UTILIZAÇÃO DE FITOTERÁPICO NO CONTROLE DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

CAROLINE MACIEL DA COSTA[1]; NATÁLIA BERNE PINTO[2]; GABRIELA DE ALMEIDA CAPELLA[3]; MICAELE QUINTANA DE MOURA[4]; ADRIANE LEITES STROTHMANN[5]; MARIA ELISABETH AIRES BERNE[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – carolinemacielcosta@yahoo.com.br*
[2]*Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com*
[3]*Universidade Federal de Pelotas – adri_ane19@hotmail.com*
[4]*Universidade Federal de Pelotas – capellavet@gmail.com*
[5]*Universidade Federal de Pelotas – micaele.q.m@live.com*
[6]*Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O principal problema sanitário enfrentado atualmente pelos criadores de ovinos é a helmintose. Apesar do conhecimento amplo sobre estes parasitos, na prática o seu controle ainda é restrito. Esta dificuldade resulta em prejuízos com menor conversão alimentar, como também elevam os custos com o tratamento dos animais doentes e com as constantes desverminações, além dos gastos com mão de obra e também resultando na morte de muitos animais (SOTOMAIOR et al., 2009).

O uso constante de anti-helmínticos sintéticos na tentativa de diminuir a carga parasitária de ovinos tem acarretado o surgimento de populações de nematódeos resistentes e consequentemente um controle ineficiente (ALMEIDA et al., 2010). Aliado a isto, produtos de origem animal ausentes de resíduos químicos constituem uma exigência cada vez maior dos consumidores. Tendo isso em vista, entre os métodos de controle alternativos, vem se destacando a validação de fitoterápicos, com resultados promissores em nematódeos gastrintestinais de ovinos (CARVALHO et al., 2012).

Uma das espécies com grande potencial é o alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), planta arbustiva, lenhosa, ramificada, da família Lamiaceae e utilizada a muitos séculos como especiaria em nossa culinária. A bioatividade do alecrim tem sido descrita relacionada aos princípios ativos: 1,8 cineol, α-pineno, borneol e cânfora (SANCHEZ-CAMARGO et al. 2016).

Considerando a iminente necessidade de buscar medidas alternativas de controle dos nematódeos gastrintestinais, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade *in vitro* do óleo de *R. officinalis*, sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

2. METODOLOGIA

Para obtenção do óleo essencial de *R. officinalis* a planta foi adquirida de um distribuidor comercial (Luar Sul Alimentos) com certificação de qualidade e origem. As folhas secas foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger, durante 4h. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação (1,5L de água destilada / 100 g planta), seco com sulfato de sódio anidro P.A., armazenado em frasco âmbar e mantido a -18 ºC até a utilização. Foi realizada a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa do óleo essencial de *R. officinalis* (CHIARADIA et al., 2008) e os compostos foram analisados com

base na biblioteca NIST08 do GC/MS. Para os testes, o óleo essencial foi diluído em Água Destilada e Tween 80 a 1% como segue: 227,5mg/mL; 113,7mg/mL; 56,8mg/mL; 28,4mg/mL; 14,2mg/mL; 7,1mg/mL, corresponde, respectivamente a concentração de 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56% e 0,78%.

Os ovos de nematódeos gastrintestinais (NGI) foram recuperados através de coleta de fezes diretamente da ampola retal de ovinos com infecção natural mista. As amostras de fezes coletadas foram imediatamente processadas, passando primeiro por maceração e homogeneização com água destilada à 40 ºC. Seguindo-se a passagem por três tamises de malhas de 1mm, 105µm, 55µm com o objetivo de reter as maiores partículas do bolo fecal. O material restante passou por tamise de malha de 25µm onde os ovos ficaram retidos, foram recuperados e centrifugados (203 g por 5 minutos) com água destilada por três vezes desprezando o sobrenadante. Uma última centrifugação foi realizada utilizando solução hiperssaturada para a flutuação dos ovos e este sobrenadante foi desprezado na tamise de malha de 25µm para lavagem com água destilada (HUBERT e KERBOEUF, 1992). Para resuperação das larvas, amostras positivas foram acondicionadas em estufa a 28 °C e UR acima de 80% por sete dias, quando então as larvas de terceiro estágio foram recuperadas, contadas e identificadas (ROBERTS E O'SULLIVAN, 1950).

O teste de inibição da eclodibilidade foi realizado a partir da técnica de Coles et al. (1992) com modificações, utilizando-se aproximadamente 150 ovos adicionados das soluções testes em placas de polietileno de 24 poços. Assim foram formados os seguintes testes, o Óleo Essencial de alecrim nas concentrações de 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56% e 0,78%; o controle negativo com água destilada, o controle positivo com Levamisol 0,025 mg/mL, o controle de atuação física com o Óleo Mineral e o controle do adstringente com Tween 80 a 1%. Todos os testes foram incubados por 48 horas em estufa a 28º C e 80% UR e realizados em triplicatas. Após este período se procedeu às leituras em microscópio invertido, posterior contagem dos ovos e das larvas presentes em cada poço.

Para o teste de IML foi adicionado 100µL da solução larvar contendo aproximadamente 100 larvas em placas de 24 poços para incubação por 24 horas em estufa a 28 ºC com 80% UR, com 900µL do óleo nas concentrações de 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56% e 0,78%. Após este período, o conteúdo de cada poço contendo as L3 foi transferido para tamises de 25µm inseridas em outra placa de polietileno de 24 poços e acondicionadas novamente em estufa a 28 °C por 24 horas, para que as viáveis migrassem através das malhas. Depois do desafio e da separação das larvas, elas foram quantificadas em viáveis e não viáveis utilizando microscópio invertido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gêneros identificados na coprocultura foram *Haemonchus spp.* (79%), *Ostertagia spp.* (18%) e *Trichostrongylus spp.* (3%). Na avaliação cromatográfica do óleo essencial de *R. officinalis* foi observado dezoito diferentes compostos, sendo que os três majoritários foram o Eucalyptol (42.11%), o (+)-2-Bornanone (16.37%) e o alpha.-Pinene (14.76%). Juntos, estes três representam mais de 70% dos componentes do óleo essencial.

Este óleo se mostrou altamente eficaz ao inibir a eclodibilidade em todas as concentrações testadas, alcançando 100% de ação em quatro das seis diluições (Figura1). No entanto, na avaliação da inibição da migração larval foi pouco

efetiva nas duas maiores concentrações testadas, alcançando 74% e 70% respectivamente, e não foi efetivo nas demais concentrações. Os controles de Água Destilada, Tween e Óleo Mineral resultaram em menos de 10% de inibição para ambos os testes (Figura1).

Tratamento	Inibição da eclodibilidade	Inibição da Migração Larval
H_2O	1,5[c]	6,9[e]
Tween	7,1[b]	10[c]
Óleo Mineral	6,5 [b]	8,3[c]
AH	100[a]	99,5[a]
227,5 mg/mL	100 [a]	74[b]
113,7 mg/mL	100 [a]	70,1[b]
56,8 mg/mL	100 [a]	55,3[c]
28,4 mg/mL	100[a]	35,6 [d]
14,2 mg/mL	97,7 [a]	23 [d]
7,1 mg/mL	96,6[a]	20 [d]

Figura 1: Eficácia do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis in vitro* em inibir a eclodibilidade (IE) e a migração das larvas (IML) de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Letras diferentes representam diferença significativa entre as respectivas médias.

Em avaliação realizada por Grando et al. (2016) em larvas *de Haemonchus contortus* com o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia,* que tem também como um dos principais componentes o 1.8-cineole, os autores observaram 88% de inibição no teste de migração larval (IML) a uma concentração de 56 mg/mL e 100% de inibição no teste de eclodibilidade (IE) a uma concentração de 3,5mg/mL. No presente estudo, onde o gênero de parasito mais prevalente foi o *Haemonchus* (79%), no teste de IML com a mesma concentração, foi observado uma inibição inferior (55,3%) e no teste de IE o resultado foi semelhante (96,6%) em concentrações superiores.

Os resultados dos dois estudos demonstram que são necessárias concentrações maiores para inibir a migração das larvas do que para inibir e eclodibilidade. Esta constatação pode ser atribuída a necessidade de as larvas infectantes serem mais resistentes, pois permanecem por longos períodos no ambiente, expostas a ações deletérias do clima.

4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* mostrou atividade ovicida e larvicida *in vitro* sobre nematódeos gastrintestinais, constituindo uma alternativa promissora para ser utilizado como fitoterápico no controle dos principais parasitos de ovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622–625, 2010.

CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C. S.; COTINGUIBA, F.; et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis.* **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 260–268, 2012.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., & JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, *31*(3), 623-636. 2008.

GRANDO, T. H.; SÁ, M. F.; BALDISSERA, M. D.; OLIVEIRA, C. B.; SOUZA, M. E. de; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R.C.V.; DOMINGUES R.; MINHO, A.P.; LEAL, M.L.R; MONTEIRO, S. G. In vitro activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. **Journal of helminthology**, 90(03), 377-382. 2016.

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

NETO, J. F. S. **Osteopenia e osteoprorose em ovinos infectados naturalmente por *Haemonchus contortus.*** 2018. 36f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

ROBERTS, F. H. C.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural**, 1(1) 99 – 102. 1950.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A.P.; MENDIOLA, J.A.; VALDÉS, A.; IBÁÑES, R. Supercritical antisolvent fractionation of rosemary extracts obtained by pressurized liquid extraction to enhance their antiproliferative activity. **The Journal of Supercritical Fluids,** v. 107, 2016, p. 581–589, 2016.

SOTOMAIOR, C. S. et al. Parasitoses gastrintestinais dos ovinos e caprinos: alternativas de controle. **Série Informação Técnica**, n. 080, 2009.