado de um controle negativo (água), controle positivo (Tiabendazol 0,025mg/ml). A identificação dos compostos químicos majoritários foi efetuada por cromatografia gasosa. A citotoxicidade dos óleos foi testada em linhagem de células MDBK (*Madin-Darby-Bovine-Kidney*) pelo método MTT. Foram identificados como compostos majoritários do OFH os ácidos graxos insaturados linoleico (53,6%) e oleico (35,85%), e os compostos fito químicos majoritários do OEC foram o Cumaldehyde (26,8%) e o 2-Caren 10-al (22,17%). O OEC na concentração de 0,03mg/mL e a combinação entre o OFH + OEC na concentração de 0,035mg/mL+ 0,03mg/mL apresentaram uma eficácia de 99% (± 1) e 98 % (± 1) respectivamente, e o OFH foi insuficientemente ativo como ovicida. Nestas concentrações a viabilidade celular foi de 93% e 85% respectivamente e ainda na concentração de 0,015mg/mL o OEC foi eficaz 97% e preservou 99% de células viáveis. Diante do exposto pode-se inferir que OEC poderá ser promissor como uma nova alternativa no controle da fasciolose.

Palavras-chave: Girassol, cominho, fasciolose, fitoterápicos, óleos vegetais.

Abstract

SILVA, Maria Antonieta Machado Pereira. **Ovicidal activity *in vitro* of *Helianthus annuus* L. and *Cuminum cyminum* L. oils in *Fasciola hepatica*.** 2016. 61f. Dissertation (Master's Degree) - Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas

The trematode *Fasciola hepatica* is responsible for high economic losses to Brazilian and world livestock. It affects mammals in general, but cattle, sheep and goats are the main definitive hosts and it can accidentally infect humans. The most commonly used form of control has been through synthetic anthelmintic, which has been shown resistance and adding to it there is the possibility residues of these agents in products such as meat and milk, which has become a worldwide concern. The search for alternatives as plant derived products with biological activity in the control of parasites has shown promise with the possibility to inhibit them at some stages of its life cycle. In view of this, this study aimed to evaluate the ovicidal activity *in vitro* of fixed oil of *Helianthus annuus* L. (OFH) and essential oil of *Cuminum cyminum* L. (OEC) and the possible synergism between OFH and OEC on *F. hepatica* eggs and their cytotoxicity. The evaluate chemical composition and the ovicidal activity was evaluated *in vitro* by development and larval hatchability. For this, adult forms of *F. hepatica* were obtained from the infected livers for obtaining eggs which were exposed to concentrations of 0.25% to 0.0005% for each of the oils evaluated. The assay was accompanied by a negative control (water) and a positive control (Thiabendazole 0.025mg/ml). The identification of the major chemical compounds was performed by gas chromatography. The cytotoxicity of the oils was tested on lineage MDBK cells (Madin-Darby-Bovine Kidney) by MTT method. Were identified as the major compounds of OFH the unsaturated fatty acids linoleic (53.6%), and oleic (35.85%), and photochemical major compounds of OEC were Cumaldehyde (26.8%) and 2-Caren 10-al (22.17%). The OEC at a concentration of 0.03 mg/ml and the combination of OFH + OEC at a concentration of 0.035 mg/ml + 0.03 mg/ml showed efficacy of 99% (± 1) and 98% (± 1) respectively, and OFH was insufficiently active as ovicidal. At these concentrations cell viability was 93% and 85% respectively and also in the concentration of 0.015mg/ml OEC was 97% effective, and preserved 99% of viable cells. Given the above it can be inferred that OEC may be promising as a new alternative in the control of fascioliasis.

Keywords: Sunflower, cumin, fascioliasis, phytotherapics , vegetable oils.

Lista de Figuras

Figura 1	Médias de percentagem de eclosão dos ovos de <i>Fasciola hepatica</i> submetidos a diferentes concentrações do óleo Fixo de <i>Helianthus annuus</i> L. (OFH), óleo essencial de <i>Cuminum cyminum</i> L. (OEC) e da combinação de OFH +OEC.....	39
----------	---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Identificação e concentração de compostos fito químicos do óleo essencial de <i>Cuminum cyminum</i> L. por cromatografia gasosa.....	37
Tabela 2	Identificação e concentração de ácidos Graxos encontrados no óleo fixo de <i>Helianthus annuus</i> L. por cromatografia gasosa	37
Tabela 3	Percentual de viabilidade das células MDBK (<i>Madin-Darby-Bovine-Kidney</i>) frente a diferentes concentrações do óleo fixo (OFH) de <i>H. annuus</i> L., óleo essencial (OEC) de <i>C. cyminum</i> L. e a combinação de óleo fixo(OFH) de <i>H. annuus</i> L.+ óleo essencial(OEC) de <i>C.cyminum</i> L.....	40

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	OBJETIVOS	15
	Objetivo geral.....	15
	Objetivos específicos	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
	<i>Fasciola hepatica</i>	17
	Hospedeiro Intermediário (<i>Lymnaea</i>)	18
	Fasciolose.....	19
	Controle e Tratamento da Fasciolose.....	20
	Potencialidades de Produtos extraídos das plantas	22
	<i>Helianthus annuus</i> L.(Girassol).....	23
	<i>Cuminum cyminum</i> L.(Cominho)	24
	Óleos de origem vegetal.....	24
4.	ARTIGO	28
5.	CONCLUSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO.....	61

1. INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma enfermidade causada pelo trematódeo *Fasciola* spp. de grande importância à pecuária brasileira e mundial, decorrentes dos prejuízos causados, como queda na produção de carne, leite, lã, redução no ganho de peso, comprometimento da fertilidade, atraso no crescimento e elevadas perdas econômicas devido à condenação dos fígados infectados e à mortalidade de animais (ARAÚJO et al., 2007; DUTRA et al., 2010). As duas espécies mais importantes epidemiologicamente são a *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) encontrada predominantemente em regiões de clima temperado e nas Américas, sendo a única espécie de ocorrência comprovada no Brasil, e *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1855), que coexiste com *F. hepatica* e se localiza em regiões tropicais da África e Ásia (SERRA-FREIRE, 1995; SOLIMAN, 2008).

Em 2014 foi realizado um levantamento de dados georreferenciados da prevalência de *Fasciola hepatica* em bovinos, através de coletas e mapeamento em todo o território brasileiro. As informações foram obtidas de 1032 municípios, onde fígados de bovinos foram condenados devido à fasciolose pelo Serviço de Inspeção Federal (MAPA/SIF). Neste estudo onze estados foram representados (Pará, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). A prevalência mais alta foi observada nos estados do sul, com ocorrência de focos ao longo do litoral do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BENNEMA et al., 2014).

A fasciolose é uma zoonose, casos humanos foram notificados no sul, centro-oeste, sudeste, nordeste e regiões do norte, com o maior número de casos no sul e região Sudeste, do Brasil (OLIVEIRA et al., 2007; GUIMARÃES, 2012). No ano de 2007, em Porto Alegre, RS, foi relatado o caso de um paciente, do qual foram retirados, da vesícula biliar, 25 espécimes de *Fasciola hepatica* (CORAL et al., 2007). Casos de fasciolose em humanos, também são descritos em países como Chile, Peru, África, geralmente em pacientes que moram na zona rural e possuem hábitos de consumirem hortaliças e água não tratada (ESPINOZA, 2010; ESCALONA et al., 2012; NOEL et al., 2013; GIL et al., 2014).

O aumento da dispersão geográfica de *F. hepatica* no Brasil ocorre devido ao comércio e transferência de animais parasitados de áreas onde a doença é enzoótica, para áreas livres, mas que possuem condições epidemiológicas favoráveis. Essas

condições favoráveis referem-se à presença de moluscos do gênero *Lymnaea*, que são hospedeiros intermediários de *F. hepatica*, bem como os fatores climáticos e ambientais que fornecem um habitat apropriado para esses moluscos, tais como alta umidade e temperatura adequada (LIMA et al., 2009; ALVES et al., 2011; MARTINS et al., 2014).

A presença do hospedeiro definitivo eliminando ovos e contaminando as pastagens, constituem aspectos importantes para a epidemiologia e controle da fasciolose (ALVES et al., 2011; ALMEIDA et al., 2016). O Controle desta parasitose em bovinos, ovinos e caprinos é baseado principalmente no tratamento com anti-helmínticos (bithionol, niclofolan, albendazole, ivermectina, clorsulon, nitroxinil, closantel, rafoxanide e triclabendazole), os quais esse trematódeo tem mostrado resistência, que se caracteriza como uma mudança genética na capacidade do parasita de sobreviver a tratamentos nas doses recomendadas da droga, após administrações repetidas (Cavalcante et al., 2009). Este fenômeno se faz presente, constituindo uma preocupação mundial (OLAECHEA et al., 2011; GORDON et al., 2012; ORTIZ et al., 2013; BROCKWELL et al., 2014).

Outro aspecto relevante é a presença de resíduos em produtos derivados como carne e leite, provocada pelo uso de anti-helmínticos e o impacto no meio ambiente, como demonstrado pela meia vida de ivermectina no solo que pode atingir de 91 e 217 dias no inverno e entre sete e 14 dias no verão (ALMEIDA; AYRES, 2014). Como alternativa, estudos realizados com derivados de plantas mostram efeitos diretos sobre os endoparasitos, ou indiretos, influenciando alguns mecanismos regulatórios dos hospedeiros. Os componentes sulfurados, polifenólicos, terpenóides e óleos essenciais são derivados de plantas apontados como os responsáveis pela atividade anti-helmíntica (BRITO et al., 2009; ANDRADE et al., 2014). Desta forma, a busca de alternativas naturais se faz necessárias a fim de minimizar o uso intensivo dos anti-helmínticos sintéticos (ALMEIDA; AYRES, 2014).

Entre os métodos alternativos com resultados promissores de controle de parasitos em animais, destaca-se o uso de óleos essenciais (CARVALHO et al., 2005; MOREIRA et al., 2016), extraído de plantas, as quais o Brasil apresenta a maior diversidade do planeta (KLEIN et al., 2010).

Entretanto em relação à atividade parasitária de óleos de origem vegetal sobre ovos do helminto *F. hepatica*, os relatos são escassos na literatura nacional e internacional, encontra-se estudos que avaliaram a ação *in vitro* de extratos vegetais de diferentes plantas (FERREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2016;

(SINGH;SINGH,2016). Diante deste contexto, o presente estudo busca identificar atividade antiparasitária do óleo de semente de *Helianthus annuus* L. e de *Cuminum cyminum* L a fim de buscar uma alternativa sustentável de controle para esse trematódeo.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Conhecer o potencial ovicida dos óleos de *Helianthus annuus* L e de *Cuminum cyminum* sobre *F. hepatica*.

Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade ovicida *in vitro* do óleo fixo de *Helianthus annuus* L sobre *F. hepatica*;
- Avaliar a atividade ovicida *in vitro* do óleo essencial de *Cuminum cyminum* sobre *F. hepatica*;
- Avaliar *in vitro* o sinergismo do óleo fixo e óleo essencial sobre *F. hepatica*;
- Verificar a citotoxicidade dos óleos em linhagem celular de rim bovino (MDBK);
- Verificar a composição química dos óleos avaliados;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fasciola hepatica

O helminto *Fasciola* spp. é um trematódeo hepático que pertence ao filo Platyhelminthes, à classe Trematoda, à subclasse Digenea e à família Fasciolidae (URQUHART et al., 1998).

Fasciola hepatica, conhecida popularmente como “baratinha do fígado” ou “saiguapé”, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em quase todos os países do mundo, nas áreas úmidas, alagadiças ou sujeitas a inundações periódicas (SILVA et al., 1980).

Na fase jovem se localizam no parênquima hepático e na adulta nos ductos biliares de ovinos, bovinos, caprinos, suínos, equinos e mamíferos em geral, inclusive o homem. Também podem parasitar animais silvestres como ratões do banhado, capivaras, lebres e cervos, que podem atuar como reservatórios e disseminadores dessa helmintose (MÜLLER, 2007).

Morfologicamente as formas jovens (imaturas) possuem 1 a 2 mm de comprimento e formato de lanceta, enquanto os adultos adquirem formato de folha, medindo de 2- 3 cm de comprimento por 1- 1,5 cm de largura. Apresentam duas ventosas (oral e ventral), cone cefálico na extremidade anterior do corpo, são hermafroditas, ovíparos, seus ovos medem cerca de 150µm de comprimento por 90µm de largura, elípticos, amarelados e revestidos por uma membrana delgada, que apresenta um opérculo na extremidade (BORAY, 1985). Dentro do ovo se desenvolve uma forma ciliada denominada miracídio, este mede aproximadamente o mesmo comprimento dos ovos (130 µm), e têm seu tegumento recoberto por cílios, são mais largos na porção anterior e afilados na posterior.

O ciclo biológico é do tipo heteroxênico, uma vez que necessita de hospedeiro intermediário; moluscos de água doce representados no Brasil por *L. columella* e *L. viatrix* e de hospedeiro definitivo (mamíferos em geral). As formas adultas de *F. hepatica* localizam-se nos ductos biliares do hospedeiro definitivo, produzem ovos que com a bile são levados para o intestino, de onde são eliminados com as fezes. Os ovos possuem uma massa de células que, encontrando condições favoráveis no ambiente dão origem aos miracídios estes saem dos ovos, quando entram em contato com a água e

estimulados pela luz solar penetram no molusco (*Lymnaea*), onde se transformam em esporocisto (cada miracídio forma um esporocisto que dará origem a várias rédias - 5 a 8), até evoluir à fase de cercária (cada molusco libera em média 6 a 8 cercárias por dia). Observações demonstraram que cada miracídio é capaz de produzir 225 cercárias, essas abandonam o caramujo e procuram plantas para se aderirem e se transformarem em metacercárias (forma infectante) (BORAY, 1969 ;SILVA et al., 1980).

Dependendo das condições ambientais favoráveis o período da penetração do miracídio no hospedeiro intermediário até a formação de metacercárias infectantes varia de 6 a 8 semanas. Cada *Fasciola* elimina em média 10.000 ovos por dia e o ciclo leva 17 a 18 semanas (MÜLLER et al., 1999; ECHEVARRIA, 2004).

Os hospedeiros definitivos infectam-se quando se alimentam dessa vegetação aquática contaminada com metacercárias, o homem infecta-se geralmente ao consumir agrião ou outras hortaliças. Um ponto essencial no ciclo evolutivo desse trematoda é que um ovo pode desenvolver-se e gerar centenas de adultos, isto se deve ao fenômeno conhecido como pedogênese no hospedeiro intermediário, ou seja uma única forma larval pode produzir vários indivíduos (GUIMARÃES, 2012).

Hospedeiro Intermediário (*Lymnaea*)

Os moluscos do gênero *Lymnaea* são caramujos de água doce que habitam locais úmidos, lodosos e dependendo da espécie, vivem em águas rasas de pouca correnteza. São hermafroditas e possuem um elevado potencial biótico, chegando apenas um exemplar a produzir 100.000 indivíduos. Apresentam concha cônica e dextrogiro, cuja característica auxilia na identificação a campo. São resistentes à seca, permanecendo nesse período no interior do solo, liberando as cercárias quando existe disponibilidade de água no ambiente (RADOSTITS et al., 2002; MÜLLER, 2007).

Como profilaxia no controle dos caramujos, utiliza-se o controle químico onde mais de 7.000 produtos químicos já foram testados como moluscicidas. O mais usado até hoje é a niclosamida. Embora este produto seja inócuo para os animais de sangue quente nas concentrações recomendadas, é tóxico para inúmeros organismos aquáticos, como peixes, larvas de insetos, fitoplâncton, etc. (MINISTÉRIO da SAÚDE, 2008). Além disso, a utilização de substâncias moluscicidas no controle de moluscos hospedeiros intermediários, deixam resíduos causando depreciação ao meio ambiente, como também a contaminação de extensas áreas, constituindo um problema de

contaminação ambiental (CANTANHEDE et al., 2010) podendo provocar um desequilíbrio para o ecossistema (GASPAROTTO JR. et al., 2005).

De acordo com Silva et.al. (2008) existe a preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos às substâncias químicas utilizadas com ação moluscicida, com a baixa seletividade que apresentam no meio ambiente. Como alternativa de controle, algumas pesquisas vêm sendo realizadas com produtos naturais.

Estudo com a planta *Euphorbia splendens* var. *Hislopilii* (“coroa-de-Cristo”), demonstrou, que o seu látex apresenta ação letal, em baixas concentrações, sobre os moluscos: *Biomphalaria glabrata*, *L. columela*, mostrando-se promissora no controle desses hospedeiros intermediários (ARAÚJO et al., 2002, MELLO-SILVA et al., 2006).

Segundo Almeida et al. (2010), extratos de nim, cinamomo e citronela foram testados como possíveis agentes moluscicidas, os quais demonstraram eficazes ao serem empregados no controle de *L. columella*.

Fasciolose

A fasciolose é uma parasitose que têm como agentes etiológicos *F. hepatica* ou *F. gigantica*, que acomete fígado e vias biliares de muitas espécies de animais mamíferos, inclusive o homem, sendo considerada um problema de saúde pública em muitas regiões tropicais e subtropicais (MARCOS et al., 2007 ; ESPINOZA, 2010).

Esta parasitose se faz presente em todos os continentes, exceto na Antártica. É considerada emergente ou re-emergente em várias regiões da América Latina, África, Europa e Ásia tanto em animais como em humanos, fenômeno atribuído em parte às mudanças climáticas (ROBISON & DALTON, 2009; VALERO et al., 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera essa doença uma zoonose tropical emergente e negligenciada, e estima que pelo menos 2,4 milhões de pessoas estão infectadas em mais de 70 países em todo o mundo e vários milhões em situação de risco. Nenhum continente está livre de fasciolose, e é provável que, quando casos em animais são relatados existam também casos humanos. (Organização Mundial da Saúde, 2010) Está dentro das doenças consideradas negligenciadas (WHO | Neglected tropical diseases, 2014) e por vezes na maior parte dos países a fasciolose está sub-diagnosticada (ASHRAFI et al., 2015).

Além de constituir uma zoonose, representa um sério problema para a criação de bovinos e ovinos, causando prejuízos e gastos no controle da parasitose. Os prejuízos

econômicos à pecuária mundial são superiores a três bilhões de dólares, devido a diminuição da produtividade, como queda na produção de leite, carne e lã, diminuição de fertilidade, bem como numerosas condenações de fígados em matadouros frigoríficos e por vezes a morte dos animais (TOSTES et al., 2004; MAS-COMA et al., 2005, 2009; DUTRA et al., 2010).

No Brasil, ocorrências deste parasito foram relatadas nas regiões centro-oeste, nordeste, sudeste e do sul, parasitando bovinos, ovinos, bubalinos e animais selvagens, como capivaras (CUNHA et al., 2007; BELLATO et al., 2009; LIMA et al., 2009; CARNEIRO et al., 2010; BENNEMA et al., 2014).

A patogenia dessa doença caracteriza-se por processo inflamatório do fígado e ductos biliares, apresentando-se de duas formas: aguda ou crônica. A forma aguda ocorre quando formas imaturas migram no parênquima hepático ocasionando sua destruição, insuficiência hepática e hemorragia na cavidade peritoneal. A forma crônica é o resultado da ação dos trematódeos adultos nos ductos biliares, devido à migração, causam inflamação, edema e fibrose dos ductos biliares. Além disso, pode haver distensão, espessamento e calcificação destes, o que caracteriza a cirrose biliar progressiva (ADRIEN et al., 2013; TESSELE et al., 2013).

O diagnóstico em animais baseia-se na sintomatologia clínica, na ocorrência sazonal, nos tipos de climas prevalentes e em história prévia de fasciolose na propriedade ou de identificação de habitats dos moluscos. O diagnóstico clínico desta doença, poderá se tornar difícil, devido os sinais clínicos não serem específicos (como perda de peso, palidez das mucosas, apatia, tremores musculares e salivação), podendo ser confundida com outras doenças parasitárias. O diagnóstico de certeza está baseado no exame coprológico e ou necropsia, podendo ser associado a determinação de enzimas hepáticas e provas imunológicas (ROJO-VÁZQUEZ et al., 2012; FISS et al., 2013)

Em humanos o diagnóstico é difícil, podendo ser realizado exame laboratorial a procura ovos nas fezes ou na bile, entretanto, o resultado poderá dar um falso negativo, pois a produção de ovos no homem é pequena mesmo com a presença do parasito. O diagnóstico sorológico através da técnica de ELISA é o mais indicado, entretanto por possuir alta sensibilidade e baixa especificidade a técnica de imunoblot também vem sendo utilizada na medicina humana, como apoio diagnóstico clínico e teste confirmatório (ESCALANTE et al., 2011; GUIMARÃES, 2012).

Controle e Tratamento da Fasciolose

Segundo Müller et al. (2007), a eficiência do controle da fasciolose depende da realização das seguintes medidas, redução das infecções nos hospedeiros definitivos, principalmente bovinos e ovinos, através de tratamentos com fasciolicidas, redução da população de hospedeiros intermediários (*Lymnaea*), por métodos químicos, físicos e biológicos e evitar a coincidência hospedeiro-parasito pelo manejo.

O controle de helmintos praticamente baseia-se na utilização de anti-helmínticos sintéticos. Antes do desenvolvimento de compostos orgânicos sintéticos, utilizavam-se no tratamento das helmintoses, substâncias naturais como óleo de quenopódio, santonina e papaína. Um dos primeiros anti-helmínticos sintéticos utilizados foi o sulfato de cobre, seguido mais tarde, pelo tetracloreto de carbono, para tratar a *F. hepatica* em 1926. Foi em 1960 que foram descobertos os anti-helmínticos com amplo espectro de atividade, maior eficácia e menor toxicidade (ALMEIDA; AYRES, 2014).

A W.A.A.V.P (World Association for the advancement of Veterinary Parasitology) classifica os produtos para controle de nematoides, trematóides e cestoides, como altamente eficaz (mais de 98%), eficazes (90-98%), moderadamente eficazes (80-89%) ou insuficiente ativo (menos de 80%) (WOOD et al., 1995).

A associação de medicamentos como: clorsulon+ivermectina e albendazol, vem sendo utilizados no tratamento dos animais com resultados razoáveis, entretanto o triclabendazol é o que apresenta os melhores resultados, e a dose ótima de um anti-helmíntico, determinada por um fabricante, é aquela necessária à eliminação de uma alta proporção (mais de 95%) de parasitos adultos, com a devida segurança para os hospedeiros (ALMEIDA; AYRES, 2014).

Em humanos o tratamento requer cuidado devido à toxidez dos medicamentos e possíveis complicações. Os medicamentos em uso são bithionol, deidrometina e albendazol (GUIMARÃES, 2012), e também o triclabendazol (GIL et al., 2014).

O triclabendazol (TCBZ) é um derivado de benzimidazol, e vem se apresentando como o fármaco de eleição para o tratamento de infecções de parasitos do fígado em animais há mais de 20 anos (FAIRWEATHER et al., 2012; ALMEIDA; AYRES, 2014).

O TCBZ tem alta eficácia contra ambas às formas adultos e formas imaturas, entretanto o uso excessivo e em doses inadequadas, deu origem a populações de *F. hepatica* resistentes a este fármaco. O primeiro relato de resistência ao TCBZ foi

descrito em 1990 na Austrália e depois foram detectadas populações resistentes na Irlanda, Reino Unido, Países Baixos, Espanha (BRENNAN et al., 2007). Também, existem relatos de resistência aos anti-helmínticos, triclabendazol e albendazol (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2006).

Um avanço ou alternativa adicional no controle da fasciolose animal seria o desenvolvimento de vacinas. Müller et al. (2007) refere-se a investigações para o desenvolvimento da vacina contra esse trematoda, através da utilização de extratos e produtos de excreção-secreção do parasito, metacercárias irradiadas e enzimas, porém sem os resultados esperados. Molina-Hernández et al. (2015) aponta que a vacinação seria uma estratégia de controle da fasciolose, em alternativa ao tratamento dos animais com fasciolicidas, visto resistência anti-helmínticos e também a preocupação de toda cadeia de produção, das autoridades sanitárias e dos consumidores, em relação à presença de resíduos químicos nos alimentos. Muitos avanços foram alcançados, entretanto não estão disponíveis no mercado, mantendo-se os anti-helmínticos como a opção mais utilizada no controle dessa parasitose.

Potencialidades de Produtos extraídos das plantas

Na história da humanidade as plantas medicinais foram muito utilizadas para o tratamento de enfermidades que acometiam os animais e o homem (GASBARRE et al., 2001; BARATA, 2005; CARNEIRO et al., 2014). Na área da parasitologia veterinária o uso de produtos de origem vegetal no controle dos parasitos de animais de produção e de companhia, tem se mostrado promissor, com a possibilidade de inibir os parasitos em alguma fase do ciclo de vida. Além disso, em relação a anti-helmínticos convencionais, esses produtos possuem baixo custo, menores efeitos colaterais e prolongam o aparecimento de resistência anti-helmíntica (NERY et al., 2009; SOUSA et al., 2013).

Algumas espécies de plantas são estudadas com o propósito de determinar as propriedades antiparasitárias sobre diferentes parasitos. Dentre as espécies estudadas tem-se *Tarenaya spinosa* (Capparaceae) sobre ovos de *Haemonchus contortus* (ANDRADE et al., 2014); *Feronia limonia* (Rutaceae) no controle de larvas de mosquitos *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (SENTHILKUMAR et al., 2013); *M. alternifolia* (Myrtaceae) sobre os protozoários *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (MIKUS et al., 2000) e seu potencial inseticida sobre *Lucilia cuprini* (CALLANDER; JAMES, 2012).

Nos estudos em trematódeos o relato encontrado avaliou a ação anti-helmíntica *in vitro* de extratos vegetais e não de óleos essenciais. Foram testados extratos alcoólicos de *Artemisia annua* L., *Asimina triloba* L. e *Artemisia absinthium* L., sobre formas adultas de *F. hepatica*. *Artemisia annua* na concentração de 2mg/ml matou este trematódeo entre 16 e 23 horas e o extrato de *A. triloba* L. em 40 horas, portanto apresentando potencial alternativo natural no controle da fasciolose (FERREIRA et al., 2011).

Também, recentemente pesquisadores testaram *in vitro* a ação anti-helmíntica da clorofilina, um derivado semi-sintético da clorofila, e suas formulações obtidas a partir de liofilizado de urina de vaca sobre rédias e cercárias (diferentes formas larvais) desenvolvidas de *F. gingantica*. Esse estudo mostrou que as formulações de clorofilina poderão ser usadas como potentes larvicidas contra formas larvais que ocorrem no ciclo desse trematódeo.(SINGH and SINGH, 2016)

Helianthus annuus L.(Girassol)

É uma planta que apresenta a seguinte classificação botânica: Asterales (ordem), Asteraceae (família), *Helianthus* L. (gênero) e *Helianthus annuus* L. (espécie). O gênero *Helianthus* deriva do grego *helios*, que significa sol, e de *anthus*, que significa flor, ou “flor do sol” que gira seguindo o movimento do sol (LEITE et al., 2005).

Os primeiros cultivos comerciais ocorreram no Rio Grande do Sul, porém não obtiveram sucesso, pela falta de adaptação dos cultivares e competição com a área de soja (GAZZOLA et al., 2011).

A produção mundial de óleo de girassol para a safra 2015/16 deverá ser da ordem de 15,1 milhões de toneladas (CONAB, 2016). O maior produtor é a Ucrânia, com uma produção de 4,6 milhões de toneladas, produzindo 29% de todo o óleo de girassol no mundo. O segundo maior produtor em termos percentuais é a Rússia, com 25% da produção mundial. O maior consumidor é a União Europeia, sendo que o consumo mundial está previsto em 14,2 milhões de toneladas (CONAB, 2016). No Brasil, o cultivo do girassol ocupa área de aproximadamente 111,5 mil hectares, concentrado, principalmente, na região dos Cerrados (CONAB, 2016).

O fruto do girassol tem 24% de proteínas e 47,3% de óleo, sendo rico em ácido linoleico (Gazzola et al., 2011). Estudos mostram que o consumo de óleo de Girassol contribui para prevenção da arteriosclerose, reduz doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais e trombooses (MENSINK, 1995).

Cuminum cyminum L(Cominho)

Planta herbácea anual, pertence à família Apiaceae (Umbelíferas) de caule e ramos estriados, que apresentam folhas alternas, verde-escuras e flores alvas em umbrelas terminais. Os seus frutos também são denominados de sementes (frutos secos contendo a semente), com aproximadamente meio centímetro de comprimento de coloração cinza-amarelados e cobertos por uma fina penugem. É aromática, sendo utilizada na culinária como aromatizante, além de apresentar propriedades medicinais (VIEIRA, 1992). Originária da parte oriental da região mediterrânea e do Alto Egito, cultivada na Índia, Marrocos e outros países. Em Portugal é muito cultivada, principalmente no sul (CUNHA et al., 2003). As partes utilizadas são os frutos de onde é extraído o seu óleo essencial.

Possui atividade biológica com ação digestiva, antimicrobiana e ligeiramente sedativa. Sua principal indicação é como digestivo e carminativo (CUNHA et al., 2003). Na medicina apresenta ação carminativa para distúrbios estomacais e propriedades anti-espasmódicas (JANAHMADI et al., 2006). Os principais constituintes do óleo essencial dessa planta são o aldeído cumínico (25-35%), álcool cumínico, alfa-terpinol, hidrocarbonetos monoterpenicos (alfa pineno, beta pineno, canfeno); flavonoides (derivados do luteolol e do apigenol); óleo gordo (10 a 15%) e substâncias proteicas (15 a 20%) (CUNHA et al., 2003).

Óleos de origem vegetal

Os óleos vegetais são extraídos de diversas partes de vegetais como folhas, caules e sementes. Dividem-se em óleos fixos (O.F.) e óleos voláteis (O.V.). Os O.V. também conhecidos como óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, são misturas de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes. A ISO (International Standard Organization) define O.V. como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor de água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae) (SANTOS, 2010).

Os O.V. são produtos do metabolismo secundário e caracterizam-se por misturas complexas, voláteis, geralmente odoríferas. Fisicamente, se apresentam no estado líquido a temperatura ambiente, com aspecto incolor ou ligeiramente amarelado, não são muito estáveis. Sua principal característica é a volatilidade o que os difere dos óleos fixos (SANTOS, 2010).

A composição química da maioria dos O.V. é constituída de derivados fenilpropanóides . Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. O ácido chiquímico é um dos intermediários envolvidos no metabolismo da glicose, este ácido origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólicos secundários (SANTOS, 2010).

Os terpenos são obtidos quando o mevalonato é convertido em pentenil-pirofosfato, ou isopreno ativo, a unidade básica na formação dos terpenos. Os mono e sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem as misturas chamadas de O.V. (SANTOS, 2010).

Ao conjunto de reações químicas que continuamente ocorrem em cada célula, dá-se o nome metabolismo. São classificadas em metabolismo primário ou secundário, entretanto as reações bioquímicas não ocorrem independentemente, portanto a linha que divide metabolismo primário e secundário não é nítida (SANTOS, 2010).

Os processos metabólicos envolvendo macromoléculas (carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) são considerados essenciais aos seres vivos, e definidos como processos do metabolismo primário, porém os vegetais apresentam um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) que são capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo que as produzem, a este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário. Durante muito tempo, os metabólicos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes, sabe-se que muitas dessas substâncias apresentam importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e perfumaria, entre outras (SANTOS, 2010).

Atualmente, o homem pode isolar dos vegetais compostos e moléculas com potencial farmacológico, tais como taninos, flavonoides, fenóis, alcaloides, terpenoides, entre outros e os óleos essenciais (REIS et al., 2006; VELOSO et al., 2012).

Os métodos de extração do O.V. variam conforme a localização do mesmo na planta e com a proposta de sua utilização. A extração é processada de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos (SANTOS, 2010).

São utilizados como flavorizantes, na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por

substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente sobre micro-organismos (TRAJANO et al., 2009). A atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) foi testada sobre *Candida albicans* (ATCC289065), *C. albicans* (ATCC40227), *C. krusei* (ATCC40147), *C. tropicalis* (ATCC40042) e *C. tropicalis* (ATCC13803), apresentando efetiva atividade (CAVALCANTI et al., 2011).

Os O.F. de origem vegetal são ésteres de ácidos e álcoois de cadeia longa, ou derivados a fins. Apresentam utilizações farmacológicas, industriais e nutricionais. São encontrados nos vegetais nas sementes dos mesmos e também no pericarpo de frutos como azeitona. Os mesmos são ricos em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (SANTOS, 2010).

Na farmacologia os óleos fixos, são utilizados como emolientes e veículo para outros medicamentos. Na indústria são usados na fabricação de sabão, lubrificantes, secativos de tintas e vernizes. Alguns óleos fixos possuem na sua composição química ácidos graxos essenciais ao funcionamento do organismo humano, como exemplos desses óleos fixos tem-se os óleos de girassol, de coco, de amendoim, de soja, de algodão, de gergelim e de amêndoas (SANTOS, 2010).

O rendimento obtido de sementes oleaginosas de girassol, prensados a frio fica em torno de 25 a 33% de óleo em relação ao peso inicial das sementes (OLIVEIRA; VIEIRA, 2004). Segundo Abdalla et al.; (2008), o teor de óleo no grão do girassol é de 42% quando extraído com solvente orgânico.

O uso combinado de subprodutos extraídos de plantas (óleos fixos e óleos essenciais) poderá ter ação sinérgica, alterando positivamente a atividade biológica. Os estudos indicam sinergismo entre fitoterápico e fármacos.

O sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas foi testado sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, isoladas de casos clínicos humanos. Os óleos que apresentaram melhores resultados foram o de capim cidreira, que mostrou sinergismo com oito drogas, seguido pelo óleo de hortelã com sete drogas (ZAGO et al., 2009).

Pesquisadores realizaram testes *in vitro* com o antibiótico gentamicina e óleos essenciais de (*Aniba rosaeodora*, *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, e *Pelargonium graveolens*) sobre cepas de bactérias onde foi demonstrado efeito sinérgico, inferindo que a utilização da gentamicina com esses óleos essenciais poderia

melhorar a eficácia antimicrobiana da gentamicina, bem como reduzir a dose utilizada e seus efeitos colaterais (ROSATO et al., 2010).

Também a eficácia antimicrobiana da combinação de óleos essenciais (orégano, manjerição e bergamota), foi avaliada frente a quatro micro-organismos relacionados com os alimentos e os resultados foram promissores (LV et al., 2011).

4. ARTIGO

Atividade ovicida *in vitro* de óleo fixo de *Helianthus annuus* L. e óleo essencial de
Cuminum cyminum L. sobre *Fasciola hepatica* ¹

¹ O manuscrito foi formatado segundo as normais gerais para publicação na revista “*International Journal For Parasitology: Drugs And Drug Resistance*”, porém as figuras e tabelas foram incluídas no texto para facilitar a leitura, não seguindo as normas do referido periódico.

Ovicidal activity of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. and the essential oil of *Cuminum cyminum* L. against *Fasciola hepatica* *in vitro*

Maria Antonieta Machado Pereira da Silva^{a*}, Fabiane Knepper Zehetmeyr. Fernandes^a,
Karine Massia Pereira^a, Rosaria Helena Machado^b, José Pablo Villarreal Villarreal^a,
Cláudio Martin Pereira de Pereira^c, Silvia de Oliveira Hubner^d, Rogério Antonio
Freitag^c, Maria Elisabeth Aires Berne^a, Patrícia da Silva Nascente^a.

^a Departamento of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal
University of Pelotas, Brazil. Building 18. Av. Eliseu Maciel S/N, Zip code: 96160-
000, Capão do Leão, RS, Brazil.

^b Plant Health Laboratory, Faculty Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas.

^c Chemical Sciences Center, Pharmaceutical and Food – Federal University of Pelotas.

^d Laboratory of Virology and Immunology – Federal University of Pelotas, Brazil.

e-mail: machadoantonieta@hotmail.com

Abstract

The fascioliasis is a parasitic disease of importance in veterinary medicine and public health. For this parasitosis, the treatment by synthetic fasciolicides is used and due to their intense use, they have been shown less effective, with the establishment of resistant *Fasciola hepatica* population to these drugs, with a global concern. The use of derived products of plants with biological activity has been showed promisor in the control of parasites. In this scenario, we evaluated the chemical composition and action ovicidal *in vitro* fixed oil of *Helianthus annuus* L. (FOH) and essential oil of *Cuminum cyminum* L. (EOC), as well as their combination (FOH + EOC) of *F. hepatica*. In the

assay *in vitro* of *F. hepatica* were submitted to different concentrations of oils being FOH (2.3 mg / ml + 0,017mg / ml); EOC (2.07mg / ml + 0,004mg / ml) and the combination (1.15mg / ml + 1.03mg / ml to 0,0085mg / ml + 0,008mg / ml) as well as a control positive thiabendazole (0.025 mg / mL) and a negative control with distilled water. The identification of the majority chemical compounds was performed by gas chromatography. The cytotoxicity of the oils was tested in MDBK cellular line by the MTT method. The majority compounds in the FOH were; the linoleic (53.6%) and oleic (35.85%) unsaturated fatty acids, and the majority phytochemicals compounds in the EOC were; the Cumaldehyde (26.8%) and the 2-Caren 10-al (22.17%). The EOC and the combination presented effectiveness of 99% (± 1) and of 94% (± 1) in the concentration of 0.03mg/mL and 0.035mg/mL+0.03 mg/mL, respectively, and the FOH was insufficiently active as ovicidal. The cell viability at this concentration of EOC was 93%. By the above it can be conclude that the evaluated EOC is promisor as a new alternative for the fascioliasis control.

Key words: Ovicidal action, fascioliasis, phytoterapics, herbal oils.

1. Introduction

The fascioliasis is an important parasitic infection in veterinary medicine and with zoonotic potential, by the direct damages caused in animals and elevated economic loses. Capable to infest humans characterizing a global public health problem, most of the time sub diagnose (Dutra et al., 2010; Noel et al., 2013; Bennema et al., 2014; Gil et al., 2014; Ashrafi et al., 2015).

Two species are described as the main responsible for the disease; *Fasciola hepatica* predominantly founded in regions of temperate weather and in America, and

50 *Fasciola gigantica* founded in tropical regions of Africa and Asia (Serra-Freire et al.,
51 1995; Soliman, 2008).

52 This parasite has a heteroxenous biological cycle, which means that he needs an
53 intermediate host, being *Lymnaea* spp. (Gastropoda: Lymnaeidae), ideal conditions such
54 as high humidity and temperature, as well as the definitive host presence (mammals in
55 general), who eliminates the eggs into the environment. Which are important aspects to
56 consider for the epidemiology and control of fasciolasis (Martins et al., 2014; Almeida
57 et al., 2016).

58 However, control is done with the use of synthetic anti-helminthic drugs such as;
59 closantel, nitroxylin, albendazole and triclabendazole, which are the drugs of choice for
60 the treatment of infections caused by liver parasites (Almeida and Ayres, 2014; Gil et
61 al., 2014).

62 The administration and indiscriminated drug use and in inadequate periods,
63 originates resistant populations. Anti-helminthic resistance is reported in Australia,
64 Europe and South America (Olaechea et al., 2011; Brockwell et al., 2014; Novobilský et
65 al., 2016). Other important aspect is the concern of the presence of chemical residuals in
66 derived products such as meat and milk and the environmental impact (Almeida and
67 Ayres, 2014). As an alternative, studies made with derivatives of plants showed
68 negative direct or indirect effects against endoparasites, being the sulfides, polyphenolic
69 and terpenoids compounds the responsible for the anti-helminthic activity (Brito et
70 al., 2009; Andrade et al., 2014).

71 The interest in studies with bioactive compounds has been growing, highlighting
72 the use of essential oils (Carvalho et al., 2005; Moreira et al., 2016). The fixed oils
73 found application in the pharmacology and in the industry. As examples of these fixed

oils are; the sun flower, coconut, peanut, soybean, cotton, sesame and almond oils (Santos, 2010).

In the parasitology area, studies showed the anti-parasite effect of the essential oils against different ecto and endo parasites (Farias et al., 2010; Gomes and Favero, 2011; Callander and James, 2012; Remédio et al., 2015). Studies evaluating the synergism between essential oils and antimicrobial agents presented promising results (Zago et al., 2009; Rosato et al., 2010).

Related to the anti-helminthic action of the EOC and FOH against the eggs of the trematode *Fasciola* spp., the reports are scarce. Studies that evaluated the *in vitro* effect of *Artemisia annua* L. extracts, *Asimina triloba* L. and *Artemisia absinthium* L. were performed by Ferreira et al (2011); and of *Momordica charantia* L. by Pereira et al (2016). And semi-synthetic chlorophyllin compound derived from *Spinacia oleracea* Singh, Singh (2016). Given this context the aim of this study was to evaluate the ovicidal activity *in vitro* in isolation of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. (FOH) and the essential oil of *Cuminum cyminum* L. (EOC) and their combination against eggs of *F. hepatica*.

2. Materials and methods

2.1 Collection of the livers and recuperation of the eggs of *F. hepatica*

The samples of the parasitized bovine livers with *F. hepatica* were obtained from different slaughterhouses, after inspection by the Municipal Inspection Service (MIS) from the city of Pelotas – RS, by the owners authorization. The livers were storage in plastic bags properly identified and send to the Laboratory of Parasitology of the DEMP (Department of Microbiology and Parasitology) from the IB (Institute of Biology) from the Federal University of Pelotas (UFPEL).

The eggs were recovered through the natural egg-laying obtaining technique, described by Ueno e Gonçalves (1998). After the process they were storage under refrigeration until, the development of the experiment.

2.2 Obtainment of the Fixed oils

The FOH was processed in the Laboratory of Lipidomics and Biorganic (LLB) from the Center of Chemical Science, Pharmaceutics and Food (CCQFA) of the Federal University of Pelotas (UFPel). The seeds used for the extraction of the oil were from the producer Argensun in Argentina. The process constituted in the milling in a Willey model B-602 cutting mill, and further drying in an oven at 45°C, followed extraction, where 50 g of the sample and 300 mL of hexane solvent were collocated in a Soxhlet apparatus at a temperature of 60°C for a 6-hour period. At the end of the process, the solvent was removed through a route evaporator and the oil storage in an amber bottle under refrigeration.

2.3 Obtainment of the essential oil

The EOC was processed in the Research Laboratory of Natural Products (LPPN) of the (CCQFA) of the UFPEL. The seeds were obtained from the food supplier Luar Sul RS, Brazil. The technique used for the of the oil's obtainment was based in the drag by water's vapor, using a Clevenger apparatus. Once that the volatile oil was obtained, it was separated from the water, dried with Na₂SO₄ sodium sulfate and storage in an amber bottle under refrigeration.

2.4 Chromatographic analyses of the oils

Essential oil

The essential oil identification was done using a gas chromatograph attached to a mass detector, model GC/MS-QP 2010SE (Shimadzu, Japão), equipped with an AOC-20i auto-injector (auto-injector). The separation has occurred in a RTX-5MS (Restek, USA) capillary column, and the quantification was done by standard area and the compounds identification by the mass spectrometer, using the NIST 8 library of the GC/MS. The sample oil was diluted with hexane (analytic degree, ultra pure).

130

Fixed oil

Fatty acid methyl esters preparation

The fatty acids were converted to their methyl esters using the boron trifluoride-methanol (BF₃) method, as shown in the literature (Moss et al. 1974). The resultant mixture of fatty acid methyl esters (FAMES) in hexane/chloroform (4:1, v/v) was subjected to gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID).

137

Gas-chromatography analysis

The quantitative GC analyses were performed according to the following conditions using a gas chromatograph GC/FID-2010 with an AOC-20i autosampler (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a fused-silica capillary column (Rtx-WAX, 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 µm film thickness). Injections were performed with a 1:25 split ratio, and hydrogen was used as the carrier gas under constant flow mode at 1.2 mL/min. The injector was heated to 250 °C, and the flame-ionization detector operated at 250 °C. The initial programmed oven temperature was 100 °C, which was increased by 7 °C/min up to 200 °C, increased by 5 °C/min to 202.6 °C and held isothermal for 2 min at this temperature. It was then increased by 5 °C/min to 222.9 °C and held isothermal for 2 min, and then increased by 5 °C/min to 230 °C and

held isothermal for 10 min at 230 °C. The internal standard solution, containing nonadecanoate methyl ester (C19:0 $\geq$ 99.0%; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), was prepared at a concentration of 2 mg/mL by dissolving 20 mg methyl nonadecanoate in 10 mL of n-hexane in a volumetric flask. The analyses were performed at the Federal University of Pelotas (Laboratory of Lipidomics and Biorganic).

2.5 Ovicidal activity assay of the oils against *F.hepatica*

Preparation of the dilutions of the oils:

The dilutions of the oils were based on the methodology described by Freire et al. (2014), with adaptations. The FOH, EOC and combinations there of were diluted in sterile distilled water and to emulsify the oil was added 1% tween 80. In two sterile glass vials of 20 ml capacity was added 45 uL of each oils, 180µL Tween and 15 ml of distilled water after each tube is individually stirred in shaker mark solutions AP 59 (Phoenix Luferco) for a period of 5 minutes EOC was diluted nine fold and FOH seven times using the same method performed in the first solution. For the combination of OFH OEC and the methodology was the same, only the initial volume was 22 uL + 22 uL of each oil totaling 44 uL, it was also diluted seven times. Was obtained for the concentrations of OFH (2.3 mg / ml to 0.017mg / ml); OEC (2.07mg / ml to 0.004mg / ml) and OFH + OEC (1.15mg / ml + 1.03mg / ml to 0.0085mg / ml + 0.008mg / ml). Concentrations considered the density (OFH d = 0.92g / cm³ and OEC d = 0.83 g / cm³ at 25 ° C).

Egg's hatching assay in vitro

The assays were performed based on the methodologies described by Robles-Pérez et al. (2015) e Arafa et al. (2015) with adaptations. For the assays performance,

cell culture plates of six wells were used (bran KASVI, K12-006). In each well 5mL of each oil solution and 1 mL of the eggs suspension (approximately 100 eggs). A preliminary assay was performed with the negative control (water) and with (water + Tween 80 at 1%). As negative control distilled water was used, and 0.025mg/mL of thiabendazole (VeT.Pharma – Handing of Pharmacy RS - Brazil) as positive control. All the evaluations were performed by triplicate. Then the dishes were storage for 14 days in a BOD incubator (Brand Eletrolab, model EL 101/03) with a temperature of 28°C and a humidity of 80%, under the light and with an every three days observation in order to followed the embryonic development. At the end of the 14 days period, the plates were exposed into the light for 2h, to stimulate the miracid's hatching (Arafa et al., 2015; Robles-Pérez et al., 2015). The hatched eggs, embryonated eggs and not embryonated eggs countdown was performed in an inverted microscope in the 40x objective (brand: Olympus – CKX 41).

The ovicidal activity *in vitro* of the oils against the eggs of *F. hepatica* was determinate, through the formulas described below: (Wood et al., 1995).

$$\% \text{ Hatch} = \frac{N^{\circ} \text{ of hatched eggs}}{N^{\circ} \text{ total of eggs}} \times 100$$

$$n^{\circ} \text{ total of eggs} = \text{hatched eggs} + \text{embryonated eggs} + \text{not embryonated eggs}$$

$$\% \text{ Ovicide Activity} = \frac{\% \text{ egg hatching negative control} - \% \text{ egg hatching Treatment}}{\% \text{ egg hatching negative control}} \times 100$$

2.6 Cytotoxicity assay *in vitro*

For the evaluation of the cytotoxicity *in vitro* of the oils, MDBK (Madin-Darby-Bovine-Kidney) line cells were used. The quantitative evaluation of the cellular viability was performed through the MTT method using the MTT dye, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983). The MDBK cells were cultivated in micro plates for 24h in a CO₂ chamber at 37°C until confluence. Then the serial dilutions from the different solutions of the oils in MEM were made, resulting in an initial concentration of (IC) = 4.6mg/ml and a final concentration of (FC) = 0.015mg/mL for the FOH; EOC(IC) = 4.14mg/mL and (FC) = 0.015mg/mL; FOH+EOC (IC) = 2.3mg/mL+2.07mg/mL e (FC) = 0.01mg/ml+0.0075mg/mL.

The cytotoxicity was evaluated after the exposition of the cells in the different concentrations of the oils for 48h. After this period, the supernatant (MEM + solution of the oil) was aspirated and 50µL/well of MTT (1mg/mL) was added in each well of the cell culture plates of 96 holes and maintained in a CO₂ chamber for 4h. The MTT was eliminated and 50/well of ethyl alcohol was added, returning the plates to the CO₂ chamber for another ten minutes for further lecture. The absorption at 540nm was spectrophotometric determined, according to the protocol (ISO/EN10993-5, 2009). All the assays were performed by duplicate.

213213

2.7 Statistical analyses

The analyses of variance ANOVA was used to evaluate differences in the hatching percentage between the concentrations of the oils and the controls. The statistical Dunnett's test (comparing multiple percentages) was performed to confirmed significance differences between the different groups with the control. The differences were considered significant for $P < 0.05$. The concentrations of the oils were plotted against the ovicidal activity percentage after probit transformation. Not lineal regression

models were built to estimate the dose- response of the assays. The EC₅₀, values were calculated for each treatment (FOH, EOC and FOH + EOC). The software GraphPad Prism® 7 was used to perform the statistical analyses.

224

3. Results

3.1 Chromatographic analyses

The chromatographic profiles of the EOC and FOH, are described in Table 1 and Table 2, respectively.

Table 1. Identification and concentration of phytochemicals compounds of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. by gas chromatography.

Compostos Fito químicos	concentração (%)
Cumaldehyde	26,8
2- Caren 10-al	22,17
1-Phenyl-1 butanol	19,47
gamma-Terpinen	15,24
beta-pinene	10,75
Cymene	5,56
Total	100

231

Table 2. Identification and concentration of chemicals compounds of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. by gas chromatography.

Fatty Acids	%
Saturated	
Palmitic Acid (C16:0)	5.791
Steric Acid (C18:0)	4.106

Behenic Acid (C22:0)	0.0866
Arachidic Acid (C20:0)	0.244
Lignoceric Acid (C24:0)	0.228
Myristic Acid (C14:0)	0.071
Margaric Acid (C17:0)	0.039
Total	10.5656

Monounsaturated

Oleic Acid (C18:1n9c)	35.805
Gadoleic Acid (C20:1n9)	0.096
Palmitoleic Acid (C16:1)	0.073
Total	35.974

Polyunsaturated

Linoleic Acid (C18:2n6c)	53.638
Linoleic Acid (C18:3n3)	0.043
Total	53.681

234234

235 The productivity obtained in the FOH's extraction in this study was of 47% and
236 in the EOC of 2.5%.

237237

238 3.2 Ovicidal activity of oils

239 The eggs that were not submitted to the exposure of the solution of the oils,
240 presented cellular division (Morula phase) in the fifth day of incubation and between the
241 ninth and tenth, evolved to the spot eye phase (embryo inside the egg) and in the
242 fourteenth day, they had embryonic eggs containing the miracidium, hatching after light
243 exposure.

The concentration of tween 80 at 1% used in the emulsification of the oils, do not interfered on the hatching ($p=0,5649$), between the treatments “water” (84.33 ± 4.16) and water + Tween (87 ± 6.08).

In the hatching analyses of the oils, a difference between the treatments of the FOH ($F=90.03$; $R^2= 0.9761$ e $p <0.0001$); of the EOC ($F=446.5$; $R^2=0.9952$ and $p<0.0001$); and FOH + EOC ($F=689.2$; $R^2=0.996$ and $p<0.0001$) was verified.

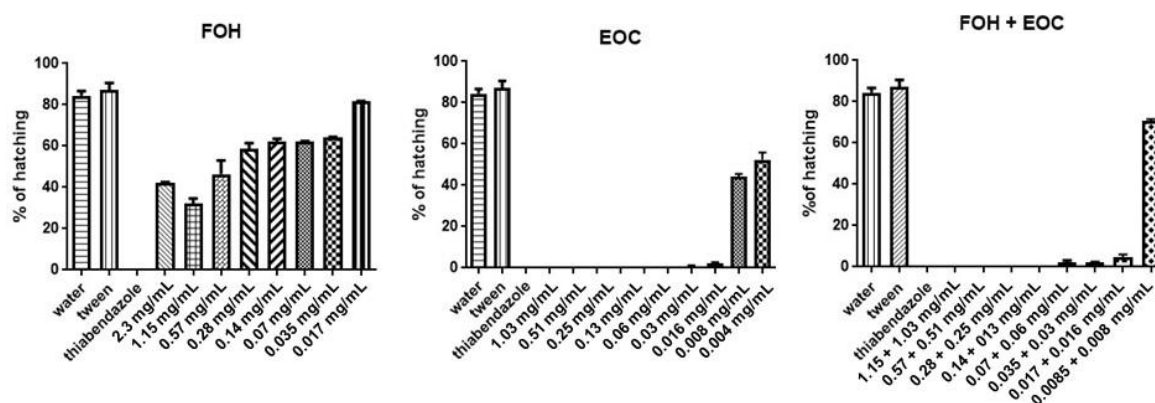


Figure 1. Percentages average of the hatched eggs of *Fasciola hepatica* submitted to different concentrations of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. (FOH), essential oil of *Cuminum cyminum* L. (EOC) and the combination of FOH + EOC

The ovicidal effectiveness of the EOC in the concentration of 0.03mg/mL was of 99% (± 1) and in the combination of FOH + EOC (0.017mg/mL+0.016mg/mL) of 94% (± 3) and in the FOH in the concentration of (0.035mg/mL) presented only 24% (± 4). In the concentration, the combination of the FOH + EOC (0.0085mg/mL+0.008mg/mL) and of the FOH (0.017mg/mL) did not were effective, but the EOC (0.016mg/mL) presented 97% of effectiveness (± 1).

The values of the EC_{50} for the combination (FOH + EOC) and for the EOC were of 0.00959 and 0.006333, respectively. The EC_{50} value for the fixed oil (FOH) was

estimated for 3.585, since this oil do not reach the 100% of hatching inhibition in none of the tested concentrations.

When the miracidium hatched they possessed circular and slow movements in all the evaluated concentrations of the oils, differing from those hatched with the negative control, where once they hatched their movement was actively.

3.2 Evaluation of the cytotoxicity

The highest cellular viabilities were of 100% for the FOH of *H. annuus* L., and 99% for the EOC of *C. cyminum* L. and for the combination (FOH+ EOC) in the concentration of 0.015mg/mL. The lowest viabilities were of 56% for the combination (FOH +EOC) in the concentration of (1.15mg/mL+1.03m/mL) respectively and 58% for the EOC of *C. cyminum* L in the concentration of 4.14mg/mL, as observed in Table 3.

Table 3. Viability percentage of the MDBK (Madin-Darby-Bovine-Kidney) cells against the different concentrations of the fixed oil (FOH) of *H. annuus* L., essential oil (EOC) of *C. cyminum* L. and the combination of the fixed oil (FOH) of *H. annuus* L. + the essential oil (EOC) of *C. cyminum* L.

FOH(mg/mL)	%	EOC(mg/mL)	%	FOH+EOC(mg/mL)	%
4.6	80	4.14	58	2.3+2.07	59
2.3	93	2.07	59	1.15+1.03	56
1.15	100	1.03	60	0.57+0.51	64
0.57	100	0.51	58	0.28+0.25	72
0.28	100	0.25	60	0.14+0.12	72
0.14	100	0.12	66	0.07+0.06	75
0.07	100	0.06	85	0.03+0.03	86

0.03	100	0.03	93	0.015+0.015	88
0.015	100	0.015	99	0.0075+0.0075	99

280

.

281 4. Discussion

282 In this study, the chromatographic profile of the FOH of *H. annuus* L. showed as
 283 the majority compounds; the polyunsaturated and monounsaturated fatty acids, 53.63%
 284 of linoleic acid (C18:2n6c) and 35.80% of Oleic acid (C18:1n9c), closed to those
 285 results showed by Fonseca and Gutierrez, (1974) where they obtained 56.30% of
 286 linoleic acid and 27.68% of Oleic acid. As well as those by Queiroga and Durán, (2010)
 287 when they studied different genotypes of seeds of *H. annuus* L., where they obtained
 288 between 52.85 to 62.82% of linoleic acid and 26% to 36.50% of oleic acid, being closed
 289 to the concentrations presented in this study, indicating few differences related to the
 290 genotype of the seed. As it can be seen in these three studies described above, although
 291 the results are closed, these are not the same, which can be due to the origin of the seeds
 292 used in the preparation of these oils.

293 In the EOC of *C. cyminum* L. the majority constituent was the Cumaldehyde
 294 (26.8%), corroborating with the findings by Cunha et al. (2003) with this oil, which
 295 showed predominance of the Cumaldehyde (25-35%), being also closed, however
 296 highest to those found by Martinez-Velazquez et al. (2011) who verified 22.03% of
 297 Cumaldehyde.

298 In the performance of the essential oils studied here, the essential oil of EOC had
 299 similar results to those obtained by Cunha et al. (2003) whose performance obtained in
 300 the extraction from the seed of *C. cyminum* was of 2 to 5% and in the present study of
 301 2.5%. The fixed oil (FOH) showed with a performance of 47%, similar results to those
 302 obtained by Abdalla et al. (2008) with 47.3% and closed to those by Gazzola et al.

(2011) with a performance of 42%, for the fixed oil of *H. annuus* L. A performance is a factor to consider when looking for possible alternative sources, using natural resources, which must be sustainable.

In the activity analyses of these oils, the FOH oil of *H. annuus* L. was classified as insufficient active, according with the W.A.A.V.P (*World Association for the advancement of Veterinary Parasitology*), which classifies the products for nematodes, trematodes and cestodes control, as highly effective (more than 98%), effective (90-98%), moderately effective (80-89%) or insufficient active (less than 80%) (Wood et al., 1995). The FOH wasn't able to inhibit the hatching, meanwhile the miracidium presented circular slow movements, probably they will not be able to infect the intermediate host (*Lymnaea*) however, to support this inference, an experimental infection in these hosts will have to be performed to confirm the infection with the obtainment of metacercariae.

In an experiment performed evaluating the experimental infection of *Lymnaea columella* by *F. hepatica* (Ueta, 1980) from the egg to the hatching of the miracidium, development periods were studied, where it was observed that the miracidium lifted the operculum and actively went out into the water according to Guimarães (2012). In this study, the same happened with the control (water).

The EOC of *C. cyminum* L. presented an ovicidal effectiveness of 99% in the concentration of 0.03mg/mL with 93% of cellular viability and 97% of effectiveness in the concentration of 0.016mg/mL with 99% of cellular viability; these results are promising when there is a search for effective and not toxic alternatives. The ovicidal activity of the EOC of *C. cyminum* L. was classified as highly effective and effective according with the W.A.A.V.P.

The combination between the (FOH+EOC) in the concentrations of 0.07mg/mL+0.06mg/mL, 0.035mg/mL+ 0.03mg/mL and 0.017mg/mL+ 0.016mg/mL, presented 95%, 98% and 94% of effectiveness respectively, classified as effective according with the W.A.A.V.P and presented cellular viability between 75% and 88%. The combination of these oils although has shown effective results in low concentrations, they are higher than the essential oil concentrations of *Cuminum cyminum* L. alone, showing that there was no synergy between them as there was no potentiation of ovicidal effect.

The majority of the volatile oils also known as essential oils are constituted of phenylpropanoids or terpenoids derivatives, being the monoterpenes, sesquiterpenes, the terpene compounds mostly founded in the volatile oils, responsible for different biological activities (Santos, 2010; Martinez - Velasquez et al., 2011 ; Veloso et al., 2012).

The OEC had superior efficacy ovicida regarding the combination and OFH. It can be deduced that the phytochemicals compounds; beta-pinene, Cymene, gamma – Terpinem, Cumaldehyde, 2- Caren 10-al, 1-Phenyl- butanol, which exists in the EOC, they are responsible for this superior result.

In the scientific community, the essential oils are studied to mainly evaluate the anti-helminthic potential against gastrointestinal nematodes of small ruminants (Farias et al., 2010; Macedo et al., 2009; Nery et al., 2009) and also the insecticide potential against ectoparasites which are vectors of human and animals diseases (Broglio-Micheletti et al., 2010; Callander and James, 2012; Martinez-Velazquez et al., 2011), however in relation to the antiparasite activity against *Fasciola* spp., there are few reports, is studies that evaluated the in vitro effect of *Artemisia annua* L. extracts, *Asimina triloba* L. and *Artemisia absinthium* L. (Ferreira et al, 2011.); *Momordica*

charantia L. (Pereira et al, 2016.) And semi-synthetic chlorophyllin compound derived from *Spinacia oleracea* (Singh; Singh, 2016) and non-vegetable oils which difficult the comparison of the obtained results in this study with others scientific reports.

The products coming from natural resources are capable to cause minors collateral effects to hosts, less environmental damage, and may extend the anti-helminthic resistance appearance, due to secondary metabolites of plants, capable to produce diverse effects against the parasites, such as; fertility reduction, development interruption and feeding reduction (Roy and Saraf, 2006).

Resistance in anti-helminthics commonly used to control fascioliasis, is present in the whole world (Brennan et al., 2007; Olaechea et al., 2011; Brockwell et al., 2014). Recently, the first resistance report was in Albendazole in herd sheep in Sweden (Novobilský et al., 2016). Finding an alternative source to minimize between other problems, the growing parasite's resistance becomes increasingly urgent.

5. Conclusions

Through the results of this study, the effectiveness of the EOC at low concentrations was considered very effective and efficient, respectively, and showed no toxicity front MDBK cells. It can be inferred that the EOC of *Cuminum cyminum* L. evaluated in this study may be presented as a promissory alternative in the search of bioactive constituents to be used in the control fascioliasis, however further studies are necessary to evaluate the compounds in both *in vitro* and *in vivo*.

6. References

- 375 Abdalla, A.L.; Silva Filho, J.C.; Godoy, A.R. et al., 2008. Utilização de subprodutos da
376 indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. Revista Brasileira de Zootecnia,
377 Viçosa, v.37, número especial, p.260-258.
- 378 Almeida, S.C.G., Freitas, D.F., Carneiro, M.B., Camargo, P.F., Azevedo, J.C., Martins,
379 I.V.F., 2016. The population density of *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca,
380 Lymnaeidae) an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), in the
381 Caparaó microregion, ES, Brazil. Braz J Biol.
- 382 Almeida, M.Â.O. de, Ayres, M.C.C., 2014. Considerações Gerais sobre os Anti-
383 helmínticos, in: Spinosa, H. de S., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M. (Eds.), Farmacologia
384 Aplicada À Medicina Veterinária. Guanabara koogan, Rio de Janeiro, pp. 503–516.
- 385 Andrade, F.D., Ribeiro, A.R.C., Medeiros, M.C., Fonseca, S.S., Athayde, A.C.R.,
386 Ferreira, A.F., Rodrigues, O.G., Silva, W.W., 2014. Ação anti-helmíntica do extrato
387 hidroalcóólico da raiz da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no controle de *Haemonchus*
388 *contortus* em ovinos. Pesqui. Vet. Bras. 34, 942–946.
- 389 Arafa, W.M., Shokeir, K.M., Khateib, A.M., 2015. Comparing an in vivo egg reduction
390 test and in vitro egg hatching assay for different anthelmintics against *Fasciola* species,
391 in cattle. Vet. Parasitol. 214, 152–158. doi:10.1016/j.vetpar.2015.09.023
- 392 Ashrafi, K., Saadat, F., O'Neill, S., Rahmati, B., Amin Tahmasbi, H., Pius Dalton, J.,
393 Nadim, A., Asadinezhad, M., Rezvani, S.M., 2015. The endemicity of human
394 fascioliasis in Guilan province, northern Iran: The baseline for implementation of
395 control strategies. Iran. J. Public Health.
- 396 Bennema, S.C., Scholte, R.G.C., Molento, M.B., Medeiros, C., Carvalho, O. dos S.,
397 2014. *Fasciola hepatica* In bovines in Brazil: Data availability and spatial Distribution.
398 Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 56, 35–41. doi:10.1590/S0036-46652014000100005

- 399 Brennan, G.P., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M.,
 400 Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C., Mottier, L., Alvarez,
 401 L., Solana, H., Virkel, G., Brophy, P.M., 2007. Understanding triclabendazole
 402 resistance. *Exp. Mol. Pathol.* doi:10.1016/j.yexmp.2007.01.009
- 403 Brito, D.R., Fernandes, R.M., Fernandes, M.Z., Ferreira, M.D., Rolim, F.R., da Silva
 404 Filho, M.L., 2009. Atividade anti-helmintica dos extratos aquoso e etanolico do fruto da
 405 morinda citrifolia sobre *Ascaridia galli*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18, 32–36.
 406 doi:10.4322/rbpv.01804006
- 407 Brockwell, Y.M., Elliott, T.P., Anderson, G.R., Stanton, R., Spithill, T.W., Sangster,
 408 N.C., 2014. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally
 409 infected Australian beef and dairy cattle. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*
 410 doi:10.1016/j.ijpddr.2013.11.005
- 411 Broglio-Micheletti, S.M.F., Dias, Ni. da S., Valente, E.C.N., Souza, L.A. de, Lopes, D.
 412 olympio P., Santos, J.M. dos, 2010. Ação de extrato e óleo de nim no controle de
 413 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*(Canestrini,1887) (Acari: Ixodidae) em
 414 Laboratório. *Rev. Bras. Parasitol.* 19.
- 415 Callander, J.T., James, P.J., 2012. Insecticidal and repellent effects of tea tree
 416 (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. *Vet Parasitol* 184, 271–278.
- 417 Carvalho, H.H.C., Cruz, F.T., Wiest, J.M., 2005. Atividade antibacteriana em plantas
 418 com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. *Rev. Bras. Plantas*
 419 *Med.* 7, 25–32.
- 420 Cunha, A. P. DE; Roque, O. R.; Silva, A. P. DA ,2003. Cominhos. **Plantas e Produtos**
 421 **Vegetais em Fitoterapia**. Fundação Calouste Gulbenkian ed., p.250. Lisboa.
- 422 Dutra, L.H., Molento, M.B., Naumann, C.R.C., Biondo, a. W., Fortes, F.S., Savio, D.,

- Malone, J.B., 2010. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Vet. Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.015
- Farias, M.P.O., Teixeira, W.C., Wanderley, A.G., Alves, L.C., Faustino, M.A.G., 2010. Avaliação in vitro dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl . sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. *Rev. Bras. Plantas Med.* 12, 220–226. doi:10.1590/S1516-05722010000200015
- Ferreira, J. F. S.; Peaden, P.; Keiser, J. 2011. In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis* : Trematocidal plant alcoholic extracts. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1585–1592.
- Fonseca, H., Gutierrez, L.E., 1974. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. *An. da Esc. Super. Agric. Luiz Queiroz* 31, 485–490. doi:10.1590/S0071-12761974000100038
- Freire, I.C.M., Pérez, A.L.A.L., Cardoso, A.M.R., Mariz, B.A.L.A., Almeida, L.F.D., Cavalcanti, Y.W., Padilha, W.W.N., 2014. Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Plantas Med.* 16, 372–377. doi:10.1590/1983-084X/12_053
- Gazzola, A., Cunha, D.A., Paiao, G.D., Vescove, I., Ed, P., 2011. Universidade de São Paulo Departamento de Produção Vegetal A CULTURA DO GIRASSOL 1–69. Gil, L.C., Diaz, A., Rueda, C., Martinez, C., Castillo, D., Apt, W., 2014. Fascioliasis hepatica humana: Resistencia al tratamiento con triclabendazol. *Rev. Med. Chil.* 142, 1330–1333. doi:10.4067/S0034-98872014001000014
- Gomes, S.P., Favero, S., 2011. Avaliação de Óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Sci. - Heal. Sci.* 33, 147–151. doi:10.4025/actascihealthsci.v33i2.9531

- 448 Guimarães, M. P. *Fasciola hepatica* , 2012 .In: D. P. Neves; A. L. de Mello; P. M.
 449 Linardi; R. W. A. Vitor (Eds.); **Parasitologia Humana**. 12th ed., p.241–244. São
 450 Paulo: Atheneu.
- 451 ISO/EN10993-5, 2009. B. Int. Stand. ISO 10993-5 Biol. Eval. Med. devices - Part 5
 452 Tests Cytotox. Vitro. methods 3 Ed, 42.
- 453 Macedo, I.T., Bevilaqua, C.M., de Oliveira, L.M., Camurca-Vasconcelos, A.L., Vieira
 454 Lda, S., Oliveira, F.R., Queiroz-Junior, E.M., Portela, B.G., Barros, R.S., Chagas, A.C.,
 455 2009. [Ovicidal and larvicidal activity in vitro of Eucalyptus globulus essential oils on
 456 *Haemonchus contortus*]. Rev Bras Parasitol Vet. doi:S1984-29612009000300011 [pii]
- 457 Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G.A., Rosario-Cruz, R., Flores-Fernandez,
 458 J.M., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., Del Carmen Lugo-Cervantes, E.,
 459 2011. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from
 460 *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick
 461 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 108, 481–487.
 462 doi:10.1007/s00436-010-2069-6
- 463 Martins, I.V.F., Avelar, B.R. De, Bernardo, C.D.C., Leão, A.C. De, Salim, M.J., 2014.
 464 Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil:
 465 an update. Brazilian J. Vet. Parasitol. 23, 23–9.
- 466 Moreira, S.B.L.C., Guimarães-Brasil, M. de O., Holanda-Neto, João Paulo de Souza
 467 Morais, M.C. de, Souza, E.A. de, 2016. Avaliação in vitro da eficácia do óleo essencial
 468 do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) no combate a varroase em *Apis mellifera* L . In
 469 vitro evaluation of essential oil effectiveness of Alecrim Pimenta (*Lippia sidoides*) in
 470 against varroase on *Apis melli* 11, 1–6.
- 471 Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
 472 Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63.

- doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Moss, C.W., Lambert, M. A., Merwin W. H., 1974. Comparação de métodos rápidos de análise de ácidos graxos bacterianas. *Appl Microbiol* 28: 80 - 85.
- Nery, P.S., Duarte, E.R., Martins, E.R., 2009. Eficácia de plantas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: Revisão de estudos publicados. *Rev. Bras. Plantas Med.* 11, 330–338. doi:10.1590/S1516-05722009000300016
- Noel, K.M.M., Fontes-Pereira, A.M.A. de, Castilho, R., Esperança, S.D.F.A., Miranda, I., Fonseca, O., Percedo, M.I., 2013. Factores de riesgo de fasciolosis para la salud pública en Huambo , Angola. *Rev Salud Anim.*; 35(3); 164-173; 2013-12 35, 164–173.
- Novobilský, A., Amaya Solis, N., Skarin, M., Höglund, J., 2016. Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6, 141–147. doi:10.1016/j.ijpddr.2016.06.004
- Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., Cabrera, R., 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet. Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.047
- Pereira, C.A.J., Oliveira, L.L.S., Coaglio, A.L., Santos, F.S.O., Cezar, R.S.M., Mendes, T., Oliveira, F.L.P., Conzensa, G., Lima, W.S., 2016. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation in vitro. *Vet. Parasitol.* 228, 160–166. doi:10.1016/j.vetpar.2016.08.025
- Queiroga, V. de P., Durán, J.M., 2010. Determinação da composição química em sementes e em ácidos graxos do óleo de seis genótipos de girassol, In: IV Congresso Brasileiro de mamona & I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas. João Pessoa, pp. 2021–2024.
- Remédio, R.N., Nunes, P.H., Anholeto, L.A., Oliveira, P.R., Mathias, M.I.C., 2015.

- 498 Morfological effectes of neem(*Azadirachta indica* A.juss) seed oil with known
 499 azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus*
 500 ticks (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 114, 431–444.
- 501 Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M.,
 502 2015. Screening anthelmintic resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* isolated
 503 from sheep by means of an egg hatch assay. *BMC Vet. Res.* 11, 226.
- 504 Rosato, a, Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, a, Vitali, M.E., Vitali, C.,
 505 2010. In vitro synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and
 506 essential oils. *Curr. Med. Chem.* 17, 3289–3295. doi:10.2174/092986710792231996
- 507 Roy, A., Saraf, S., 2006. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes
 508 distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* doi:10.1248/bpb.29.191
- 509 Santos, R.I. dos, 2010. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólicos Secundários, in:
 510 Simões;, C.M.O., Schenkel;, E.P., Gosmann;, G., Mello;, J.C.P. de, Mentz;, L.A.,
 511 Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmagonesia da Planta ao Medicamento*. UFRGS, Porto Alegre
 512 e UFSC Florianópolis pp. 404–430.
- 513 Serra-Freire, N.M., Bordon, E.. , Lessa, S.C.S.S., Farias, P.O., Malacco, M.T., Corrêa,
 514 M.A., Tschumi, J.A., 1995. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no
 515 Brasil. *A Hora Veterinária* 1, 19–21.
- 516 Singh, D. J.; Singh, D. K. Anthelmintic Activity of Chlorophyllin Against Different
 517 Larval Stages of *Fasciola gigantica*.,2016 **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**.
- 518 Soliman, M.F.M., 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in
 519 Egypt. *J. Infect Dev. Ctries.* 2, 182–189.
- 520 Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de
 521 ruminantes,4th ed. Japan International Cooperation Agency, Tokyo.
- 522 Ueta, M.T., 1980. Infecção experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*.

- 523 Rev. Saude Publica. doi:10.1590/S0034-89101980000100004
- 524 Veloso, R.A., Castro, H.G., Barbosa, L.C.A., Cardoso, D.P., Chagas Júnior, A.F.,
525 Scheidt, G.N., 2014. Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas
526 cultivares de manjerição (*Ocimum basilicum* L.). Rev. Bras. Plantas Med. 16, 364–371.
527 doi:10.1590/1983-084X/12_180
- 528 Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B.,
529 Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J., 1995.
530 World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.)
531 second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants
532 (bovine, ovine, caprine). Vet. Parasitol. 58, 181–213. doi:10.1016/0304-4017(95)00806-
533 2
- 534 Zago, J.A.A., Ushimaru, P.I., Barbosa, L.N., Fernandes, A., 2009. Sinergismo
535 entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus*
536 *aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Brazilian J. Pharmacogn.
537 19, 828–833. doi:10.1590/S0102-695X2009000600005
- 538

5. CONCLUSÃO

O resultado promissor foi apresentado pelo óleo essencial de *Cuminum cyminum* L. em concentrações baixas, esse foi classificado como produto muito eficaz e eficaz no controle de helmintos de acordo com a W.A.A.V.P e na avaliação de citotoxicidade apresentou viabilidade celular de 93% e 99% nessas concentrações. O óleo fixo de *Helianthus annuus* L. isoladamente não apresentou atividade ovicida e a combinação entre esses óleos embora tenha apresentado resultado eficaz em concentrações baixas, essas concentrações são superiores as concentrações do óleo essencial de *Cuminum cyminum* L. isoladamente, evidenciando que não houve um sinergismo entre os mesmos, pois não houve potencialização do efeito ovicida. A viabilidade celular nessas concentrações foram de 86% e 88% respectivamente.

Os miracídios ao eclodirem, quando submetidos aos tratamentos, apresentaram movimentos lentos e circulares, provavelmente esses miracídios não serão capazes de infectarem o hospedeiro intermediário, entretanto mais estudos se fazem necessário, como a realização de uma infecção experimental com esses miracídios no hospedeiro intermediário.

Pode-se concluir, que o óleo essencial de *C. cyminum* L., apresenta o melhor potencial ovicida e em concentrações baixas não apresenta citotoxicidade, sendo assim poderá ser uma alternativa no controle da fasciolose, necessitando de mais estudos.

Conclui-se que este estudo respondeu o questionamento quanto ao potencial ovicida desses óleos, e também gerou novas perspectivas de estudos científicos *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOY, A.R. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa**, v.37, número especial, p.260-258, 2008
- ADRIEN, M. D. L.; SCHILD, A. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; et al. Acute fasciolosis in cattle in southern brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 705–709, 2013.
- ALMEIDA, M. Â. O. DE; AYRES, M. C. C. Considerações Gerais sobre os Anti-helmínticos. In: H. de S. Spinosa; S. L. Górnaiak; M. M. Bernardi (Eds.); **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5a ed., p.503 – 516, 2014. Rio de Janeiro: Guanabara koogan.
- ALMEIDA, S. C. G.; FREITAS, D. F.; CARNEIRO, M. B.; et al. The population density of *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Lymnaeidae) an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), in the Caparaó microregion, ES, Brazil. **Braz J Biol**, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&>.
- ALMEIDA, B. R. DE. Malacologia dos Gêneros *Lymnaea* e *Biomphalaria* na Mesorregião Sul Espírito-Santense, e a Avaliação de Extratos de *Melia Azedarach*, *Azadirachta Indica*, e *Cymbopogon Winterianus* Como Agentes Moluscicidas. , 2010.
- ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. A; MAINAR-JAIME, R. C.; PÉREZ-GARCÍA, J.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. **The Veterinary record**, 2006.
- ALVES, D.; CARNERO, M.; MARTINS, I.; et al. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State , Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2011.
- ANDRADE, F. D.; RIBEIRO, A. R. C.; MEDEIROS, M. C.; et al. Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcoolico da raiz da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 942–946, 2014.
- ARAÚJO, J. L. DE B.; LINHARES, G. F. C.; OLIVEIRA, A. P. M. DE; et al. Infecções autóctones de bovinos por *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Fasciolidae). , p. 36:96–100, 2007.
- ARAÚJO, S. M. DE; PILE, E. A. M.; BARROS, J. S. DE; SANTOS, J. A. A. DOS; VASCONCELLOS, M. C. DE. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 157–159, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962002000300009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

ASHRAFI, K.; SAADAT, F.; O NEILL, S.; et al. The endemicity of human fascioliasis in Guilan province, northern Iran: The baseline for implementation of control strategies. **Iranian Journal of Public Health**, 2015.

BARATA, L. Empirismo e ciencia: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, 2005.

BELLATO. Fasciola hepatica occurrence in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) and bovines (*Bos taurus*) in Timbó, SC, Brazil _ Bellato _ Revista de Ciências Agroveterinárias (Journal of Agroveterinary Sciences). , 2009.

BENNEMA, S. C.; SCHOLTE, R. G. C.; MOLENTO, M. B.; MEDEIROS, C.; CARVALHO, O. DOS S. *Fasciola hepatica* IN BOVINES IN BRAZIL: DATA AVAILABILITY AND SPATIAL DISTRIBUTION. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 35–41, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4085838/>>.

BORAY, J.C. Experimental fascioliasis in Austrália. *Advances in Parasitology*, vol.7, pp. 95-210., 1969.

BORAY, J.C.. Flukes of Domestic Animals, (in: *Parasites, Pests and Predators*, ed: S.M. Gaafar, pp 179-218. Elsevier, Amsterdam – Oxford-New York-Tokyo, 1985,

BRENNAN, G. P.; FAIRWEATHER, I.; TRUDGETT, A.; et al. Understanding triclabendazole resistance. **Experimental and Molecular Pathology**, 2007.

BROCKWELL, Y. M.; ELLIOTT, T. P.; ANDERSON, G. R.; et al. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2014.

CALLANDER, J. T.; JAMES, P. J. Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. **Vet Parasitol**, p. 184, 271–278., 2012.

CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A. M.; SILVA-SOUSA, N.; VALVERDE, A. L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20 n 2, 2010.

CARNEIRO, M. B.; ALVES, D. P. Fasciola hepatica EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) NO SUL DO ESPÍRITO SANTO * Fasciola hepatica IN WATER BUFFALO (*Bubalus bubalis*) IN THE. , v. 32, n. 2, p. 89–91, 2010.

CARNEIRO, F. M.; JOSÉ, M.; ALBERNAZ, L. C.; DARC, J.; COSTA, P. Tendências Dos Estudos Com Plantas Medicinais No. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 25–32, 2005.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N.; ATCC, C.; ATCC, C. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas Antifungal Activity of Three Essential Oils on Candida Strains. **Rev Odontol Bras Central**, v. 20 (52), n. 52, p. 68–73, 2011.

CONAB. GIRASSOL Período : Janeiro de 2016. , , n. 61, p. 1–8, 2016.

CORAL, R. P.; MASTALIR, E. T.; MASTALIR, F. P. *Fasciola Hepatica* Removal From Common Duct Through. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, p. 69–71, 2007.

CUNHA, F. O. V. DA; MARQUES, S. M. T.; MATTOS, M. J. T. DE. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul , Brazil 2000 and 2005. **Parasitologia latinoamericana**, 2007.

CUNHA, A. P. DE; ROQUE, O. R.; SILVA, A. P. DA. Cominhos. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Fundação Calouste Gulbenkian ed., p.250, 2003. Lisboa.

DUTRA, L. H.; MOLENTO, M. B.; NAUMANN, C. R. C.; et al. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using geographic information systems. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1-2, p. 76–81, 2010.

ECHEVARRIA, F.; EMBRAPA, C. P. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG, 2004. , 2004.

ESCALANTE, H.; DAVELOIS, K.; ORTIZ, P.; et al. [Western blot technique standardization of the diagnosis of human fasciolosis using *Fasciola hepatica* excreted-secreted antigens]. **Revista peruana de medicina experimental y salud pública**, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22086625>>.

ESCALONA, C.; LEÓN, J. A. DE; ÁLVAREZ, M.; CAÑETE, R. Acute fasciolosis: A cuban case report | Fasciolosis aguda: Presentación de un caso de Cuba. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 5, p. 543–546, 2012.

ESPINOZA, J. R. Fasciolosis Humana Y Animal En El Perú : Impacto En La Economía De Las Zonas Endémicas. **Rev Peru Med Exp Salud Pública**, 2010.

FAIRWEATHER, I.; MCSHANE, D. D.; SHAW, L.; et al. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. **Veterinary Parasitology**, 2012.

FERREIRA, J. F. S.; PEADEN, P.; KEISER, J. In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis* : Trematocidal plant alcoholic extracts. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1585–1592, 2011.

FISS, L.; LOURDES ADRIEN, M. DE; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; et al. Subacute and acute fasciolosis in sheep in southern Brazil. **Parasitology Research**, 2013.

GASBARRE, L. C.; STOUT, W. L.; LEIGHTON, E. A. Gastrointestinal nematodes of cattle in the northeastern US: Results of a producer survey. **Veterinary Parasitology**, 2001.

GASPAROTTO JR, A.; BREZAN, M. A. ; PILOTO, I. C.; et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *calophyllum brasiliense* camb (clusiaceae). **Química Nova**, v. 28, p. 575–578, 2005.

GAZZOLA, A.; CUNHA, D. A.; PAIAO, G. D.; VESCOVE, I.; ED, P. Universidade de São Paulo Departamento de Produção Vegetal A Cultura do Girassol. , p. 1–69, 2011.

GIL, L. C.; DIAZ, A.; RUEDA, C.; et al. Fascioliasis hepatica humana: Resistencia al tratamiento con triclabendazol. **Revista Medica de Chile**, v. 142, n. 10, p. 1330–1333, 2014.

GORDON, D.; ZADOKS, R.; SKUCE, P.; SARGISON, N. Confirmation of triclabendazole resistance in liver fluke in the UK. **Veterinary Record**, 2012.doi: 10.1136/vr.e5381.

GUIMARÃES, M. P. *Fasciola hepatica*. In: D. P. Neves; A. L. de Mello; P. M. Linardi; R. W. A. Vitor (Eds.); **Parasitologia Humana**. 12th ed., p.241–244, 2012. São Paulo: Atheneu.

JANAHAHMDI, M.; NIAZI, F.; DANYALI, S.; KALAMINEJAD, M. Effects of the fruit essential oil of *Cuminum cyminum* Linn. (Apiaceae) on pentylenetetrazol-induced epileptiform activity in F1 neurones of *Helix aspersa*. **Journal of ethnopharmacology**, 2006.

LEITE, R. M. V. B. C., BRIGHENTI, A. M., CASTRO, C. (Ed). **Girassol no Brasil**. Londrina: EMBRAPA, 2005.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. ; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos : um mercado promissor. , v. 30, n. 3, p. 241–248, 2010.

LIMA, W. D. S.; SOARES, L. R. M.; BARÇANTE, T. A.; GUIMARAES, M. P.; BARÇANTE, J. M. D. P. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, 2009.

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911004704>>.

MARCOS, L. A.; YI, P.; MACHICADO, A.; et al. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X07850231>>.

MARTINS, I. V. F.; AVELAR, B. R. DE; BERNARDO, C. D. C.; LEÃO, A. C. DE; SALIM, M. J. Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 23, n. 1, p. 23–9, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728357>>.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1255–1278, 2005.

MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. Chapter 2 Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. **Advances in Parasitology**, 2009.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C. DE; PINHEIRO, J.; LURDES DE AZEVEDO RODRIGUES, M. DE. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopianae* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2006.

MENSINK, R. P. Effects of fats and oils on risk factors for coronary heart disease. In: Congresso y exposición Latino americanos sobre procesamiento de grasas y aceites, 6., Campinas, 1995. Memórias... Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 1995. p. 95-98.

Ministério da Saúde. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes Técnicas: Programas de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE), Brasília, 2008.

MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D.; REICHLING, J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, 2000.

MOLINA-HERNÁNDEZ, V.; MULCAHY, G.; PÉREZ, J.; et al. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 101–111, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.004>>.

MOREIRA, S. B. L. C.; GUIMARÃES-BRASIL, M. DE O.; HOLANDA-NETO, JOÃO PAULO DE SOUZA MORAIS, M. C. DE; SOUZA, E. A. DE. Avaliação in vitro da eficácia do óleo essencial do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) no combate a varroase em *Apis mellifera* L. In vitro evaluation of essential oil effectiveness of Alecrim Pimenta (*Lippia sidoides*) in against varroase on *Apis mellifera*, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2016.

MOSS, C.W., LAMBERT, M. A., MERWIN W.H. Comparação de métodos rápidos de análise de ácidos graxos bacterianos. *Appl Microbiol* 28: 80-85, 1974.

MÜLLER, G. Fasciolose. In: F. R.- Correa; A. L. Schild; R. A. A. Lemos; J. R. J. Borges (Eds.); **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3rd ed., p.639 – 650, 2007. Santa Maria: Pallotti.

MÜLLER, G.; BERNE, M. E. A.; RAFFI, L. L. Influência da temperatura na longevidade de metacercárias de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5(2), p. 164 –5, 1999.

NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: Revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 330–338, 2009.

NOEL, K. M. M.; FONTES-PEREIRA, A. M. A. DE; CASTILHO, R.; et al. Factores de riesgo de fasciolosis para la salud pública en Huambo , Angola. **Rev Salud Anim.**; **35(3); 164-173; 2013-12**, v. 35, n. 3, p. 164–173, 2013.

OLAECHEA, F.; LOVERA, V.; LARROZA, M.; RAFFO, F.; CABRERA, R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). **Veterinary Parasitology**, 2011.

OLIVEIRA, A. A.; NASCIMENTO, A. DA S.; SANTOS, T. A. M. DOS; et al. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama , Estado do Amazonas , Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 251–259, 2007.

OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V. Extração de óleo de girassol utilizando miniprensa. **Documentos / Embrapa Soja**, p. 28, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Avanços para superar o impacto global de doenças. Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas**. 2010.

ORTIZ, P.; SCARCELLA, S.; CERNA, C.; et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. **Veterinary Parasitology**, 2013.

PELEGRINI, B. **Girassol**: uma planta solar que das Américas conquistou o Mundo. São Paulo: Ícone, 1985. 117p.

PEREIRA, C. A. J.; OLIVEIRA, L. L. S.; COAGLIO, A. L.; et al. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 160–166, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401716303570>>. .

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF., K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

REIS, G. G.; PEISINO, A. L.; ALBERTO, D. L.; MENDES, M. F.; CALÇADA, L. A. Estudo do efeito da secagem em convecção natural e forçada na composição do óleo essencial da citronela (*Cymbopogon nardus*). , p. 47–55, 2006.

ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 2009. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/364/1530/2763.short>>.

ROSATO, A.; PIARULLI, M.; CORBO, F.; et al. In vitro synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 28, p. 3289–3295, 2010.

ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; MEANA, A.; VALCÁRCEL, F.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Update on trematode infections in sheep. **Veterinary Parasitology**, 2012.

SANTOS, R. I. DOS. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólicos Secundários. In: C. M. O. Simões; E. P. Schenkel; G. Gosmann; et al. (Eds.); **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 6th ed., p.404–430, 2010. Porto Alegre: UFRGS.

SENTHILKUMAR, A.; JAYARAMAN, M.; VENKATESALU, V. Chemical constituents and larvicidal potential of *Feronia limonia* leaf essential oil against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Parasitology Research**, 2013.

SERRA-FREIRE, N. M.; BORDON, E.; LESSA, S. C. S. S.; et al. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 1, p. 19–21, 1995.

SINGH, D. J.; SINGH, D. K. ANTHELMINTIC ACTIVITY OF CHLOROPHYLLIN AGAINST DIFFERENT LARVAL STAGES OF *Fasciola gigantica*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 2016.

SILVA, I. C.; MULLER, G.; MATTOS, M.J.T.; CASTRO, A.L.D., ALMEIDA, J.E.M. & UENO, H. Fasciolose. I – incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, n.323, p. 34-42, 1980.

SOUSA, R. G.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; MELO DINIZ, M. F. F.; BATISTA, L. M. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: Uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 2, p. 287–292, 2013.

TESSELE, B.; BRUM, J. S.; BARROS, C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 873–889, 2013.

TOSTES, R. A.; SANTARÉM, V. A.; ALBERTI, H.; SANCHES, O. C. Casos autóctones de *Fasciola hepatica* na região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 961–962, 2004.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. D. O.; SOUZA, E. L. DE; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias

contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542–545, 2009.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. (EDS.). Família Fasciolidae. **Parasitologia Veterinária**. 2nd ed., p.89 98, 1998. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

VELOSO, R. A.; CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; et al. Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjerição (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2 SUPPL. 1, p. 364–371, 2014.

VIEIRA, L. S. Cominho. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das Plantas Mediciniais (A Farmácia de Deus)**. 2a ed., p.106 , 107, 1992. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA.

WHO | Neglected tropical diseases. 2014.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; et al. 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). **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 181–213, 1995.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clinicos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 828–833, 2009.

ANEXO



Claudio Alves <demp.ib.ufpel@gmail.com>

Enc: Submission IJPDDR_2016_108 received by International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

1 mensagem

Maria Antonieta Machado Pereira da Silva <machadoantonieta@hotmail.com>
Para: DEMP <demp.ib.ufpel@gmail.com>

6 de outubro de 2016 10:09

De: International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance <EviseSupport@elsevier.com>

Enviado: quinta-feira, 6 de outubro de 2016 10:03

Para: machadoantonieta@hotmail.com

Assunto: Submission IJPDDR_2016_108 received by International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: IJPDDR_2016_108

Title: Ovicidal activity of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. and the essential oil of *Cuminum cyminum* L. against *Fasciola hepatica* in vitro

Journal: International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

Dear Dr. da Silva,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=IJPDDR and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our Customer Support site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | Privacy Policy

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.