

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção



Dissertação

**Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae,
sobre ovos de *Ancylostoma* spp.**

Rosaria Helena Machado Azambuja

ROSARIA HELENA MACHADO AZAMBUJA

**Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae,
sobre ovos de *Ancylostoma* spp.**

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: Marlete Brum Cleff

Co-orientadora: Maria Elisabeth Aires Berne

Pelotas, 2015

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

A991p

Azambuja, Rosaria Helena Machado

Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae, sobre ovos de *Ancylostoma* spp / Rosaria Helena Machado Azambuja. – 61f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2015. – Orientadora Marlete Brum Cleff ; coorientadora Maria Elisabeth Aires Berne.

1.Lamiaceae. 2.Nematódeo. 3.Ovos. 4.Fitoterápico.
I.Cleff, Marlete Brum. II.Berne, Maria Elisabeth Aires.
III.Título.

CDD: 592.57

Banca examinadora:



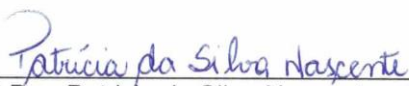
Prof.^a Dra. Marlete Brum Cleff-Orientadora - Faculdade de Veterinária -UFPEL



Prof.^a Dra. Nara Amélia da Rosa Farias - Instituto de Biologia - UFPEL



Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos-UFPEL



Prof.^a Dra. Patricia da Silva Nascente – Instituto de Biologia - UFPEL

Aos meus pais, Malvina e Antonio.

Aos meus irmãos, Rosana e Marco Antonio.

Aos meus cunhados, Angela e Flávio,
por todo o amor, apoio e paciência em todos os momentos.

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a todos os amigos espirituais por terem me abençoado e me dado forças para concluir mais essa etapa da minha jornada evolutiva.

À minha família, por todo o apoio, incentivo e por acreditar em mim em todos os segundos dessa caminhada.

À Dr.^a Marlete Brum Cleff pela orientação, confiança, paciência e por todas as oportunidades de crescimento profissional. Pessoa simples, íntegra exemplo de docente e pesquisadora.

À Dr.^a Maria Elizabeth Aires Berne pela co-orientação do trabalho e por disponibilizar o Laboratório de Helminologia, de forma irrestrita, para a realização dos trabalhos laboratoriais. Essa parceria foi essencial.

Ao Dr. Rogério Antonio Freitag por participar da banca, pela orientação referente à análise cromatográfica dos óleos essenciais e por disponibilizar o Laboratório para as extrações.

À Dr.^a Nara Amélia da Rosa Farias por aceitar o convite para fazer parte de minha banca examinadora.

A colega Victoria Moraes e todas as meninas do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais por terem realizado as extrações dos óleos essenciais.

À Dr.^a Isabel Madrid e a doutoranda Luciana Laitano pela paciência e orientação nas análises preliminares do experimento.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, em especial a Antonieta e seu Enilton, pela amizade, incentivo e ajuda sempre que necessário.

Ao secretário do PPGBBIO-UFPEL Christian Manetti Geisler pelo ótimo atendimento sempre que necessitei.

Ao colega Marco Aurélio, pela realização das análises em GC/FID, pela paciência e orientações sobre a técnica de análise cromatográfica.

Ao Grupo Fitopeet coordenado pela Prof.^a Marlete Brum Cleff.

Aos Pós-graduandos Leonardo, Natália, Michaela, Wesley, Antonieta e Rita.

Ao Prof. Cristiano Silva da Rosa Diretor do Hospital de Clínicas Veterinária pela disponibilidade de coleta junto ao canil.

Ao colega Leonardo Raffi por permitir a coleta no Canil Municipal de Pelotas, bem como aos funcionários pela ajuda durante as coletas.

À Prof.^a Dr.^a Cândida Renata Jacobsen de Farias do Dfs /FAEM pela amizade, compreensão e incentivo.

Ao colega do Departamento de Fitossanidade/FAEM Sérgio Francisco Freitas pelo companheirismo e amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção.

À Universidade Federal de Pelotas por me possibilitar concluir o mestrado.

Aos animais, nossos companheiros nesta caminhada evolutiva, merecedores do nosso respeito, admiração e esforços. Em especial as minhas cachorras Bela e Bolinha.

Enfim, agradeço a todos que passaram pela minha vida nesses dois anos de pós-graduação, amigos, colegas, professores, que de alguma forma contribuíram para a minha formação, não apenas profissional como pessoal.

**« Ninguém é suficientemente perfeito,
que não possa aprender com o outro
e, ninguém é totalmente destituído de
valores que não possa ensinar algo ao
seu irmão. »**

São Francisco de Assis

Resumo

AZAMBUJA, Rosaria Helena Machado. **Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae, sobre ovos de *Ancylostoma* spp.** 2015. 61f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas.

Os Ancilostomídeos são parasitos que contaminam o meio ambiente e determinam, nos animais e no homem, infecções parasitárias de importância em saúde pública. A prevalência de ancilostomídeos de caráter zoonótico é elevada no sul do Rio Grande do Sul e, somado a isso, alguns endoparasitos de animais de companhia estão resistentes a determinados anti-helmínticos. Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-helmíntica, in vitro, de óleos essenciais da família Lamiaceae, frente a ovos de *Ancylostoma* spp. obtidos de cães naturalmente infectados, assim como avaliar a composição química desses óleos essenciais. Para tal, foram realizados testes de eclodibilidade larvar, onde os ovos do parasito foram expostos a concentrações de 2,5% a 0,07% dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum majorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). O ensaio foi acompanhado de um controle positivo com cloridrato de tiabendazole (0,025 mg/mL), um controle negativo com água destilada e o controle com tween 80. A composição química de cada amostra de óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). Observou-se que todos os óleos apresentaram ação anti-helmíntica, sendo que o percentual de inibição da eclodibilidade do óleo de alecrim foi de 100% na concentração de 12,5mg/ml e maior que 90% nas concentrações de 7,5mg/ml e 3,1mg/ml, ficando acima de 50% na concentração de 1,55mg/ml e abaixo na de 0,75mg/ml e 0,35mg/ml. Quanto ao óleo essencial de orégano, as concentrações de 10mg/ml, 5mg/ml e 2,48mg/ml apresentaram um percentual inibitório de 100%, enquanto que a concentração de 1,24mg/ml ficou acima de 90%. A concentração de 0,6mg/ml ficou acima de 50% e a de 0,28mg/ml ficou abaixo desse percentual inibitório. O óleo essencial de manjerona obteve 100% de inibição da eclosão nas concentrações de 15mg/ml, 7,5mg/ml e 3,72mg/ml, sendo que o percentual foi acima de 90% na concentração de 1,86mg/ml, enquanto que a de 0,9mg/ml ficou acima de 50% e a 0,42mg/ml abaixo. Os compostos químicos majoritários para o *O. vulgare* foram o 4-terpineol (27,24%), timol (19,78%) e gama terpineno (14,23%), enquanto que para o óleo essencial de *O. majorana* foram identificados o 4-terpineol (35,99%), gama terpineno (16,76%) e o alfa terpineno (11,43%), e para o óleo de *R. officinalis* observou-se cineol (42,12%), cânfora (16,37%) e alfa pineno (14,76%) como componentes majoritários. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que, nas condições do ensaio, os óleos essenciais de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *O. majorana* inibem a eclodibilidade de ovos de *Ancylostoma* spp, podendo ser uma alternativa promissora para o controle dessa parasitose, sendo necessários estudos adicionais.

Palavras-chave: Lamiaceae. Nematódeo. Ovos. Fitoterápico.

Abstract

AZAMBUJA, Rosaria Helena Machado. **Essential oils from the Lamiaceae family prospection on *Ancylostoma* spp. eggs**. 2015. 61 pg. Dissertation (Mesters Degree) – Biochemical and Biopropection Post Graduation Program. Federal University of Pelotas

The hookworms are parasites that contaminate the environment and determine, in animals and humans, parasitic infections of public health importance. The prevalence of zoonotic hookworms is elevated in the south of Rio Grande do Sul and, added to this, some pets endoparasites are resistant to certain anthelmintic. Thus, the work aimed to evaluate the anthelmintic activity, in vitro, of essential oils of the Lamiaceae family compared to *Ancylostoma* spp. eggs obtained from naturally infected dogs as well as to assess the chemical composition of essential oils. For such, larval hatchability tests were performed, where the eggs of the parasite were exposed to concentrations of 2.5% to 0.07% of essential oils of *Origanum vulgare* (oregano), *Origanum majorana* (marjoram) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). The test was followed by a positive control containing thiabendazole hydrochloride (0.025 mg/mL), a negative control with distilled water and the control with tween 80. The chemical composition of each sample of the essential oils was determined by gas chromatography attached to the mass spectrometer (GC-MS). It was observed that all essential oils have shown anthelmintic activity and it was noticed that the percentage of hatchability inhibition of rosemary oil was of 100% in the concentration of 12,5%, higher than 90% in the concentrations of 7,5mg/ml and 3,1mg/ml, as wel as, higher than 50% in the concentration of 1,55mg/ml, although it was lower than it in the concentrations of 0,75mg/ml and 0,35mg/ml. Regarding to the oregano essential oils, the concentrations of 10mg/ml, 5mg/ml and 2,48mg/ml have presented an inhibitory percentage of 100%, while the concentration of 1,24mg/ml has presented a value higher than 90% and it was higher than 50% in the concentration of 0,6mg/ml. However, the percentage was lower than it in 0,28mg/ml. On another hand, the marjoram essential oil has presented 100% of hatchability inhibition in the concentrations of 15mg/ml, 7,5mg/ml and 3,72mg/ml, higher than 90% 1,86mg/ml, higher than 50% in 0,9mg/ml and lower than it in 0,42mg/ml of concentration. The major chemical compounds for the *O. vulgare* were 4-terpineol (27.24%), thymol (19.78%) and gamma terpinene (14.23%), while for the *O. majorana* essential oil, 4-terpineol (35.99%), gamma terpinene (16.76%) and alpha-terpinene (11.43%) were identified and, for the *R. officinalis* oil, cineole (42.12%), camphor (16.37%) and alpha-pinene (14.76%) were observed as major components. According to the results, it can be stated that, under the test conditions, the *R. officinalis*, *O. vulgare* and *O. majorana* essential oils have activity in the hatchability inhibition of *Ancylostoma* spp eggs, what can be a promising alternative for controlling this parasitosis, being further studies necessary.

Keywords: Lamiaceae. Nematode. Eggs. Phytotherapics.

Lista de Quadros

Quadro 1: Principais grupos de endoparasitocidas para uso em caninos e felinos25

Lista de Tabelas

Tabela :1	Resultado dos testes de inibição da eclodibilidade larval dos óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> , <i>O. majorana</i> e <i>R. officinalis</i> nas concentrações de 0,07% a 2,5%.....	42
-----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

μL:	microlitro
μm:	micrômetros
AchE:	acetil -colinesterase
AOC-20i:	auto injetor
B.O.D:	Estufa incubadora refrigerada tipo B.O.D(demanda bioquímica de oxigênio)
CCD:	cromatografia em camada delgada
CG:	cromatografia gasosa
CGL:	cromatografia gás-liquido
CGS:	cromatografia gás-sólido
CLAE/HPLC:	cromatografia líquida de alta eficiência high performance liquide chromatography
D.U.S.N:	neurorretinite sub-aguda difusa unilateral
DAD:	espectrofotometria U.V-visível
EC:	eletroforese capilar
EPF:	exame parasitológico de fezes
eV:	eletrovolts
GABA:	ácido gama-aminobutírico
GC/MS-QP:	cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
L1:	larva de primeiro estágio - rabditóide
L2:	larva de segundo estágio - filarióide
L3:	larva de terceiro estágio - infectante
LMC:	larva migrans cutânea
m/z:	massa/carga
min:	minuto
ml:	mililitros
MS e MS-MS:	espectrometria de massas
Pour-on:	via de administração tópica
RMN:	ressonância magnética nuclear
RTX-5MS:	coluna capilar
U.V:	ultravioleta
UR:	umidade relativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
	Objetivo Geral	17
	Objetivos Específicos.....	17
	Avaliar o potencial ovicida <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> , <i>Origanum majorana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i> , frente ao <i>Ancylostoma</i> spp. de cães	17
	Determinar a melhor concentração ovicida dos óleos essenciais.....	17
	Determinar a composição fitoquímica e os constituintes majoritários dos óleos essenciais, através de análise cromatográfica	17
3	REVISÃO DE LITEATURA	18
	Ancylostomídeos	18
	Morfologia, ciclo evolutivo e epidemiologia do <i>Ancylostoma caninum</i>	19
	Patogenia do <i>Ancylostoma caninum</i>	22
	Diagnóstico	23
	Tratamento da Ancilostomose em Animais de Companhia.....	23
	Anti-helmínticos e seus mecanismos de ação	26
	Resistências aos anti-helmínticos	27
	Perspectivas do uso de plantas medicinais como agentes anti-helmínticos.....	28
	Família Lamiaceae.....	31
	Métodos de análise da atividade anti-helmíntica	34
	Métodos cromatográficos para a identificação dos óleos essenciais	35
4	ARTIGO	38
	Atividade <i>in vitro</i> dos óleos essenciais da família Lamiaceae, sobre ovos de <i>Ancylostoma</i> spp	39
5	CONCLUSÃO.....	44

6	REFERÊNCIAS	45
	ANEXOS.....	57

1 Introdução

Os cães foram os primeiros animais a serem domesticados e sua relação com os humanos foi sendo modificada ao longo do tempo, sendo que, atualmente, estes preenchem um espaço importante dentro das famílias, tanto no aspecto social, quanto terapêutico, influenciando diretamente na qualidade de vida das pessoas. Estudos demonstram que famílias que possuem animais de estimação gastam menos com remédios (CRUZEIRO DO SUL, 2013).

No Brasil, o mercado de animais domésticos, incluindo produtos e serviços têm crescido de forma significativa e, segundo dados recentes da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), o segmento faturou R\$ 14,2 bilhões no ano de 2013 (ABINPET/GE-INTERHA, 2014).

A interação do homem com os animais de estimação, embora salutar, requer cuidados em relação à sanidade e bem-estar dos mesmos, principalmente, quanto às doenças com potencial zoonótico, destacando-se as parasitárias. Os endo e ectoparasitas acometem rebanhos e levam a perdas econômicas na cadeia produtiva brasileira, sendo que essa também é a realidade quando se trata de animais de companhia, onde se tem uma alta casuística de endoparasitos, com grande prevalência de *Ancylostoma* spp. na espécie canina, cuja importância em saúde pública é incontestável (ROBERTSON & THOMPSON, 2002; ARAÚJO, 2007).

Os ancilostomídeos são helmintos nematódeos pertencentes à família Ancylostomatidae, sendo denominados de ancilóstomos devido à postura característica de suas extremidades anteriores em forma de gancho (URQUHART et al., 2009). A maioria das espécies parasita o intestino delgado, se alimentando de sangue de seus hospedeiros definitivos. Dentro dessa família existem subfamílias, sendo que duas apresentam importância para a parasitologia médica e veterinária, sendo estas a Ancylostomatinae e a Bunostomatinae. (REY, 2008;

NEVES, 2011). Os principais representantes dessas subfamílias são *Ancylostoma caninum* (ERCOLANI, 1859), e *Ancylostoma braziliense* (FARIA, 1909), *Ancylostoma tubaeforme* (ZEDER, 1800), *Ancylostoma ceylanicum* (LOOS, 1911), *Ancylostoma duodenale* (DUBINI, 1943) e *Necator americanus* (STILES, 1902).

Na espécie humana, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* causam a ancilostomíase, uma das mais prevalentes doenças parasitárias crônicas no mundo, e a necatoríase, respectivamente, levando o indivíduo a um parasitismo intestinal com presença de anemia e hipoproteinemia (REY, 2008). No cão *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* são os principais agentes etiológicos da ancilostomose, parasitose intestinal que acomete animais jovens até um ano de idade e filhotes, devido às infecções lactogênicas e à imaturidade do sistema imunológico dos cães (DIAS et al., 2013).

Ancylostoma caninum possui ampla distribuição geográfica e grande prevalência no ambiente onde convivem pessoas e cães, ocasionando um risco para a saúde desses indivíduos. A principal fonte de contaminação para os humanos são os ambientes públicos, como praças, parques e praias, onde os cães parasitados defecam, eliminando ovos que contaminam o solo. As larvas eclodidas podem causar, em humanos, Larva Migrans Cutânea, dermatozoonose de importância em saúde pública (PEREA et al., 2013; FUINI et al., 2014; LOPES et al., 2014).

No Brasil, diversos estudos foram conduzidos para demonstrar a prevalência dos ancilostomídeos parasitando animais e contaminando o meio ambiente, com percentuais que variam de 22,2% (GUIMARÃES et al., 2005), 38,2%, (STALLIVIERE et al., 2013), 62% (GALLINA et al., 2011) chegando a 88,4% no estudo conduzido por Hofstätter et al.(2013).

Associada à alta taxa de parasitismo tem-se as dificuldades enfrentadas em relação ao tratamento dos animais infectados, devido ao fenômeno adaptativo de resistência aos anti-helmínticos. De acordo com alguns trabalhos, a frequência de utilização dos compostos antiparasitários e/ou a rápida alternância entre estes, são os principais fatores responsáveis pelo desencadeamento do processo de seleção em uma população de parasitos. Esse processo ocorre de maneira gradativa e acredita-se que, quanto maior a eficácia da droga e seu uso, mais acentuado será o processo de seleção por organismos resistentes ocorrendo a

simples eliminação dos parasitos mais sensíveis a partir do uso exagerado de anti-helmínticos (ANDRADE, 2008; KOPP et al., 2008).

Diante desta realidade, tem-se incentivado as pesquisas com plantas medicinais, em busca de novas moléculas e novos métodos de tratamento, destacando-se o uso de óleos essenciais (CARNEIRO et al., 2015), o que é muito promissor, já que o Brasil apresenta uma das floras mais ricas do mundo, com mais de 56000 espécies de plantas (KLEIN et al., 2009; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011). Com a ideia de implementar e oficializar o uso das plantas, o país criou o Comitê Técnico Temático de Apoio a Políticas de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2011).

São encontrados diversos trabalhos sobre plantas bioativas da família *Lamiaceae* para o controle dos parasitos de ruminantes, especialmente, frente ao nematódeo gastrintestinal *Haemonchus* spp., entretanto, na área de animais de companhia, os estudos da atividade e eficácia anti-helmíntica de plantas usadas na medicina popular são escassos, embora o saber popular seja uma fonte rica em informações a serem pesquisadas.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Verificar a ação anti-helmíntica de óleos essenciais da família *Lamiaceae* sobre ovos de *Ancylostoma* spp.

Objetivos Específicos

Avaliar o potencial ovicida in vitro dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, sobre *Ancylostoma* spp. de cães.

Determinar a melhor concentração ovicida dos óleos essenciais para classificá-los segundo o índice de eficácia proposto pelo World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Determinar a composição fitoquímica e os constituintes majoritários dos óleos essenciais, através de análise cromatográfica.

3 Revisão de Literatura

Ancylostomídeos

Os ancilostomídeos fazem parte do Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida, Família Ancylostomatidae (BLAXTER et al., 1998; CHILTON et al., 2006). Os integrantes adultos dessa família se caracterizam, morfológicamente, por apresentarem sistema digestório completo, com uma cápsula bucal bem desenvolvida, armada com dentes ou lâminas quitinosas cortantes na porção anterior, sistema nervoso e excretor e dimorfismo sexual, onde as fêmeas são maiores que os machos e apresentam poro genital na metade do corpo, enquanto os machos possuem a cápsula copuladora na porção posterior do corpo (REY, 2001).

Dentre os nematoides que parasitam o intestino delgado de cães, destacam-se *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* (CURY; LIMA, 2002). Em humanos, a larva infectante dessas espécies causam a larva migrans cutânea, e a fase de L3 do *A. caninum* pode estar envolvida em casos de neurorretinite sub-aguda difusa unilateral (D.U.S.N) (CASELLA et al., 2001).

Casos de infecção entérica em humanos por *A. caninum*, foram relatados na Austrália, América do Sul, Filipinas, Israel e União Européia (ROBERTSON; THOMPSON, 2002; KATAGIRI & OLIVEIRA-SIQUEIRA, 2007). No cão, seu hospedeiro definitivo, determina um quadro de gastroenterite, principalmente em animais jovens, causando grandes perdas de ninhadas (URQUHART et al., 2009).

A. caninum é usado como modelo biológico para estudos das demais espécies de Ancylostomídeos, a fim de melhor entender sua ecologia, padrões de transmissão e resistência às drogas, para que se elaborem estratégias de controle das parasitoses (MIRANDA, 2007).

Morfologia, ciclo evolutivo e epidemiologia do *Ancylostoma caninum*

Ancylostoma caninum possui três pares de dentes na margem ventral da capsula bucal, que se apresenta profunda e infundibuliforme. No fundo dessa estrutura, há um par de dentes triangulares dorsais e um par de dentes ventrolaterais. A espécie apresenta dimorfismo sexual, sendo os machos possuidores de um sistema reprodutor composto de testículo, canal deferente, vesícula seminal, canal ejaculador e cloaca e, como órgãos sexuais acessórios, a bolsa copuladora bem desenvolvida na região posterior, espículos e gubernáculo (SOULSBY, 1982). O sistema reprodutor das fêmeas é composto por ovários, ovidutos, úteros, ovejetores, vagina e vulva, cuja abertura está localizada no terço posterior do corpo. O comprimento dos machos varia de 9 a 13 mm, enquanto o das fêmeas de 14 a 20 mm. As fêmeas são ovíparas, fazendo postura de ovos morulados, elípticos, de casca fina, medindo 54-77 µm de comprimento, por 34-44,7 µm de largura.

A morfologia de *A. braziliense* é muito semelhante à de *A. caninum*, podendo ser diferenciado pela capsula bucal, que apresenta um par de dentes laterais bem desenvolvidos e, na porção média, um par de dentes rudimentares e, também, através da bolsa copuladora. O comprimento dos machos varia de 5 a 7,5 mm e das fêmeas de 6,5 a 10,5 mm (FORTES, 2004).

Os ovos das diversas espécies de ancilostomídeos são muito parecidos, ovóides ou elípticos, de casca fina e transparente podendo possuir de uma a três camadas, sendo a interna lipoproteica, a intermediária quitinosa e a externa vitelínica (BIRD; BIRD, 2012). Nas fezes, a célula-ovo começa a segmentação formando quatro, oito ou mais blastômeros, que se desenvolveram até chegar a larva de 1º estágio, passando posteriormente a larvas de 2º e 3º estádios, de acordo com condições ambientais favoráveis (BOWMAN, 2006).

As formas larvárias do *A. caninum* fazem parte do ciclo de vida exógeno que ocorre no meio ambiente, assim, tem-se a larva de primeiro estágio (L1), a larva de segundo estágio, (L2) e a de terceiro estágio, denominada de L3 ou larva infectante. As larvas de primeiro e segundo estádios apresentam conformação rhabditóide em função da morfologia do esôfago, enquanto que a de terceiro estágio possui configuração filarióide, pois o esôfago se apresenta de forma cilíndrica, alongada e sem bulbo. As formas larvais trocam a cutícula através de

ecdises, sendo que a L3 apresenta dupla cutícula, em função da manutenção da cutícula do estágio larval anterior, que oblitera a cavidade bucal impedindo a sua alimentação (TAYLOR et al., 2010).

O ciclo evolutivo é direto, e os parasitas adultos se localizam no intestino delgado do hospedeiro definitivo, onde se fixam na mucosa intestinal por meio de suas cápsulas bucais dotadas de três pares de dentes marginais. As fêmeas, após a cópula, realizam a oviposição de milhares de ovos por dia, em média, 16000 ovos/dia, que são liberados para o meio exterior juntamente com as fezes dos hospedeiros (SANTARÉM et al., 2011). O desenvolvimento dos estágios pré-parasitários no solo depende de condições favoráveis como oxigenação, umidade e temperatura adequadas, uma vez obedecidas essas condições, tem-se, num período de 24 a 48 horas, uma larva rabditóide de primeiro estágio, conhecida como larva L1. Essa larva eclode do ovo e, em contato direto com o meio ambiente, se alimenta de matéria orgânica e microrganismos para uma posterior muda para mais dois estágios larvais que são: L2 (rabditóide) e L3 (filarióide e infectante). A larva filarióide não se alimenta mais, migrando para as partículas superiores do solo, onde aguarda contato com o hospedeiro definitivo (SOULSBY, 1982; FORTES, 2004).

Os hospedeiros definitivos podem se infectar por diversas vias, como através da via oral, percutânea, transplacentária e transmamária. O modo de infecção mais comum é a passiva, sendo que uma vez ingeridas, as larvas L3 passam pelo estômago e perdem a cutícula externa e, após três dias, migram para o intestino delgado e penetram nas células de Lieberkühn, onde ocorre a muda para a larva L4. Posteriormente, essas voltam à luz do intestino, transformam-se em adultos jovens, que realizarão a hematofagia e cópula (REY, 2008; NEVES, 2011). Dentro de 14 a 21 dias de infecção, os ovos podem ser encontrados nas fezes dos hospedeiros, fechando o ciclo de vida (URQUHART et al., 2009).

A distribuição geográfica de *A. caninum* é ampla nos trópicos e regiões temperadas quentes. Em áreas endêmicas, a doença é mais comum em cães com menos de um ano de idade, já nos animais mais velhos, a doença clínica é menos provável devido ao desenvolvimento de imunidade específica. A epidemiologia está associada com as duas principais fontes de infecção, a

transmamária em filhotes de cães lactentes e a percutânea ou oral, a partir do ambiente (URQUHART et al., 2009).

Os fatores ambientais, que influenciam o desenvolvimento das larvas infectantes-L3, estão relacionados com a temperatura, precipitação pluviométrica e natureza do solo, sendo que, a temperatura de 21-27°C é a ideal para o desenvolvimento da L3, bem como, uma distribuição regular das chuvas, uma vez que a L3 é sensível à dessecação e também ao excesso de chuva. Os solos argilosos são desfavoráveis, enquanto que os arenosos e ricos em matéria orgânica são os mais favoráveis ao desenvolvimento larval (URQUHART et al., 2009; DE OLIVEIRA FIGUEIREDO et al., 2012).

Guimarães et al. (2005), ao avaliar amostras de solo coletadas em escolas/creches de Lavras MG, observaram um percentual de 22,2% de contaminação por ovos de *Ancylostoma* sp.. Em outro estudo, Gallina et al. (2011) avaliaram a contaminação de amostras de solo do Campus Universitário do Município de Pelotas, RS, demonstrando contaminação ambiental, onde se destacaram a presença de ovos de *Toxocara* spp. e de ancilostomídeos em 62% das amostras avaliadas. Moura et al. (2013), avaliaram amostras de solo de oito praças do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, no período de junho de 2010 a maio de 2011 encontrando contaminação do solo em todas as praças avaliadas, com maiores índices de positividade para ovos de ancilostomídeos (13,5%) e ovos de *Toxocara* spp. (8,8%).

Stalliviere et al. (2013), demonstraram uma prevalência de 38,2% de helmintos intestinais em populações de cães domiciliados em Lages/SC, destacando-se o gênero *Ancylostoma*. Em Botucatu, SP, foram registrados percentuais de 31,9%, por Oliveira-Sequeira et al. (2002), enquanto Prates et al. (2009), em Maringá/PR, registraram 18,5% de *Ancylostoma* spp. Os resultados obtidos por Costa e colaboradores (1990), em Vitória/ES, demonstraram um percentual de isolamento de 88,5%; Gennari et al. (1999), em São Paulo/SP, obtiveram 20,40%; Araújo (2006), em Viçosa/MG, 18,53%; Vasconcelos et al. (2006), no Rio de Janeiro/RJ, 34,8%. Trabalhos desenvolvidos no sul do RS obtiveram percentuais preocupantes: Scaini et al. (2003), trabalhando com amostras do balneário Cassino/RS, obteve 71,3% de *Ancylostoma* spp., enquanto que Hofstätter et al. (2013), em Pelotas/RS, 88,4%, demonstrando alto percentual do gênero em amostras de fezes de cães errantes

Patogenia de *Ancylostoma caninum*

A ação dos helmintos sobre o hospedeiro altera as funções orgânicas, uma vez que determina perda de peso, perda sanguínea e proteica, ação obstrutiva e compressiva, menor digestão e absorção dos nutrientes da dieta ocasionando um crescimento tardio (ALMEIDA; AIRES, 2006). Nos cães, a gravidade das infecções provocadas pelo *A. caninum* depende de fatores relacionados ao parasito como o número de formas infectantes, e relacionados ao hospedeiro como, a via de infecção, o estado nutricional, a resposta imune e a idade destes (LOUKAS; PROCIV, 2001).

Como exemplo, temos a infecção transmamária que pode ser fatal para cães jovens, devido à grande passagem de larvas pelo leite ou, ainda, provocar quadros de anemia hemorrágica aguda ou crônica, seguida de diarreia com hematoquezia, podendo evoluir para caquexia e morte. Em cães adultos, podem causar deficiência de ferro e anemia hipocrômica microcítica. O *Ancylostoma braziliense* pode, também, infectar cães e gatos, determinando os mesmos sintomas que o *A. caninum*, entretanto, com menor intensidade, devido à menor patogenicidade (URQUHART et al., 2009).

As larvas infectantes do *A. caninum* e do *A. braziliense* não atingem a maturidade sexual na espécie humana, desta forma penetram na pele do hospedeiro acidental através dos folículos pilosos e dos orifícios das glândulas sebáceas e começam a migração quatro dias após a penetração, causando uma dermatite linear serpiginosa, conhecida como Larva Migrans Cutânea. As larvas são envolvidas em uma película protetora, permeável apenas por gases, e quando são atraídas pela elevada concentração de dióxido de carbono na pele do hospedeiro acidental, perdem suas carapaças, liberando enzimas, como proteases e hialuronidases, que permitiram a migração através da epiderme (HOLTEZ et al., 1992; VELHO, 2003).

No local da penetração, a larva provoca eritema ou pápula, acompanhada de prurido. A migração produz túneis de trajetos irregulares entre a epiderme e a derme, com a presença de uma reação inflamatória com predominância de células eosinofílicas e mononucleares. A lesão pode se transformar em piodermatite devido à contaminação bacteriana secundária. As principais áreas

afetadas são o dorso, a sola dos pés, nádegas, cintura pélvica, pernas e ombros (REY, 2008; NEVES, 2011).

Diagnóstico

O diagnóstico é feito através da anamnese, observação clínica, sendo complementado por exames laboratoriais como o hemograma e o exame parasitológico de fezes- EPF, tanto para a espécie humana, como para os caninos, sendo que para humanos, têm-se ainda os testes imunológicos.

Os sinais clínicos mais intensos da ancilostomose canina ocorrem nos filhotes, que apresentam inapetência, baixa vitalidade e mucosas pálidas, enquanto que no cão adulto a infecção pode levar a queda de pelos, pelagem sem brilho, vômitos esporádicos, diarreia ou fezes com estrias de sangue (URQUHART et al., 2009).

O exame laboratorial de hemograma em geral, revela anemia normocítica normocrômica na fase inicial da doença, seguida por uma anemia hipocrômica se persistir a infecção, enquanto que o exame coproparasitológico ovos do parasito, que no caso do *A. caninum* se apresentam com a forma arredondada ou elipsóide, medindo 54-75µm e de coloração acastanhada.

A técnica de Willis Mollay é a mais utilizada para diagnosticar helmintoses gastrintestinais de animais de companhia, devido à simplicidade de execução e o baixo custo, entretanto a técnica de centrifugo-flutuação vem sendo usada para o diagnóstico quando a carga parasitária é baixa, demonstrando alta eficiência. Os ovos de ancilostomídeos são muito semelhantes entre as diferentes espécies, apresentando também pouca variação de tamanho, portanto essas características não se constituem em critérios para o diagnóstico diferencial em fezes (REY, 2008; CRINGOLI et al., 2010; PELCHEBISKI, 2010).

No caso de larva migrans cutânea, a lesão é patognomônica, sendo diagnosticada pela observação clínica. Deve-se considerar que cães lactentes podem demonstrar sintomatologia clínica grave antes da detecção de ovos nas fezes, em função da infecção transmamária (URQUHART et al., 2009).

Tratamento da Ancilostomose em Animais de Companhia

O tratamento das parasitoses está condicionado ao uso de drogas com ação anti-helmíntica, que podem ser classificadas em grupos farmacológicos distintos, de acordo com o seu mecanismo de ação, assim, tem-se as drogas que atuam no sistema neuromuscular, no metabolismo energético, na reprodução e na potencialização do ácido γ -aminobutírico (GABA) dos parasitos. Os endoparasiticidas também podem ser classificados, de acordo com o seu espectro de ação, em antinematódeos, anticestódeos, antitrepatódeos e antiprotozoários (SANTARÉM et al., 2008).

De acordo com a formulação, os anti-helmínticos podem ser administrados aos animais por via oral, intra-ruminal, parenteral ou cutânea (pour-on). Os principais endoparasiticidas comercializados no Brasil para o tratamento de cães e gatos estão apresentados no Quadro 1.

A eficácia dos medicamentos com ação anti-helmíntica está relacionada a fatores referentes ao parasito, ao próprio medicamento e ao hospedeiro, portanto, conhecer a epidemiologia da doença se faz necessário, a fim de usar o anti-helmíntico de forma racional, preservando o princípio ativo e evitando, assim, o precoce estabelecimento do fenômeno da resistência anti-helmíntica.

O controle biológico é uma técnica alternativa para diminuir populações de pragas que comprometem a produção de plantas e animais utilizando para isso agentes antagonistas naturais como os fungos nematófagos (RIBEIRO, 2003; MACIEL et al., 2010). Frassy et al. (2010), avaliaram *in vitro* a ação ovicida do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Toxocara canis* em diferentes intervalos de tempo e sugerem o uso deste fungo como uma alternativa de controle biológico dos ovos embrionados de *Toxocara canis*, pois causa a sua destruição.

Maciel, Araújo e Cecon (2006) avaliaram a capacidade predatória de três isolados das espécies de fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* no controle *in vitro* de larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães e observaram que as espécies podem ser utilizados para controlar no ambiente as fases pré-parasitárias de *Ancylostoma* spp. de cães.

GRUPO FARMACOLÓGICO	PRINCÍPIO ATIVO	ASSOCIAÇÕES	MECANISMO DE AÇÃO	ESPECTRO DE AÇÃO
Benzimidazóis -	Albendazol Febantel Fembendazol Mebendazol		Inibição da síntese de microtúbulos pela inibição da β -tubulina	Nematódeos gastrintestinais (Ascarídeos, Ancilostomídeos, Trichuris)
Imidazotiazóis	Levamisol Tetramisol	Tetramisol + Disofenol		Ascarídeos, Filarioides
Compostos Heterocíclicos Simples	Piperazinas		Agonistas do GABA Morte por paralisia flácida	Ascarídeos (<i>Toxocara canis</i> , <i>Toxocara cati</i> , <i>Toxascaris leonina</i>)
Lactonas Macroclícas	Avermectinas: Selamectinas Ivermectinas Milbemicina oxima	Ivermectina + Pamoato de pirantel; Milbemicina oxima + praziquantel	Abertura dos canais de cloro pela ligação com receptores de glutamato, com morte do parasito por inanição	Microfilárias de <i>Dirofilaria immitis</i> , <i>Toxocara canis</i> , <i>Toxocara cati</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> , <i>Ancylostoma tubaeforme</i>
Pyrimidinas	Pamoato de Pirantel Pamoato de oxantel		Inibição da AchE ,com morte por paralisia espástica	Ascarídeos, Ancilostomídeos, Oxyuris, Parascaris, Trichuris
Substitutos Fenólicos	Disofenol Nitroscanato		Interfere nas reações mitocondriais	Nematódeos e cestódeos
Isoquinolonas	Praziquantel	Benzimidazol* Pyrimidinas* Lactona Macroclíca*	Aumenta a permeabilidade aos íons cálcio, inibindo a captação de glicose	Cestódeos
*Praziquantel+pamoato de Pirantel;Praziquantel+Febantel+pamoato de pirantel;Praziquantel+Fembendazol+Pamoato de pirantel;Praziquantel+Pamoato de Pirantel+Pamoato de Oxantel;Praziquantel+Ivermectina+Pamoato de Pirantel;Praziquantel+Fembendazole+Pamoato de Pirantel+Ivermectina				

Quadro 1: Principais grupos de endoparasiticidas para uso em caninos e felinos.

Fonte: (adaptado de ANDRADE, 2008).

Anti-helmínticos e seus mecanismos de ação

Os principais grupos de antihelmínticos recomendados para o tratamento dos endoparasitos dos animais de companhia são os benzimidazóis, compostos heterocíclicos simples, lactonas macrocíclicas, pirimidinas, substitutos fenólicos e as isoquinolonas. Para os caninos, especificamente para o tratamento da ancilostomose, têm sido utilizados os benzimidazóis, lactonas macrocíclicas e as pirimidinas, sendo que desses encontramos na maioria das formulações o febantel, a ivermectina, e o pamoato de pirantel associados ao cestodicida praziquantel (ANDRADE, 2008).

A ligação do febantel à tubulina do parasito resulta na sua despolimerização e, conseqüente modificação dos microtúbulos, sendo assim, os processos vitais para a função celular como a divisão mitótica, transporte de nutrientes e alterações na forma da célula ficam comprometidas. O febantel também inibe a enzima fumarato - redutase nas reações dentro da mitocôndria, portanto bloqueia a via respiratória do parasito impedindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) resultando no esgotamento das reservas energéticas e morte do nematódeo por inanição (ALMEIDA; AIRES, 2006).

A ivermectina induz a paralisia do parasito por ligar-se aos canais de cloro ativados por glutamato, que estão presentes nas células nervosas ou musculares dos nematódeos, causando hiperpolarização devido ao aumento de íons cloreto dentro da célula. Como os canais de cloro estão expressos nas células da musculatura faríngea desses parasitos, o comportamento alimentar desses nematódeos fica inibido levando a morte por inanição (McCARTHY; LOUKAS; HORTEZ, 2012).

O pamoato de pirantel e pamoato de oxantel são agonistas colinérgicos. Estes sais ligam-se aos receptores de acetilcolina, estimulando sua ação, resultando em excesso de despolarização de membranas com repetidas contrações levando o parasito à morte por paralisia espástica (SANTARÉM; ANDRADE; ALBERTI, 2008; KOOP et al., 2008).

Resistências aos anti-helmínticos

A resistência anti-helmíntica é um fenômeno relatado no mundo todo e ocorre devido ao uso indiscriminado e contínuo de fármacos, levando à seleção de populações geneticamente resistentes, sendo assim, os parasitos, que não são mais sensíveis ao princípio ativo, sobrevivem e passam essa característica à sua progênie. O fenômeno de resistência aos endoparasiticidas tem sido descrito em muitos animais, como os ruminantes, cães, gatos entre outros, e será monogênico, quando apenas um único gene conferir resistência ao grupo químico, como no caso dos benzimidazóis, e poligênico, quando mais de um gene estiver envolvido na determinação da resistência, como no caso das lactonas macrocíclicas (XU et al., 1998; PRICHARD, 1994; SCHWENKENBECHER; KAPLAN, 2009).

As alterações na expressão gênica estão associadas com resistência a várias classes diferentes de anti-helmínticos. No grupo dos benzimidazóis, a resistência está associada à perda de receptores de alta afinidade de ligação dos benzimidazóis à tubulina, pela mutação nos genes para tubulina-b. A resistência das pirimidinas se deve às modificações das propriedades do receptor nicotínico para acetilcolina, já no grupo das macrolactonas, a resistência parece estar associada à alteração de conformação dos canais de cloro e maior produção de glicoptoteína-P. (BEECH et al., 2010).

Os animais de produção são expostos aos princípios ativos dos endoparasiticidas de forma mais intensa e indiscriminada do que os cães e gatos, portanto poderíamos pensar que a resistência anti-helmíntica não se constituísse problema nos animais de companhia, contudo já existem trabalhos demonstrando uma menor eficácia de alguns compostos. No estudo de Kopp et al. (2007), foram infectados artificialmente 12 cães com *A. caninum* e após o estabelecimento completo da infecção os animais foram tratados com pamoato de pirantel, ao final foi evidenciado uma redução de 25,7% na contagem de vermes nos cães tratados, representando uma baixa taxa de eficácia do vermífugo.

O estudo conduzido por Bourguinat et al. (2011), demonstrou a resistência da *Dirofilaria immitis* a lactona macrocíclica em um cão tratado repetidas vezes para a dirofilariose. A genotipagem das microfilárias revelou a presença de polimorfismo genético no gene que codifica a glicoproteína P,

estando presente numa frequência de 45,3% das microfilárias sobreviventes aos repetidos tratamentos com altas doses do anti-helmíntico.

Pulaski et al. (2014), pesquisaram a resistência anti-helmíntica do grupo lactona macrocíclica a *Dirofilaria immitis* através de infecção experimental em cães. Após a infecção estabelecida, um cão em cada grupo foi tratado com 12 ug/kg de ivermectina e com controle por via subcutânea, durante 6 meses. Ambos os grupos desenvolveram infecção para *D. immitis*, sendo comprovada por teste para antígeno de dirofilária e do grupo tratado também foram recuperadas larvas infectantes de 2ª geração, confirmando a herdabilidade de resistência.

Furtado et al. (2014), investigaram polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) no isotipo 1 gene β -tubulina, em códons 198 e 200 para verificar a associação do SNPs com resistência do *A. caninum* aos benzimidazóis. Os parasitos foram recuperados de cães naturalmente infectados a partir de dois estados brasileiros, Minas Gerais e Piauí, sendo analisadas um total de 234 amostras entre os dois estados através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). A presença de um SNP na posição 200 foi observada em uma frequência baixa (0,8%), o que só foi detectado na população do Estado de Minas Gerais, enquanto que nenhum SNP foi detectado na posição 198 do gene. Concluiu-se que o alelo relacionado à resistência aos benzimidazóis presentes em nematódeos de ruminantes estava presente numa frequência baixa no *Ancylostoma caninum*.

Perspectivas do uso de plantas medicinais como agentes anti-helmínticos

O emprego da fitoterapia faz parte da história da humanidade, sendo utilizada como forma de tratamento das enfermidades, tanto do homem como dos animais (FOX, 1997; GASBARRE et al., 2001; BEZERRA, 2009). As plantas são uma fonte inesgotável de pesquisa, uma vez que apresentam muitos compostos com ação medicinal que ainda não foram estudados, assim sendo, existe uma necessidade premente de investimentos na pesquisa de moléculas bioativas, a fim de manter a saúde das pessoas e dos animais, preservando o meio ambiente. Neste sentido, o Ministério da Saúde, através da implementação da Política

Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (Decreto nº 5.813, 22 de junho de 2006) vem estimulando a pesquisa de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), e valorizando o conhecimento popular a respeito das plantas medicinais (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Na área de parasitologia veterinária o uso de extratos e óleos essenciais 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, contamos com recursos naturais que, em relação a anti-helmínticos convencionais, possuem baixo custo, menores efeitos colaterais e prolongam o aparecimento de resistência anti-helmíntica (NERY, et al., 2009; DE CASTRO, 2012; SOUSA, et al., 2013). Sendo assim, inúmeras famílias botânicas tem sido alvo de estudos, a fim de se determinar as propriedades antiparasitárias em diferentes espécies animais (FURTADO, 2006; FARIAS et al., 2010; BRITO et al., 2011; DE CASTRO et al., 2012; FUJIMOTO; COSTA; RAMOS, 2012; MONTEIRO, 2012; SANTOS et al., 2013).

O estudo etnoveterinário retrospectivo do uso de plantas medicinais realizado por Furtado (2006) evidenciou as famílias com maior número de espécies citadas com atividade antiparasitária, que foram: *Asteraceae* (17 spp), *Fabaceae* (15 spp), *Lamiaceae* (10 spp) e *Meliaceae* (5 spp). As famílias *Caricaceae*, *Chenopodiaceae*, *Curcubitaceae* e *Malvaceae* apresentaram espécies com ação anti-helmíntica, mas em menor número. Vale salientar que existem outras famílias botânicas com ação antiparasitária tais como: *Rubiaceae*, *Annonaceae*, *Chenopodiaceae*, *Rutaceae*, *Verbenaceae* entre outras, que não foram citadas neste trabalho.

Farias et al. (2010) avaliou, *in vitro*, cinco diluições (100, 50, 30, 25, 10%) do óleo de semente de *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) frente a larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos e ovinos, encontrando redução bastante efetiva no número de larvas totais dos caprinos tratados nas concentrações de 100, 50 e 30%, enquanto que nos ovinos observou-se redução altamente efetiva no número de larvas totais em todos os tratamentos.

Monteiro, 2012 comparou o potencial anti-helmíntico do extrato etanólico com o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) no

controle de *Ancylostoma* spp em cães. O teste *in vitro* do extrato etanólico, em diferentes concentrações, não apresentou efeito larvicida sobre as L3 do parasito, já o óleo essencial apresentou ação larvicida com percentuais crescentes de 88, 33%, 95% e 100% nas concentrações de 50 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ e 150 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, respectivamente. No teste *in vivo* a formulação de biscoito manipulado com a concentração de 37,5 $\mu\text{l.g}^{-1}$ do óleo essencial de *C. ambrosioides* L. apresentou resultado satisfatório na redução do número de ovos por grama de fezes em cães naturalmente infectados com *Ancylostoma* spp.

A eficácia de sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*) foi avaliada para o controle de parasitos de lambari (*Astyanax cf. zonatus*). Os peixes foram divididos em quatro grupos (peixes em jejum, alimentados com ração comercial, alimentados *ad libitum* com abóbora e com mamão). O grupo alimentado com abóbora apresentou melhor eficácia no controle de nematoides do intestino e do estômago (95,26% e 92,48%). No controle de monogenéticos o mamão obteve 72% de eficácia (FUJIMOTO; COSTA; RAMOS, 2012).

Estudos sobre o efeito anti-helmíntico da folha do noni (*M. citrifolia*) sobre *A. galli*, demonstraram que o extrato aquoso da folha do noni, no teste *in vitro* e na concentração de 13,92 mg.mL⁻¹, causou mortalidade de 96,67% após 96 horas de tratamento, assemelhando-se ao controle positivo (piperazina a 50 mg.mL⁻¹) que causou 100% de mortalidade (BRITO et al., 2011).

Castro et al., 2012 avaliou a ação ovicida do extrato aquoso de *Ocimum basilicum*, conhecido popularmente como manjeriço, frente a nematódeos gastrintestinais de ovinos. Nas concentrações de 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5% e 1,25%. O teste *in vitro* demonstrou que o extrato foi eficiente nas duas maiores concentrações, 40% e 20%, demonstrando o percentual de 100% de eficácia, enquanto que nas concentrações de 10% e 5% o percentual ficou acima de 50%.

Os extratos hidroalcoólicos de dez plantas coletadas na região do Vale do Paraíba foram avaliados quanto ao seu potencial ovicida e larvicida ante *Ancylostoma* spp. na espécie canina. No teste ovicida, nenhum dos extratos vegetais apresentou atividade frente ao parasito nas diluições avaliadas, no entanto no teste preliminar de atividade larvicida foi observado que dentre as dez espécies avaliadas a *Nerium oleander*, *Allamanda cathartica*, *Mirabilis jalapa* e *Brugmansia suaveolens* apresentaram atividade larvicida nas diluições de

50mg/ml, 25mg/ml e 12,5mg/ml, induzindo mortalidade em 100% das larvas. Após o teste complementar com as espécies de melhor desempenho observou-se que apenas dois extratos, dos quatro inicialmente selecionados, foram considerados ativos na concentração de 12,5 mg/ml, *Mirabilis jalapa* e *Brugmansia suaveolens* (SANTOS, 2013).

Família Lamiaceae

A família botânica Lamiaceae apresenta distribuição orbícula, sendo, constituída de 236 gêneros e aproximadamente 7500 espécies com plantas de constituição normalmente herbáceas e arbustivas ricas em óleos voláteis. Segundo a APG III (2009), a família apresenta sete subfamílias e, no Brasil, existem cerca de 500 espécies distribuídas em 38 gêneros (SOUZA & LORENZI, 2012).

As principais espécies desta família são o alecrim, a sálvia, o orégano, o tomilho, o manjerição, a manjerona e a menta. A composição rica em óleos essenciais é motivo de grande interesse econômico para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, despertando o interesse pelas pesquisas dos extratos e óleos essenciais dessas plantas. Dentre estas espécies o *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* tem-se destacado pelas atividades biológicas comprovadas como antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, anti-helmínticas e inseticidas. Além desses atributos são aromáticas, sendo muito apreciadas como condimentos na culinária (VALERIANO, 2010; CLEFF et al., 2010; PEREIRA; PINHEIRO, 2013; DIAS DE CASTRO et al., 2013; SANTIN et al., 2014).

De forma geral, as espécies da família Lamiaceae apresentam um conjunto de características botânicas muito específicas, como caules quadrangulares, folhas opostas, flores bilabiadas, dois estames pequenos e dois grandes, e um fruto que apresenta quatro sacelos duros e arredondados, embora cada planta possua seu aspecto particular (PELT, 2003; LAMIACEAE, 2015).

O gênero *Origanum* pertence à família Lamiaceae, sendo essa composta por 3 grupos, 10 secções, 38 espécies e 17 híbridos, caracterizando assim uma diversidade morfológica e química (SOUZA, 2005). A planta *Origanum vulgare*, também conhecida como orégão, é perene, herbácea, baixa e rasteira (0,25-

0,40m) de caule quadrangular de coloração púrpura, com folhas ovaladas opostas e ramos longos. As raízes são adventícias e as flores são de cor avermelhada ou rósea. A palavra orégano tem origem grega e significa “alegria da Montanha”, sendo que Corre no Sul da Europa e Oriente Médio como planta silvestre e cultivada. Como planta cultivada ocorre em vários países para uso condimentar. Esta planta é rica em óleo essencial que apresenta como constituintes principais o timol, metil-chavicol, linalol, eugenol, cineol e pireno. (BORGES et al., 2012). Na medicina popular a planta é usada para o tratamento de doenças do pulmão, afecções estomacais, infecções parasitárias, doenças fúngicas e bacterianas, dores musculares e articulares (OLIVEIRA, 2003; SANTURIO et al., 2011; CASTRO et al., 2013; SANTIN et al., 2014).

Origanum majorana, popularmente conhecida como manjerona, é perene, herbácea, baixa (0,30-0,50m), apresentando raiz principal bastante ramificada, caule lenhoso na base e ramos finos e longos, folhas simples ovaladas de cor esbranquiçadas e flores pequenas brancas ou púrpuras. Embora originária do Mediterrâneo e Oriente Médio, é cultivada em regiões subtropicais e temperada da América como planta condimentar (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2012). Na composição do óleo essencial de manjerona tem sido descrita a presença de mirceno, γ -terpinene, alfaterrineno, p-cimeno, borneol, timol, carvacrol, beta cariofileno, limoneno, alfafineno, betapineno, linalol e sabineno (BORGES et al., 2012). Como planta medicinal é indicada para tratar gripes, cólicas menstruais, afecções de pele e gastrointestinais, verminoses, tumores, paralisias, entorses e traumatismos (SILVA, 2012).

Rosmarinus officinalis é um arbusto com cerca de 1,50 m de altura, perene, caule lenhoso, muito ramificado, folhas verdes na face superior e esbranquiçadas na inferior, flores pequenas de coloração variável, podendo ser branca, azulada, purpúrea ou, mais comumente, lilás-clara. A planta é comum na região do Mediterrâneo de onde é originária, mas ocorre naturalmente em regiões de clima temperado e quente (LORENZI E MATOS, 2006). Essa planta em condições tropicais floresce o ano todo e no Sul do Brasil do final de agosto até o término do verão (BIASI, 2009).

Devido ao seu aroma característico, foi chamada pelos romanos de *rosmarinus*, que significa “Orvalho do Mar” em latim. No Brasil o alecrim é conhecido popularmente como alecrim-do-jardim, alecrim-rosmarinho, alecrim de

casa, erva-da-graça, rosmarino, rosa-marinha e rosmarinho. As propriedades terapêuticas do alecrim têm sido descritas nos quadros de obstrução nasal, como antisséptico, como cicatrizante, antiespasmódico e estimulante (LORENZI; MATOS, 2006; DE MELO FREIRE et al., 2012). Ao óleo essencial tem sido conferida ação antimicrobiana, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis, destacando-se os compostos citral, geraniol, linalol, confeno e timol, entre outros (SIMÕES et al., 2003).

As plantas aromáticas, através de seu metabolismo secundário, sintetizam grupos de princípios ativos, entre eles os óleos essenciais, que são produtos odoríferos e voláteis, líquidos à temperatura ambiente e constituídos por uma mistura de hidrocarbonetos, alcoóis e aromáticos, podendo ser encontrados em compartimentos especializados distribuídos na casca, folhas, flores rizomas e sementes da planta (RAVEN et al., 2007). Na família Lamiaceae as estruturas especializadas em secretar esse material lipofílico são chamadas de idioblastos, cavidades, ductos, superfícies epidérmicas, tricomas e emergências (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

As diferentes espécies dessa família produzem muitos metabólitos secundários, que geralmente, possuem estrutura química complexa determinando a diversidade de compostos bioativos resultando inúmeras atividades biológicas (AGRA et al., 2007). Os produtos do metabolismo secundário podem ser divididos em três grandes grupos segundo a sua biossíntese: terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos (SIMIONATTO, 2004).

A composição química dos óleos voláteis pode variar de acordo com fatores inerentes a planta, como a localização do óleo nas diferentes partes de uma mesma planta e formas de defesa química da planta frente a alguma injúria, e de acordo com fatores abióticos como época de coleta, condições climáticas e de solo, horário de coleta, presença de poluentes ambientais e temperatura de secagem da planta que determinaram diferenças na composição de óleos extraídos de um mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal (BLANCO et al., 2000; EDRIS, 2007; CHEN, 2008; DE MORAES, 2009).

No processo de extração do óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e micro-ondas que serão escolhidos em função das necessidades da pesquisa. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de

hidrodestilação através do sistema extrator Clevenger, por ser economicamente viável e por extrair adequadamente os óleos essenciais (SANTOS et al., 2004).

A atividade anti-helmíntica do orégano, da manjerona e do alecrim tem sido estudada mais intensamente nos nematódeos da família *Trichostrongylidae*, onde o principal representante é o *Haemonchus* Dias de Castro et al.(2013);no entanto dentro da família *Ancylostomatidae* as pesquisas com as plantas supracitadas, para o gênero *Ancylostoma*, são incipientes, sendo assim podemos verificar a necessidade de estudos dessas plantas não só para animais de produção, mas também para os de companhia, uma vez que possuem importância como agentes transmissores de doenças para o homem.

Métodos de análise da atividade anti-helmíntica

A validação de plantas medicinais requer muitas etapas desde a seleção da planta até a comercialização do produto final que deve ser eficiente e seguro para uso em humanos e animais. O levantamento botânico da planta a ser pesquisada constitui a primeira etapa da validação, seguida pelos testes farmacológicos pré-clínicos e clínicos. Nesta etapa são realizados estudos para avaliar a eficácia podendo ser conduzidos *in vitro* e *in vivo*, e os testes de margem de segurança que são realizados utilizando-se animais de laboratório com a finalidade de se determinar os efeitos causados no organismo vivo. A parte final da validação da planta medicinal consiste no fornecimento de informação a comunidade, seguida pela comercialização da planta *in natura*, com instruções de preparo e a venda de fitoterápicos padronizados e estáveis (RATES, 2001).

Os estudos fitoquímicos na área de parasitologia veterinária cresceram nos últimos anos, tanto no Brasil como em outros países motivados pelo aparecimento da resistência anti-helmíntica, tanto para os animais de produção como para os de companhia (KOOP et al., 2007; COSTA et al., 2011; JAISWAL et al., 2013; GEURDEN et al., 2014).

A necessidade de se descobrir novas moléculas fez com que as técnicas usadas para a determinação de resistência a endoparasitocidas comerciais fossem adaptadas à pesquisa com fitofármacos, sendo assim muitos são os testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a eficácia anti- helmíntica e a segurança dos extratos e óleos essenciais (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; KATIKI,2011). Para testes

com as formas larvais temos o teste de eclodibilidade larvar (EHT), teste de desenvolvimento, teste de inibição do desembainhamento, teste de inibição da migração, teste de inibição da alimentação larvar, com relação aos vermes adultos os mais utilizados são os testes de motilidade, teste de desafio direto in vitro. Na sequência da investigação tem-se os testes pré-clínicos de eficácia in vivo, testes toxicológicos e testes clínicos de eficácia in vivo. A escolha do melhor método irá depender do objetivo do estudo, uma vez que os extratos e óleos essenciais podem interferir no ciclo de vida do parasito em diferentes fases do mesmo (COLES et al.,1992; CHAGAS, 2008).

Os testes de eficácia *in vitro* são realizados no início da pesquisa com o intuito de selecionar as plantas mais promissoras diminuindo gastos, tempo e evitando o uso desnecessário de modelos biológicos. Para a determinação do potencial anti-helmíntico das plantas podem ser realizados os testes de inibição da eclosão de ovos, de motilidade ou de desenvolvimento larvar de nematoides, além de ensaios com nematoides de vida livre, como *Caenorhabditis elegans*. Os testes de eficácia e segurança *in vivo* serão realizados com os melhores resultados da triagem *in vitro*. Nesta etapa serão realizados os testes pré-clínicos de eficácia *in vivo*, testes toxicológicos e testes clínicos de eficácia *in vivo* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; CHAGAS, 2008).

Nesta pesquisa o potencial anti-helmíntico dos óleos essenciais de orégano, manjerona e alecrim foram avaliados através do teste da eclodibilidade larvar (Egg Hatch Test - EHT), portanto somente essa técnica será descrita. O teste de inibição da eclosão de ovos é amplamente utilizado para avaliar a capacidade anti-parasitária das plantas. Este ensaio consiste em expor cerca de 100 a 150 ovos/vol do parasito, coletados de fezes de animais infectados, aos extratos ou óleos essenciais, em diferentes concentrações, dentro de placas de microcultivo de 24 poços ou tubos de ensaio que serão incubados por 48 h em B.O.D (Estufa incubadora refrigerada). (28°C E UR > 80%). Pode-se utilizar como controle positivo o tiabendazole. O controle negativo é composto de água destilada e Tween 80. Após o período de incubação uma gota de lugol é adicionada em cada poço e os ovos e L1 eclodidas são quantificados para o cálculo do percentual de inibição da eclodibilidade larvar (COLES et al., 1992).

Métodos cromatográficos para a identificação dos óleos essenciais

Para a utilização de produtos baseada em plantas na terapêutica, tanto humana como animal, há a necessidade de comprovação prévia de sua eficácia e segurança, sendo assim faz-se necessário a adoção de procedimentos de controle de qualidade, desde o plantio até o produto final pronto para a dispensação. (MELO et al., 2007). As metodologias usadas para o controle de qualidade do material vegetal passam por métodos físico-químicos, como a análise cromatográfica, métodos botânicos para a identificação da espécie vegetal e métodos microbiológicos para avaliar a contaminação por microrganismos (ROCHA et al., 2004).

A determinação da constituição química da amostra pode ser feita por diferentes técnicas cromatográficas: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC). A associação entre técnicas cromatográficas e espectrométricas vem contribuindo para a eficiência na identificação dos constituintes das plantas, fornecendo informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes das amostras. Neste sentido, observamos a associação do CLAE e CG com técnicas espectrométricas como: espectrofotometria de UV-visível (DAD), espectrometria de massas (MS e MS-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) (LIANG et al., 2004). Os principais métodos de separação utilizados são a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE) devido à capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, petroquímicas, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004; SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel passa através de uma fase estacionária imiscível disposta em uma coluna ou sobre uma superfície sólida. Os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases ocorrendo diferentes graus de interação entre elas, levando a formação de diferentes velocidades de migração determinando a separação dos constituintes da amostra (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A técnica de cromatografia gasosa (CG) se divide em cromatografia gás-líquido (CGL) e gás-sólido (CGS). A diferença está na fase estacionária, enquanto na primeira a fase estacionária é um líquido imobilizado na superfície de um

suporte sólido, na segunda é um sólido chamado de coluna capilar. A fase móvel da CG é denominada de gás de arraste, sendo o hélio o mais comumente usado. A amostra é injetada em uma coluna, onde vaporiza sendo levada pelo gás de arraste entrando em contato com a fase estacionária. Essa interação da amostra com a fase estacionária determina a saída dos compostos em diferentes tempos de retenção. Na saída da coluna há um detector que torna possível a quantificação dessas substâncias (BONATO, 2007).

4 Artigo

Atividade dos óleos essenciais da família Lamiaceae, sobre ovos de *Ancylostoma* spp.

Rosaria Helena Machado Azambuja¹, Maria Elizabeth Berne Aires³, Rogério Antonio Freitag⁴, Marco Aurélio Ziemann dos Santos⁵, Roger Vasques Marques⁶, Marlete Brum Cleff²

*

Formatado de acordo com as normas da Revista Zoonoses and Public Health como nota (Brief Communication)

ESSENTIAL OILS FROM THE LAMIACEAE FAMILY *IN VITRO* ACTIVITY ON *ANCYLOSTOMA* SPP EGGS.

Rosaria Helena Machado Azambuja^{1*}, Maria Elizabeth Aires Berne³, Rogério Antonio Freitag⁴, Marco Aurélio Ziemann dos Santos⁵, Roger Vasques Marques⁶, Marlete Brum Cleff²

¹MV. in Biochemistry and Bioprospection Post Graduation Program, Federal University of Pelotas

²DSc. Veterinary Clinics Department, Veterinary College, Federal University of Pelotas

³DSc. Microbiology and Parasitology Department of the Biology Institute, Federal University of Pelotas

⁴DSc. Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food Center, Federal University of Pelotas

⁵MSc. Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food Center, Federal University of Pelotas

⁶MSc. Science and Food Technology Post Graduation Program, Federal University of Pelotas

Impacts

- Among the small intestine parasites of dogs, *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* are highlighted and their larvae cause a dermatosis in humans, called Migrans Cutaneas Larvae, turning it of relevance in public health.
- These parasites prevalence in the environment is huge and the public places are the main source of humans contamination, such as parks, squares and beaches, where the infected defecate, delivering eggs that contaminate the environment.
- These parasites control is done through commercial endoparasitocides. However, the plants use is promising on diminishing the parasitory charge in the environment.

Keywords: Lamiaceae, nematode, eggs, phytotherapics.

Correspondence:

1841, Lobo da Costa Street, ap. 104, Downtown, Pelotas – RS. ZIP CODE: 96010150
Telephone: 55 53 91240418
Email: rosariahmz@terra.com.br*

Summary

The hookworms are parasites that contaminate the environment and determine, in animals and humans, parasitic infections of public health importance. The prevalence of zoonotic hookworms is elevated in the south of Rio Grande do Sul and, added to this, some pets' endoparasites are resistant to certain anthelmintic. Thus, the work aimed to evaluate the

anthelmintic *in vitro* activity of essential oils from the Lamiaceae family on the *Ancylostoma* spp. eggs obtained from naturally infected dogs as well as to assess the chemical composition of essential oils. For this, larval hatch tests were performed when parasites' eggs were exposed to different concentrations of the essential oils of *Origanum vulgare* (oregano), *Origanum majorana* (marjoram) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). It was observed that the hatchability inhibitory percentage was of 100% in the concentrations of 12,5mg/ml of rosemary oil; 10mg/ml, 5mg/ml and 2,48mg/ml of oregano; and 15mg/ml, 7,5mg/ml and 3,72mg/ml of marjoram oils. The test was followed by a positive control containing thiabendazole hydrochloride (0.025 mg/mL), a negative control with distilled water and the control with tween 80. The chemical composition of each sample of the essential oils was determined by gas chromatography attached to the mass spectrometer (GC-MS). According to the results, it can be stated that, under the test conditions, the *R. officinalis*, *O. vulgare* and *O. majorana* essential oils have activity in the hatchability inhibition of *Ancylostoma* spp eggs, what can be a promising alternative for controlling this parasitosis, decreasing the environmental contamination. Further studies are necessary.

Introduction

The interaction between man and pets, even though healthy, asks for some cares regarding to sanity and well fare of both of them, special in relation to zoonotic diseases, highlighting the parasites. The endo and ectoparasites reach entire herds and lead to huge economic losses on the Brazilian productivity chain, being this a reality in company animals too that have an endoparasites cause increase, with high prevalence of *Ancylostoma* spp. on the canine species whose importance in the public health is undoubted (Lopes et al., 2014).

The hookworms are helminth nematodes that belong to the Ancylostomatidae family. The species majority parasite the small intestine, feeding themselves with their definite hosts' blood. In canines, the *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* are the main etiological agents of ancilostomosis, and, once *Ancylostoma caninum* has a wide geographical distribution and a huge prevalence in the environment where humans and dogs interact, it cases a risk to these individuals' health. The main sources of humans' contamination are the public environments where infected dogs defecate, delivering eggs that contaminate the soil, fact that can lead to the *Cutaneous Migrants* Larvae, a dermatozoonosis of importance in the public health (De Silva, 2003). In Brazil, studies are being performed intending to show the prevalence of the hookworms infecting animals and environment with percentages that vary from 22,2% (Guimarães et al., 2005), 62% (Gallina et al., 2011), 38,2% (Stalliviere et al., 2013) reaching to 88,4% in a study conducted by Hofstätter et al. (2013).

Associated to the high level of parasitism, there are the difficulties in relation to the infected animals' treatment due to the anthelmintic resistance adapt phenomenon.

According to some studies, the antiparasitic compose use frequency, and/or the rapid rotation among them, are the main responsible factors for triggering the selection process in a parasite population. This process

occurs in a gradual way and it is believed that as higher the drug efficiency as bigger the resistant organisms selection process, leading to a simple elimination of the more sensitive parasites due to an exaggerated anthelmintic use (Koop et al., 2008; Furtado et al., 2014).

Facing this reality, researches with medicinal plants are being stimulated, searching for new molecules and new treatment methods, being the essential oils from the Lamiaceae family plants highlighted. Thus, this study aims were to verify the anthelmintic activity *in vitro* of the Lamiaceae family essential oils on the *Ancylostoma* spp. eggs in dogs and point out the main chemical components of them.

Materials and methods

The experiment was conducted following a completely casual design, in a bifactorial schema with four repetitions, where the first factor was the "oil source" (rosemary; marjoram, oregano) and the second factor "oil concentration" (0,07%; 0,15%; 0,31%; 0,62%; 1,25%; 2,5%). The evaluated variable was the hatchability inhibition percentage of *Ancylostoma* spp eggs.

The larvae egg hatch tests (Egg Hatch Test- EHT) were performed in micro-culture boards of 24 wells, distributed in six concentrations (2,5 to 0,07%) of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* and *Rosmarinus officinalis* along the suspension containing nearly 150 eggs of the parasite. In addition, it was included a test with mineral oil p.a. degree as the essential oil control, as well as, thiabendazole hydrochloride (0,025 mg/mL) as a positive control and distilled water as a negative control and a control with tween 80 was used to emulsify the essential oil. The boards were sealed with plastic film and incubate in B.O.D. stove type at 28°C with 80% of relative humidity per 36h. The boards reading were done with the auxiliary of an inverted light microscope.

The plants of the *O. vulgare*, *O. majorana* and *R. officinalis* species were acquired from a commercial distributor (Luar

Sul®), with quality and origin certification. The naturally infected dogs' faeces samples were collected and stocked in plastic bags, carefully identified and sent to the laboratory for being immediately analysed and, then processed through the Willis Mollay's fluctuation technique (Willis, 1921) to determine the samples positivity for the *Ancylostoma* spp eggs. To the eggs recovering, positive faeces were processed according to the technique described by Kerboeuf (1992), with changes, followed by the eggs quantification.

The oil stratification technique was equal for the three plants following the Brazilian Pharmacopeia IV instructions. After the stratification, the obtained oil was dried in anhydrous sodium sulfate, stocked in an amber bottle and kept under refrigeration until they are being used in the tests.

The essential oils 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 oil samples were diluted in hexane (analytic degree, ultra pure).

The results were expressed by the hatchability inhibition percentage media of the quadruplicate, being the effectiveness of each treatment in the eggs hatch test determined according to the Equation:

$$IE = \frac{L}{L + V} \cdot 100$$

Where, "IE" is the hatchability inhibition percentage, "L" is the number of hatched larvae and "V" is the eggs number.

Results and discussion

The GC/MS gas chromatography of the *R. officinalis* essential oil has shown a presence of 18 compounds, being the main constitutes of it cineol (42,12%), camphor (16,37%) and alpha pinene (14,76%), while in the *O. vulgare* were found 17 compounds, among them, 4-terpineol (27,24%), timol (19,78%) and gamma terpinene (14,23%) were the majority; for the *O. majorana* oil, 14 compounds were identified, where 4 terpineol (35,99%), gamma terpinene (16,76%) and alpha terpinene (11,43%) were the main ones. The variations observed on the essential oils analysis were already expected once biotic and abiotic factors can interfere on the income and composition of a plant. (Gobbo-Neto, 2007).

In the hatchability tests, the positive control has shown an inhibition of 100% of the eggs hatch, meanwhile the negative control and the tween 80 have presented an average of 97,73% and 93%, respectively, of hatchability, showing a great feasibility of *Ancylostoma* spp. eggs, obtained from naturally infected dogs. In the test performed with mineral oil in the concentrations of 0,07% to 2,5%, it was possible to observe that there have been an egg hatch of 98,57%. This evaluation has become important once has shown that the activity of the essential oils from the Lamiaceae family observed was not due to the mechanic action that the oil could be imposing on the eggs surface, but it was due to the bioactive compounds presence that interfere on the hatchability.

The three studied plants essential oils samples have presented an anthelmintic action on the *Ancylostoma* spp. eggs, in increasing percentages in the tested concentrations, what is shown in Tab. 1

Table 1: Larvae hatchability inhibition tests results of the essential oils of *O. vulgare*, *O. majorana* and *R. officinalis* in the concentrations of 0,07% to 2,5%.

Oils concentration in %	<i>Origanum vulgare</i> (mg/ml)	Inhibition percentage (%)	<i>Origanum majorana</i> (mg/ml)	Inhibition percentage (%)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (mg/ml)	Inhibition percentage (%)
0,07	0,28	23,60	0,42	14,96	0,35	12,62
0,15	0,60	76,11	0,90	78,24	0,75	32,81
0,31	1,24	96,16	1,86	99,00	1,55	69,98
0,62	2,48	100	3,72	100	3,10	95,77
1,25	5,00	100	7,50	100	7,50	99,31
2,50	10,00	100	15,00	100	12,5	100

According to the classification of anthelmintic products index proposed by the Word Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), the most promising concentrations of the essential oils *in vitro* tested are 3,1mg/ml to 12,5mg/ml for rosemary, 1,24mg/ml to 10mg/ml for oregano and 1,86mg/ml a 15mg/ml for marjoram.

The comparison among the different botanic genre in this study has shown that the rosemary action was superior in relation to marjoram all concentrations, except in 7,5mg/ml when anthelmintic action was equal. When compared to oregano, it was lower once it was necessary higher concentrations to obtain the same result.

The *R. officinalis* oil used in this study has presented high concentrations (42,12%) of cineol, fact that has probably influenced on the activity in the *Ancylostoma* spp.. Macedo et al. (2009), evaluated *Eucalyptus globulus* essential oil action on *Haemonchus contortus* eggs and larvae relating the ovicide and larvicide to high concentrations of monoterpene 1,8-cineol long other compounds, justifying the action for being the compound highly hydrophobic, acting on the cellular membrane causing damages to the cells.

Regarding to the different *Origanum* species, it was possible to observed that oregano was superior in relation to marjoram in all concentrations tested, even though marjoram has presented higher taxes of 4-terpineol compared to oregano. It was possibly due to the

synergism of n4-terpineol with thymol and gamma tipernene on the oregano composition. Studies have shown that thymol has a huge capacity of inhibition of the acetylcholinesterase activity as well as influence on the calcium delivering of the myocyte sarcoplasmic reticulum, effecting muscle excitation and contraction, causing paralysis (Sárközi et al., 2007).

4-terpineol has been also described as a compound that acts inducing deformation on microorganisms' cell membranes, consequently altering their permeability, what could have happened on the *Ancylostoma* spp. eggs case, favoring the *O. vulgare* and *O. majorana* oils activity, once studies have already shown their larvicide action (Santos, 2014).

Though the tested oils have presented an anthelmintic action on the *Ancylostoma* spp. eggs, inhibiting their hatch, they haven't prevented the eggs blastomeration with the 1th larvae stadium formation in all concentrations tested. However, they have shown an activity on this larval phase on their cuticle surface, where they presented themselves with no motility and with morphological changes. Probably, the oils action on the parasite cuticle has determined alterations on the larvae physiology (L1) due to changes in the protein conformation on the plasmatic membrane of the parasite cuticle, determining the larvae paralysis (Macedo et al., 2009).

The observed result is full of importance once, preventing that L1 does the molting, then, there won't be the

infective larvae formation, and so, *Ancylostoma* spp. cycle, contributing with the parasite environmental control.

Conclusion

The essential oils of the *O. vulgare*, *O. manjorana* and *R. officinalis* present a lavericide action in all concentrations tested on the *Ancylostoma* spp., turning it a promising alternative to control this parasite, decreasing, this way, the environmental contamination and preserving the human and animal health. Further studies are necessary.

Acknowledgments

To the Natural Products Research Laboratory and Chromatography Laboratory, Organic Chemistry Department, Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences Center, Federal University of Pelotas. To the Helminthology Laboratory, Parasitology and Microbiology Department, Biology Institute, Federal University of Pelotas. To the Municipal Kennel of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. To the Veterinary Ambulatory and Veterinary Clinics Hospital Favet/UFPel. To Luar Sul Industry and Commerce of food products. 616, João Waldemar da Fontoura Street, Universitário, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

References

- DE SILVA, N. R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P.J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends. Parasitol.**, v. 19, n. 12, p. 547-51, 2003.
- FURTADO, L. F. V. et al. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3, p. 313-316, 2014.
- GALLINA, T. et al. Presence of eggs of *Toxocara* spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 41-42, abr./jun. 2011.
- GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GUIMARÃES, A. M. et al. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 293-295, 2005.
- HOFSTÄTTER, B. D. M. et al. Prevalence of helminth eggs in dog feces in urban areas of Pelotas, RS, Brazil. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 18, ed. 241, art. 1595, set. 2013.
- HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.
- KOPP, S. R. et al. Application of *in vitro* anthelmintic sensitivity assays to canine parasitology: detecting resistance to pyrantel in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 284-293, apr. 2008.
- LOPES, T. V. et al. "Parasitas zoonóticos em fezes de cães de praças públicas em municípios da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil." **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 8.2 (2014): 242-250.
- MACEDO, Iara TF et al. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of Eucalyptus globulus essential oils on *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.
- SANTOS, S. R. L. **Síntese e atividade de compostos potencialmente larvicidas frente ao *Aedes aegypti***. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.
- SÁRKÖZI, S.; ALMÁSSY, J.; LUKÁCS, B.; DOBROSI, N.; NAGY, G.; JÓNA I. Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine receptor. **J Muscle Res Cell Motil** 28:167-74, 2007.
- STALLIVIERE, et al. Helintos intestinais em cães domiciliados e aspectos socioeconômicos e culturais das famílias proprietárias dos animais de Lages, Santa Catarina, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.3, p.22-27, 2013.
- WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Med. J. Aust.**, v. 29, p. 375-376, 1921.013.

5 Conclusão

A partir dos resultados deste estudo foi possível concluir que:

Os óleos essenciais das espécies *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* apresentam atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre ovos de *Ancylostoma* spp.. Essa atividade, não foi ovicida, mas sim larvicida, em todas as concentrações testadas.

O óleo essencial de *Origanum vulgare* foi capaz de inibir a eclodibilidade de ovos de *Ancylostoma* spp. em concentrações inferiores às necessárias para o *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*.

Os óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*, além de inibir a eclodibilidade dos ovos de *Ancylostoma* spp. demonstraram atividade sobre a larva de 1º estágio que se mostrou modificada em sua cutícula e sem motilidade.

O composto majoritário no óleo essencial de alecrim (*R. officinalis*) foi o 1,8 cineol, enquanto que no de orégano (*O. vulgare*) e de manjerona (*O. majorana*) foi o 4-terpineol.

Os resultados obtidos são muito promissores, portanto novos testes com as concentrações obtidas na triagem inicial são necessários, a fim de se comprovar a ação dessas na eliminação de ovos e larvas do ambiente, ou a diminuição da fertilidade de fêmeas de *Ancylostoma* spp..

6 Referências

ABINPET- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Grupo de estudos sobre a interação humano e animal** (GE-INTERHA), 2014. Disponível em: < <http://abinpet.org.br/produtos-e-servicos/>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

AGRA, M. F; FRANÇA, P. F; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. C. Considerações gerais sobre os anti-helmínticos. In: SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 43, p. 519-523.

_____. Agentes antinematódeos. In:_____._____. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 45, p. 535-544.

ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. São Paulo: Roca, 2008, p. 936.

APG (Angiosperm Phylogeny Group) III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p.105-121, 2009.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. 3. ed. rev. e ampl. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2012. Cap. 7, p. 169-175.

ARAUJO, J. V. Helmintoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. **Rev. Ceres**, v. 53, p. 362-364, 2006.

ARAÚJO, M. J. **Fundamentos de agronegócios**. 2. ed. rev., ampl. e atualiz. São Paulo: Atlas, 2007.

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

AZAMBUJA, R. H. M. et al. Ação *in vitro* do óleo de *Origanum majorana* sobre a eclodibilidade de ovos de *Ancylostoma caninum*. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 15., 2013, Pelotas. **Anais...Pelotas: UFPEL**, 2013.

BARNETT, V.; LEWIS, T. **Outliers in statistical data**. 3th. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

BEECH, R. N. et al. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? **Parasitology**, v. 138, n. 2, p. 160-174, feb. 2010.

BEZERRA, S. B. **Atividade gastroprotetora e antimicrobiana do extrato seco de matricaria recutita (Camomila) e do Alfa-Bisabolol**: possíveis mecanismos de ação. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

BHATT, R.; MISHRA, N.; BANSAL, P. K. Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. **Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation**, v. 2, n. 2, p. 28-34, 2013.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Ed. Layer Studio Gráfico, 2009.

BIRD, A. F.; BIRD, J. **The structure of nematodes**. 2. ed. California: Academic Press, 2012.

BLANCO, M. C. S. G. et al. Influência da temperatura de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 901-903, 2000.

BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMAN P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J. R.; MACKEY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L. M.; VIDA, J. T.; THOMAS, W. K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, p. 71-75, 1998.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Ed. Unicamp, 2007. Cap. 8, p. 203-272.

BORGES, A. M. et al. Determination of essential oils of basil (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Ocimum gratissimum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Rev. bras. Plantas Med.**, v. 14, n. 4, p. 656-665, 2012.

BOURGUINAT, C. et al. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 388-392, 2011.

BOWMAN, D. D. **Parasitologia veterinária de Georgis**. 8. ed. Barueri: Manole, 2006. 422 p.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 14 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Departamento de Assistência Farmacêutica, 2006. 60 p.

BRITO, D. R. B.; FERNANDES, R. M.; LIMA, D. C. P.; SANTOS, R. S.; FERNANDES, M. Z. L. C. M.; FERREIRA, M. D. S.; DINIZ, B. L. M. Efeito anti-helmíntico da folha do noni (*Morinda citrifolia* L.) sobre *Ascaridia galli*. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 21, n. 1, p. 38-47, 2011.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Rev. bras. Plantas Med.**, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.

CARNEIRO, Fernanda Melo et al. Tendências dos Estudos com Plantas Medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais (ISSN 2238-3565)**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2015.

CARVALHO, C. O.; CHAGASB, A. C. S.; COTINGUIBAC, F. et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, n. 183, p. 260-268, 2012.

CASELLA, A. M. B. et al. Would *Ancylostoma caninum* be one of the agents of diffuse unilateral subacute neuroretinitis (D.U.S.N) in Brazil?. **Arq. bras. Oftalmol.**, v. 64, p. 473-476, 2001.

CASTRO, Luciana Laitano Dias de et al. *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 508-513, 2013.

CHAGAS, A. C. S. Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 25.; SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008.

CHEN, MS. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect. Science**, v.15, n. 2, p. 101-114, 2008.

CHILTON, N. B.; HUBY-CHILTON, F.; GASSER, R. B.; BEVERIDGE, I. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 40, p. 118-128, 2006.

CLEFF, M. B. et al. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arq. bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 5, p. 1291-1294, 2010.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; XAVIER, M. O.; SCHUCH, L. F.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, J. R. B. *In vitro* susceptibility of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.116-123, 2010b.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.

COSTA, J. O.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, W. S. et al. Frequência de endo e ecto parasitos de cães capturados nas ruas de Vitória - ES - Brasil. **Arq. bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 42, p. 451-452, 1990.

COSTA, M. S. V. L. F.; ARAÚJO, R. N.; COSTA, A. J. L. F.; SIMÕES, R. F.; LIMA, W. S. Anthelmintic resistance in a dairy cattle farm in the State of Minas Gerais. **Rev. bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2011.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; MAURELLI, M. P.; UTZINGER, J. FLOTAC: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. **Nature Protocols**, v. 5, p. 503-515, 2010.

CRUZEIRO DO SUL. A relação entre seres humanos e animais de estimação. Sorocaba, 24 maio 2013. Caderno Ela, p. 4. Disponível em: <http://www.cruzeirodosul.inf.br/materia/474869/a-relacao-entre-seres-humanos-e-animais-de-estimacao>. Acesso em: 2 nov. 2014.

CURY, M. C.; LIMA, W. S. Helmintos de cães e gatos. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 39, p. 12-35, 2002.

DE CASTRO, L. L. D.; AZAMBUJA, R. H. M.; MADRID, I. M.; BERNE, M. E. A.; CLEFF, M. B.. Atividade *in vitro* do óleo essencial de Orégano (*Origanum vulgare*) sobre a eclodibilidade de ovos de helmintos gastrintestinais de cães. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 4., 2012, Bagé. **Anais...** Bagé: UNIPAMPA, 2012. n. 4.

DE CASTRO, L. M.; PINTO, N. B.; BARBOSA, L. R. D.; DE CASTRO, L. L. D.; MADRID, I. M.; BERNE, M. E. A. Atividade ovicida do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* em parasitas gastrointestinais de ovinos. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 4., 2012, Bagé. **Anais...** Bagé: UNIPAMPA, 2012. n. 4.

DE MELO FREIRE, Isabelle Cristine et al. Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de Rosmarinus officinalis Sobre a Cinética do Crescimento de Candida albicans e Candida tropicalis. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 343-346, 2012.

DE MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, Maria Isabel et al. Levantamento sazonal de parasitos em caixas de areia nas escolas municipais de educação infantil em Uruguaiana, RS, BRASIL. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 1, 2012.

DIAS DE CASTRO, L. L. et al. Potencial ovicida de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) em nematódeos gastrintestinais de bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n.4, p. 508-513, dez. 2013. Disponível em: <<http://h200137217135.ufg.br/index.php/vet/article/view/22080>>. Acesso em: 21 Set. 2014.

DIAS DE CASTRO, L. L.; MADRID, I. M.; AGUIAR, C. L. G.; CASTRO, L. M.; CLEFF, M. B.; BERNE, M. E. A.; LEITE, F. P. L. *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.14, n. 4, p. 508-513, out/dez. 2013.

DIAS, S. R. C. et al. Evaluation of parasitological and immunological aspects of acute infection by *Ancylostoma caninum* and *Ancylostoma braziliense* in mixed-breed dogs. **Parasitology Research**, v. 112, n. 6, p. 2151-2157, 2013.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

FARIAS, M. P. O. ; TEIXEIRA, W. C.; WANDERLEY, A. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. 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.**, v. 12, n. 2, p. 220-226, 2010.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, 2004. p. 607.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 3-4, p. 285-308, 1997.

FRASSY, L. N.; BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; FERREIRA, S. R.; FREITAS, L. G. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydospori*. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, v. 1, n. 43, p.102-104, 2010.

FUJIMOTO, R. Y.; DA COSTA, H. C.; RAMOS, F. M. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). **Pesq. Vet. bras.**, v. 32, n. 1, p. 5-10, 2012.

FUINI, Daniele Cristina; JUNIOR, Neuri Biruel; PEREIRA, Marcy Lancia. Ocorrência de infecções por endoparasitas intestinais em cães do município de Campinas-SP. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 14, n. 22, p. 201-210, 2014.

FURTADO, L. F. V. et al. First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3, p. 313-316, 2014.

FURTADO, S. K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes in vitro e in vivo**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GALLINA, T. et al. Presence of eggs of *Toxocara* spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 41-42, abr./jun. 2011.

GARDIANO, C. G.; MURAMOTTO, S. P.; KRZYZANOWISKI, A. A.; ALMEIDA, W. P.; SAAB, O. J. G. A. Efeito de extratos aquosos de espécies vegetais sobre a

multiplicação de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 553-556, 2011.

GASBARRE, L. C.; STOUT, W. L.; LEIGHTON, E. A. Gastrointestinal nematodes of cattle in the northeastern US: results of a produced survey. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 29-44, 2001.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J. et al. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.

GEURDEN, T. et al. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. **Veterinary Parasitology**, n. 201, p. 59-66, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUIMARÃES, A. M. et al. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 293-295, 2005

HOFSTÄTTER, B. D. M. et al. Prevalence of helminth eggs in dog feces in urban areas of Pelotas, RS, Brazil. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 18, ed. 241, art. 1595, set. 2013.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Cromatografia gasosa. In: _____. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. Cap. 27, p. 802-824.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Introdução às separações cromatográficas. In:..... 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. Cap. 26, p. 775-798.

HOLTEZ, P. J.; NARASHIMAN, S.; HAGGERTY, J. et al. Hyaluronidase from infective *Ancylostoma* hookworm larvae and its possible function as virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. **Infec. Immun.**, v. 60, n. 3, p. 1018-1023, 1992.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

HUGHES, S.; KELLY, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 11, p. 577-588, 2006.

JACKSON, F.; HOSTE, H. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. **Springer**, London, p. 25-45, 2010.

JAISWAL, A. K.; V. SUDAN; D. SHANKER; P. KUMAR. Emergence of ivermectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats in a semi-organized farm of Mathura district - India. **Vet. Arhiv.**, v. 83, n. 3, p. 275-280, 2013.

Katagiri, S., & Oliveira-Sequeira, T. C. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. *Arquivos do Instituto Biológico*, 74(2), 175-184, 2007.

KATIKI, Luciana Morita. Atividade anti-helmíntica in vitro e in vivo de compostos fitoquímicos para o controle de nematóides gastrointestinais de ovinos. 2011.

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUÉGNARD, F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *MiniReviews Medicinal Chemistry* v. 8, p. 116-128, 2008.

KLEIN, T.; LONGHINI, R. BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KOOP, S. R.; KOTZE, A. C.; MCCARTHY, J. S.; COLEMAN, G. T. High-level pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 299-304, 2007.

KOPP, S. R. et al. Application of *in vitro* anthelmintic sensitivity assays to canine parasitology: detecting resistance to pyrantel in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 284-293, apr. 2008.

KOPP, S. R. et al. Phenotypic characterization of two *Ancylostoma caninum* isolates with different susceptibilities to the anthelmintic pyrantel. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 52, n. 11, aug. 2008.

KOPP, S. R. et al. Pyrantel in small animal medicine: 30 years on. **The Veterinary Journal**, v. 178, n. 2, p. 177-184, 2008.

LAMIACEAE. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2014. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Lamiaceae&oldid=40100804>>. Acesso em: 19 abr. 2015.

LANDMANN, J. K.; PROCIV, P. Experimental human infection with the dog hookworm, *Ancylostoma caninum*. **Med. J. Aust.**, v. 178, n. 2, p. 69-71, 2003.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **J. Chromatogr., B** 812, p. 53-70, 2004.

LOPES, Thiago Vaz et al. Parasitas zoonóticos em fezes de cães de praças públicas em municípios da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 2, p. 242-250, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2006. 512 p.

LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in Hookworm infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n.4, p. 689-703, oct. 2001.

MACIEL, A. S. et al. The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 262-270, oct. 2010.

MACIEL, A. S.; ARAUJO, J. V.; CECON, P. R. Atividade predatória *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia veterinária**, v. 15, n. 2, p. 71-75, 2006.

MARINHO, M. L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. bras. Plantas Med.**, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MCCARTHY, J.; LOUKAS, A.; HORTEZ, P. J. Quimioterapia das infecções por helmintos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. São Paulo: McGraw Hill, 2012. Cap. 51, p. 1449-1461.

MCCARTHY, J.; MOORE, T. A. Emerging helminth zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, n. 12-13, p. 1351-1360, 2000.

MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Bot. bras.**, n. 21, p. 27-36, 2007.

Ministério do Meio Ambiente. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro-Região Sul**, 2011.

MIRANDA, R. R. C. **Variabilidade molecular e análise filogeográfica de populações brasileiras de *Ancylostoma caninum***. 2007. 198 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MONTEIRO, J. N. M. **Avaliação do potencial anti-helmíntico do extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no controle de *Ancylostoma* spp. de cães**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, 2012.

MOURA, M. Q. et al. Frequência de geohelmintos em praças públicas de Pelotas, RS, Brasil. **Rev. bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 175-178, 2013.

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. **Rev. bras. Plantas med.**, v. 11, n. 3, p. 330-338, 2009.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 548p.

OLIVEIRA, F. **Saúde e vida**: um guia prático e completo de como utilizar as plantas medicinais, as hortaliças e as frutas como fonte de saúde e bem-estar. 9. ed. Belo Horizonte, MG: Saúde e vida, 2003.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, n. 1-2, p.19-27, 2002.

PELCHEBISKI, S. et al. Parasitological diagnosis of gastrointestinal helminths of dogs and evaluation of techniques. **Ciência Animal**, v. 20, n. 1, p. 51-55, 2010.

PELT, JM. Especiarias & ervas aromáticas: história, botânica e culinária. Rio de Janeiro: Zahar, 2003. Cap. 7, p. 172-177.

PEREA, María Elena Cárdenas et al. Larva migrans cutânea. **Dermatol Rev Mex**, v. 57, n. 5, p. 398-400, 2013.

PEREIRA, D.; PINHEIRO, R. S. **Elaboração de hamburgueres com antioxidantes naturais oriundos de extratos etanólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. 2013. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

POWERS, K. G., L. B. WOOD, J. ECKERT., T. GIBSON, H. J. SMITH. World associations for advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P) Guidelines for evaluating the efficacy of antihelmintics in animals. **Veterinary Parasitology**. v. 10. p. 265-284, 1982.

PRATES, L. et al. Frequência de parasitos intestinais em cães domiciliados da cidade de Maringá, PR. **Arq. bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 6, p. 1468-1470, 2009.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.54, n. 1-3, p. 259-268, 1994.

PULASKI, C. N. et al. Establishment of macrocyclic lactone resistance *Dirofilaria immitis* isolates in experimentally infected laboratory dogs. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 494, 2014.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, R. R. **Atividade predatória sobre larvas de *trichostrongilídeos* de isolados fúngicos do gênero *Manacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos.** 2003. 46 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. **Microbes Infect.**, v.4, n. 8, p.867-873, 2002.

ROCHA, L. O.; SOARES, M. M. S. R.; CORRÊA, C. L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Rev. bras. Cien. Farmac.**, 40, p. 521-527, 2004.

RODRIGUES, M. R. A.; KRAUSE, L. C.; CARAMÃO, E. B.; SANTOS, J. G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3042-3047, 2004.

SANTARÉM, V. A.; ANDRADE, S. F.; ALBERTI, H. Endo e Ectoparasitoidas. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária.** 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap.18, p. 519-537.

SANTARÉM, V. A.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, M. U. Soil-transmitted helminthic zoonoses in humans and associated risk factors. In: PASCUCI, S. **Soil contamination.** Rijeka: InTech, 2011. p. 43-66.

SANTIN, R. et al. Antifungal activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 367-373, 2014.

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

SANTOS, I. A. et al. Avaliação da atividade ovicida e larvicida de dez extratos vegetais ante *Ancylostoma* ssp. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 2, 2013.

SANTOS, S. R. L. **Síntese e atividade de compostos potencialmente larvicidas frente ao *Aedes aegypti*.** 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

SANTURIO, Deise Flores et al. Antimicrobial activity of spice essential oils against *Escherichia coli* strains isolated from poultry and cattle. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

SCAINI, C. J.; TOLEDO, R. N.; LOVATEL, R. et al. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, v. 36, n. 5, p.617-619, 2003.

SCHWENKENBECHER, J. M.; KAPLAN, R. M. Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance-associated mutations in *Ancylostoma caninum*. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 6-10, may 2009.

SILVA, Mayara Gobetti Fernandes da. Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.). 2012.

SIMIONATTO, E. **Estudo dos constituintes químicos dos óleos voláteis de plantas medicinais do rio grande do sul**: isolamento, determinação e modificação estrutural e atividade biológica. 2004. 232 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 417.

SOULSBY, E. J. L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th ed. London: Baillière Tindall, 1982.

SOUSA, R. G. et al. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. **Rev. bras. Plantas med.**, v. 15, n. 2, p. 287-292, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

STALLIVIERE, et al. Helmintos intestinais em cães domiciliados e aspectos socioeconômicos e culturais das famílias proprietárias dos animais de Lages, Santa Catarina, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.3, p.22-27, 2013.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 742 p.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**, 4. ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1998. 145 p.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 3 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2009.

VALERIANO, C. **Ação antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos sésseis e planctônicos de origem alimentar**. 2010. 95 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

VASCONCELOS, Ingrid Gonçalves; OLIVEIRA, Thaís Nicolini de. Curva de crescimento de biomassa fresca da espécie *Origanum majorana* L. em cultivo protegido e caracterização morfológica de quatro acessos do gênero *Origanum* comercializados em Brasília. 2012.

VASCONCELLOS, M. C.; BARROS, J. L.; OLIVEIRA, C. S. Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, p. 321-323, 2006.

VELHO, P. E. N. F. et al. *Larva migrans*: a case report and review. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 45, n.3, May/June 2003.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Med. J. Aust.**, v. 29, p. 375-376, 1921.

XU, M. et al. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.91, n. 2, p. 327-335, 1998.

Anexos

ANEXO 1

	Especificação Técnica Orégano Folhas	ET - 006	
		Revisão: 04	Pág. 1/1
		Data 1ª Edição: 29/03/06	
		Data Revisão: 16/11/2010	

Produto/ Nome Científico

ORÉGANO FOLHAS/ORIGANUM VULGARE L.

Descrição: Folhas secas de orégano

Propriedades:Físico-Químicas:

Umidade: máx. 12% (g/100g)

Microbiológica:

De acordo com a legislação brasileira, Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Macroscópicas:

Ausência de insetos, larvas, parasitos e de todo e qualquer sujidade que indique contaminação do produto.

Organolépticas:

Aspecto do Produto:	Folhas íntegras.
Sabor:	Característico.
Cor do Produto:	Verde.
Odor do Produto:	Característico.

Prazo de Validade

De 24 a 36 meses, dependendo do fornecedor.

Embalagem

Embalagem : sacos de papel Kraft.

Identificação

Em cada embalagem deverá conter as seguintes informações: Nome do produto, Data de fabricação, Data de validade, lote, registro do produtor (CNPJ), peso líquido e ingredientes (quando se tratar de formulação).

Transporte

O produto deve ser transportado em veículos limpos/secos, livres de insetos, larvas e mercadorias que possam vir a gerar contaminação ao produto.

Armazenamento

Armazenar em local fresco, arejado e seco, distante produtos químicos e livres de insetos, pássaros, pombos ou outros.

ANEXO 2

	Especificação Técnica Alecrim Folhas	ET - 67
		Revisão: 03
		Data 1ª Edição: 05/01/09
		Revisado em: 13/09/2010

Produto Nome Científico

ALECRIM FOLHAS/ ROSMANIMUS OFFICINALIS

Descrição: Alecrim seco procedente de espécimes vegetais gemínos, são e limpos.

Propriedades:Físico-Químicas:

Umidade: máx. 12% (g/100g)

Microbiológica:

Padrões ANVISA, segundo Resolução RDC 12 de 02/01/2001.

Coliformes a 45°C: máximo 5×10^2 NMP/g

Salmonella sp : ausência em 25 g

Macroscópicas:

Ausência de insetos, larvas, parasitos e de todo e qualquer sujidade que indique contaminação do produto.

Organolépticas:

Aspecto do Produto:	Folhas íntegras e isentas de matérias estranhas
Sabor:	Característico, aromático
Cor do Produto:	Marrom esverdeado
Odor do Produto:	Aromático característico, sem presença de mofo, bolor ou odores estranhos

Prazo de Validade

48 meses da data de fabricação.

Embalagem

Embalagem: sacos de nylon.

Identificação

Em cada embalagem deverá conter as seguintes informações: nome do produto, data de fabricação, data de validade, lote e peso líquido.

Transporte

O produto deve ser transportado em veículos limpos/secos, livres de insetos, larvas e mercadorias que possam vir a gerar contaminação ao produto.

Armazenamento

Armazenar em local limpo, seco e arejado, distante de produtos químicos e livres de insetos, pássaros ou outros animais.

Informação Nutricional porção de 0,5g

Quantidade por porção		%VD*
Valor calórico	0kcal	0
Carboidratos	0g	0
Proteínas	0g	0
Gorduras totais	0g	0
Gorduras saturadas	0g	0
Colesterol	0mg	0
Ferro	0,4mg	4
Sódio	0mg	0

(*) Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.500 calorias.

ANEXO 3

	Especificação Técnica Manjerona Flores	ET - 071	
		Revisão: 03	Pág. 1/1
		Data 1ª Edição: 05/01/09	
		Revisado em: 26/08/2010	

Produto/ Nome Científico

MANJERONA / MAJORANA SPRENTENSIS

Descrição: Folhas secas de manjerona

Propriedades:**Microbiológicas:**

Padrões ANVISA, segundo Resolução RDC 12 de 02/01/2001.

Coliformes a 45°C: máximo 5×10^5 NMP/g

Salmonella sp.: ausência em 25 g

Macroscópicas:

Ausência de insetos, larvas, parasitos e de todo e qualquer sujidade que indique contaminação do produto.

Organolépticas:

Aspecto do Produto:	Flores homogêneas e livres de matérias estranhas
Sabor:	Característico
Cor do Produto:	Verde padecente, característica própria do produto
Odor do Produto:	Aromático característico, sem presença de modo ou bolor

Prazo de Validade

24 meses.

Embalagem

Embalagem: sacos de nylon.

Identificação

Em cada embalagem deverá conter as seguintes informações: nome do produto, data de fabricação, data de validade, lote, registro do produtor (CNPJ) e peso líquido.

Transporte

O produto deve ser transportado em veículos limpossecos, livres de insetos, larvas e mercadorias que possam vir a gerar contaminação ao produto.

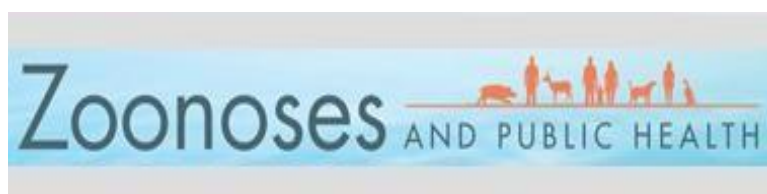
Armazenamento

Armazenar em local limpo, seco e arejado, distante de produtos químicos e livres de insetos, plásticos ou outros animais.

TABELA NUTRICIONAL – MANJERONA

Informação Nutricional por porção de 100g		
Quantidade por porção		%valor*
valor calórico	1000	0
carboidrato	10g	0
proteína	10g	0
gordura total	10g	0
água	100g	0

*% valores diários de referência para dieta de 2.000 calorias

ANEXO 4**Submission
Confirmation**

Thank you for submitting your manuscript to *Zoonoses and Public Health*.

Manuscript ID: ZPH-May-15-116

Title: ESSENTIAL OILS FROM THE LAMIACEAE FAMILY *IN VITRO*
ACTIVITY ON *ANCYLOSTOMA* SPP EGGS.

Authors: Azambuja, Rosaria
Berne, Maria Elisabeth
Freitag, Rogério
dos Santos, Marco Aurélio
Marques, Roger
Cleff, Marlete

Date Submitted: 03-May-2015

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

A991p

Azambuja, Rosaria Helena Machado

Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae, sobre ovos de *Ancylostoma* spp / Rosaria Helena Machado Azambuja. - 61f. : il. - Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2015. - Orientadora Marlete Brum Cleff ; coorientadora Maria Elisabeth Aires Berne.

1.Lamiaceae. 2.Nematódeo. 3.Ovos. 4.Fitoterápico.
I.Cleff, Marlete Brum. II.Berne, Maria Elisabeth Aires.
III.Título.

CDD: 592.57