

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

YULLI ROXENNE ALBUQUERQUE

**ATIVIDADES ANTI-NEMATOIDES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Petroselinum  
crispum*, *Ruta graveolens* E *Thymus vulgaris* NO MODELO NEMATOIDE  
*Caenorhabditis elegans***

São Carlos – SP

2019

YULLI ROXENNE ALBUQUERQUE

**ATIVIDADES ANTI-NEMATOIDES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Petroselinum crispum*, *Ruta graveolens* E *Thymus vulgaris* NO MODELO NEMATOIDE *Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda de Freitas Anibal

São Carlos – SP

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Yulli Roxenna Albuquerque, realizada em 23/05/2019.

---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
UFSCar

---

Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro  
USP

---

Profa. Dra. Paula Kern Novelli  
UNICAMP

*Dedico,*

*À minha querida família: Sônia, Aldir (em memória), Yasmín e Yanick,*

*Aos meus padrinhos: Adevanir (em memória) e José Hermínio (em memória),*

*E ao meu companheiro de vida e de pesquisa Ricardo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter colocado em meu caminho o suficiente para eu buscar os meus objetivos.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda de Freitas Anibal pela oportunidade, orientação e conhecimentos passados a mim.

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e pela sua essencial colaboração.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Lourenção Brighenti pelo fornecimento dos óleos essenciais comerciais.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Marise Fusco-Almeida pelo fornecimento dos nematoides.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim e à Ms. Clara Aguiar pelo auxílio com a caracterização química dos óleos essenciais.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yasmin Etienne Albuquerque pelas suas fundamentais contribuições neste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Wanderson e Gustavo por enfrentarem os desafios dessa linha de pesquisa com os *C. elegans* comigo.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas e Laboratório de Microbiologia e Parasitologia pelas contribuições e momentos de descontração.

Aos funcionários Paulo e Zélia e ex-funcionários Beto e Cidinha do DMP pela disposição quando necessitei.

À Universidade Federal de São Carlos por ter me acolhido durante toda minha formação.

À minha família pela compreensão, apoio e torcida.

Ao meu namorado por todo o auxílio prestado nesta jornada.

Enfim, MUITO OBRIGADA a todos que fizeram parte deste trabalho e deram apoio para eu alcançar esta conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces”.*

Aristóteles

## RESUMO

Os nematoides parasitos representam um grande problema de saúde pública e de perdas econômica no setor agropecuário. O estudo dos óleos essenciais no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* permite identificar o potencial nematicida desses fitoterápicos para o controle de parasitoses. Este trabalho teve como objetivo avaliar as atividades anti-nematoides dos óleos essenciais comerciais das plantas *Petroselinum crispum* (salsa), *Ruta graveolens* (arruda) e *Thymus vulgaris* (tomilho-branco) no modelo *C. elegans*. Os óleos essenciais foram testados nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4%. Como controle negativo foi utilizado o solvente DMSO 8%. Para o ensaio utilizando o nematoide adulto, avaliou-se a porcentagem de nematoides que permaneceram vivos, a ação na motilidade e a presença de ovos e larvas vivas nos períodos de tempo de 0h, 6h, 24h e 48h. Levamisol a 25 mM foi utilizado neste teste como fármaco antiparasitário de referência. Em seguida, foi realizado o ensaio de inibição da eclodibilidade larval para avaliar o potencial ovicida/ovistático de cada óleo após 24h. Todos os óleos essenciais apresentaram atividade nematicida significativa ( $p < 0,05$ ) no nematoide adulto, sendo a atividade de *P. crispum* a mais pronunciada, apresentando efeito significativo a partir da concentração de 0,5% em todos os períodos avaliados, correspondendo ao efeito com 1% ou 2% do óleo de *T. vulgaris*, e com 2% do óleo de *R. graveolens*. Ainda, esta ação ocorreu de forma semelhante ao grupo Levamisol nas concentrações mais elevadas. Os óleos essenciais diminuíram a motilidade dos nematoides e não permitiram a sobrevivência de larvas jovens, ocorrendo a partir 2% com o óleo de *T. vulgaris*, a partir de 2% ou 3% com o óleo de *P. crispum* e a partir de 3% com o óleo de *R. graveolens*. O óleo essencial com atividade ovicida/ovistática mais pronunciada em menor concentração foi o de *T. vulgaris* a 2% ( $p < 0,05$ ). A análise de caracterização química dos óleos essenciais identificou como compostos majoritários a miristicina (52,5%), o apiol (18,6%) e o  $\alpha$ -pineno (10,4%) no óleo de *P. crispum*, 2-undecanona (96%) no óleo de *R. graveolens* e p-cimeno (73,6%) e canfeno (13,8%) no óleo de *T. vulgaris*. Conclui-se que os óleos essenciais de *P. crispum*, *R. graveolens* e *T. vulgaris* apresentam potencial para uso como anti-helmínticos, podendo ser uma alternativa para auxiliar no controle de doenças causadas por nematoides.

Palavras-chave: salsa, tomilho, arruda, fitoterápicos, anti-helmínticos.



## ABSTRACT

The nematode parasites represent a major public health problem and several economic loss in the agricultural sector. The study of essential oils in the model organism *Caenorhabditis elegans* allows to identify the nematicidal potential of these phytotherapeutics for control of parasites. The objective of this study was to evaluate the anti-nematode activities of commercial essential oils of *Petroselinum crispum* (parsley), *Ruta graveolens* (rue) and *Thymus vulgaris* (white thyme) in *C. elegans* model. The essential oils were tested at concentrations of 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 3% and 4%. The solvent DMSO 8% was used as negative control. The percentage of nematodes that remained alive, motility and the presence of eggs and live larvae in the time periods of 0h, 6h, 24h and 48h were evaluated for the test with adult nematodes. The Levamisole 25 mM was used in this test as reference antiparasitic drug. Then, the egg hatchability inhibition test was performed to evaluate the ovicidal/ovistact potential of each oil after 24h. All essential oils showed significant nematicidal activity in the adult nematode ( $p < 0.05$ ), with *P. crispum* activity being the most pronounced, showing a significant effect beginning at 0.5% concentration in all evaluated periods, corresponding to the effect with 1% or 2% of *T. vulgaris* oil, and 2% of *R. graveolens* oil. Similar effect occurred to the Levamisole group at the highest concentrations. The essential oils decreased nematode motility and did not allow the survival of young larvae, with 2% *T. vulgaris* oil, 2% or 3% of the oil of *P. crispum* and 3% of *R. graveolens* oil. The essential oil with more ovicidal/ovistact activity in lower concentration was *T. vulgaris* at 2% ( $p < 0.05$ ). The analysis of chemical characterization of the essential oils identified myristicin (52.5%), apiole (18.6%) and  $\alpha$ -pinene (10.4%) in the oil of *P. crispum*, 2-undecanone (96%) in oil of *R. graveolens* and p-cymene (73.6%) and camphene (13.8%) in oil of *T. vulgaris*. This study concluded that the essential oils of *P. crispum*, *R. graveolens* and *T. vulgaris* present higher potential for use as anthelmintics, and may be an alternative to help in the control of diseases caused by nematode parasites.

**Keywords:** parsley, rue, thyme, phytotherapeutics, anthelmintics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estimativa da distribuição espacial da prevalência da infecção por geohelmintos no Brasil. ....	18
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do albendazol. ....	21
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do levamisol. ....	21
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da ivermectina. ....	22
<b>Figura 5.</b> Desenvolvimento de resistência anti-helmíntica em uma população de helmintos. ....	23
<b>Figura 6.</b> Dimorfismo sexual em <i>Caenorhabditis elegans</i> . ....	25
<b>Figura 7.</b> Ciclo de vida do <i>Caenorhabditis elegans</i> a 20 °C. ....	26
<b>Figura 8.</b> Esquema do cultivo de <i>Caenorhabditis elegans</i> . ....	36
<b>Figura 9.</b> Esquema da obtenção dos ovos e nematoides adultos sincronizados. ....	39
<b>Figura 10.</b> Esquema da diluição dos óleos essenciais. ....	39
<b>Figura 11.</b> Visualização do <i>C. elegans</i> por microscopia óptica. ....	41
<b>Figura 12.</b> Visualização do ensaio de inibição da eclodibilidade larvar por microscopia óptica. ....	42
<b>Figura 13.</b> Espectros obtidos do óleo essencial de <i>P. crispum</i> analisados por CG/EM. ....	43
<b>Figura 14.</b> Espectros obtidos do óleo essencial de <i>R. graveolens</i> analisados por CG/EM. ....	44
<b>Figura 15.</b> Espectros obtidos do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> analisados por CG/EM. ....	45
<b>Figura 16.</b> Porcentagem de nematoides vivos (média $\pm$ dp) (n=9) após tratamento com o óleo essencial de <i>P. crispum</i> em diferentes concentrações nos períodos de tempo 0h, 6h, 24h e 48h. ....	47
<b>Figura 17.</b> Porcentagem de nematoides vivos (média $\pm$ dp) (n=9) após tratamento com o óleo essencial de <i>R. graveolens</i> em diferentes concentrações nos períodos de tempo 0h, 6h, 24h e 48h. ....	49
<b>Figura 18.</b> Porcentagem de nematoides vivos (média $\pm$ dp) (n=9) após tratamento com o óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> em diferentes concentrações nos períodos de tempo 0h, 6h, 24h e 48h. ....	51

<b>Figura 19.</b> Porcentagem de nematoides vivos (média $\pm$ dp) (n=9) após tratamento com os óleos essenciais de <i>P. crispum</i> , <i>R. graveolens</i> e <i>T. vulgaris</i> em diferentes concentrações nos períodos de tempo 6h, 24h e 48h.....	54
<b>Figura 20.</b> Porcentagem de larvas eclodidas após tratamento dos ovos de <i>C. elegans</i> com o óleo essencial de <i>P. crispum</i> , <i>R. graveolens</i> e <i>T. vulgaris</i> em diferentes concentrações por 24h (n=9).....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Informações gerais dos óleos essenciais.....	34
<b>Tabela 2.</b> Composição do meio NGM. ....	36
<b>Tabela 3.</b> Composição do caldo LB. ....	37
<b>Tabela 4.</b> Composição das soluções tampão M9 e lise alcalina. ....	38
<b>Tabela 5.</b> Caracterização química do óleo essencial de <i>P. crispum</i> por análise CG/EM. ....	43
<b>Tabela 6.</b> Caracterização química do óleo essencial de <i>R. graveolens</i> por análise CG/EM. ....	44
<b>Tabela 7.</b> Caracterização química do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> por análise CG/EM. ....	45
<b>Tabela 8.</b> Dados de motilidade, presença de ovos e larvas vivas após tratamento com o óleo essencial de <i>P. crispum</i> . ....	48
<b>Tabela 9.</b> Dados de motilidade, presença de ovos e larvas vivas após tratamento com o óleo essencial de <i>R. graveolens</i> . ....	50
<b>Tabela 10.</b> Dados de motilidade, presença de ovos e larvas vivas após tratamento com o óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> . ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT:	5-hidroxitriptamina
ACh:	Acetilcolina (do inglês <i>Acetylcholine</i> )
ANOVA:	Análise de Variância
CG/EM:	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
DA:	Dopamina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
dp:	Desvio Padrão
GABA:	Ácido $\gamma$ -Aminobutírico (do inglês <i><math>\gamma</math>-Aminobutyric Acid</i> )
GLU:	Glutamina
GluCls:	Canais de Cloro Controlados por Glutamato (do inglês <i>Glutamate-Gated Chloride Channels</i> )
Gly:	Glicina
IR:	Índice de Retenção
IR <sub>obs</sub> :	Índice de Retenção Observado
IR <sub>tab</sub> :	Índice de Retenção Tabelado
L1:	Larvas do 1º Estágio
L2:	Larvas do 2º Estágio
L3:	Larvas do 3º Estágio
L4:	Larvas do 4º Estágio
LB:	Caldo Lisogênico (do inglês <i>Lysogeny Broth</i> )
NI:	Não Identificado
NGM:	Meio de Crescimento para Nematóide (do inglês <i>Nematode Growth Medium</i> )
pH:	Potencial de Hidrogênio
q.s.p.:	Quantidade Suficiente Para
rpm:	Rotações Por Minuto
TR:	Tempo de Retenção

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Nematoides parasitos de importância mundial .....	18
2.2 Fármacos anti-helmínticos .....	20
2.2.1 Benzimidazóis .....	20
2.2.2 Imidazotiazóis .....	21
2.2.3 Lactonas macrocíclicas .....	22
2.3 Resistência Anti-helmíntica.....	23
2.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> – modelo experimental .....	24
2.5 Triagem e identificação de alvos de nematicidas em <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	28
2.6 Óleos essenciais.....	29
2.6.1 <i>Petroselinum crispum</i> .....	30
2.6.2 <i>Ruta graveolens</i> .....	31
2.6.3 <i>Thymus vulgaris</i> .....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos .....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Óleos essenciais.....	34
4.2 Caracterização química dos óleos essenciais .....	34
4.3 Linhagem de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	35
4.4 Cultivo de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	35
4.5 Linhagem de <i>Escherichia coli</i> .....	36
4.6 Isolamento e cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	37
4.7 Obtenção dos ovos e sincronização das populações de nematoides.....	37
4.8 Ensaio biológicos com <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	39

4.8.1	Preparo das soluções de tratamento com óleos essenciais.....	39
4.8.2	Ensaio de atividades dos óleos essenciais no nematoide adulto.....	40
4.8.3	Ensaio de inibição da eclodibilidade larval.....	41
4.8.4	Análise dos dados.....	42
5.	RESULTADOS.....	43
5.1	Caracterização química dos óleos essenciais.....	43
5.1.1	Caracterização química do óleo essencial de <i>Petroselinum crispum</i> ...	43
5.1.2	Caracterização química do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> .....	44
5.1.3	Caracterização química do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> .....	45
5.2	Ensaio de atividades anti-nematoides no nematoide adulto.....	46
5.2.1	Óleo essencial de <i>Petroselinum crispum</i> .....	46
5.2.2	Óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> .....	48
5.2.3	Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> .....	50
5.2.4	Análise comparativa do efeito nematicida dos óleos essenciais por período de tempo.....	52
5.3	Ensaio de inibição da eclodibilidade larval.....	55
6.	DISCUSSÃO.....	56
7.	CONCLUSÕES.....	61
8.	PERSPECTIVAS.....	62
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são principalmente caracterizadas pelo seu alto potencial de morbidade e elevada prevalência em populações que sofrem com a desigualdade social e a pobreza. Contribuem para a propagação dessas doenças o fraco atendimento às necessidades médicas dessas populações e a falta de interesse do mercado farmacológico em buscar novos fármacos contra essas doenças. Entre as doenças negligenciadas, as infecções causadas por parasitos geo-helminhos (ascaridíase, tricuriase e ancilostomíase) são as mais prevalentes globalmente, acometendo mais de um bilhão de pessoas no mundo (VERCRUYSSSE et al., 2011; HOTEZ et al., 2016; REIS et al., 2016).

Além de seres humanos, as helmintíases também acometem os animais. As infecções causadas por nematoides, como *Haemonchus* spp., em animais de produção são responsáveis por grandes prejuízos econômicos para o setor da pecuária, já que podem causar redução na produtividade, baixa fertilidade, atraso no crescimento e elevados gastos veterinários (BIFFA; JOBRE; CHAKKA, 2006).

No setor agrônômico, nematoides fitoparasitos, como a *Meloidogyne* spp., são capazes de afetar o sistema radicular de plantas e reduzir a produtividade de uma variedade de cultivos agrícolas, além de poderem atuar como transmissores de outros patógenos em plantas (GOULART, 2008).

Os baixos investimentos na inovação de fármacos antiparasitários têm sido vistos com grande preocupação. Numerosos relatos de casos de resistência de helmintos aos fármacos habituais foram encontrados em animais de produção, indicando que este cenário pode ocorrer em parasitos de humanos (HOTEZ et al., 2007; VERCRUYSSSE et al., 2011; WOODGATE, 2018). Assim, por infectar humanos, animais e plantas, é de grande importância a busca por novas alternativas terapêuticas para o controle de nematoides parasitos.

Em regiões com baixo desenvolvimento é comum que a população recorra ao uso de plantas medicinais para tratar diversas enfermidades devido ao reduzido acesso aos fármacos comerciais (FLOR; BARBOSA, 2015). Atualmente, o crescente interesse do mercado consumidor por alimentos orgânicos e pela fitomedicina (VÁRADYOVÁ, 2018) tem incentivado pesquisadores a resgatarem os



conhecimentos etnobotânicos praticados durante gerações como meio alternativo no combate de helmintíases (SHALABY, 2013).

As plantas medicinais são uma fonte rica em compostos candidatos a fármacos anti-helmínticos (KUMARASINGHA et al., 2014). A planta *Chenopodium ambrosioides* L. (família: Amaranthaceae), popularmente conhecida como erva-de-santa-maria, por exemplo, foi utilizada durante séculos como agente anti-helmíntico. A atividade dessa erva contra helmintos foi posteriormente atribuída principalmente ao monoterpene bicíclico ascaridol, composto predominante no seu óleo essencial (BARREIRO, 2009).

Assim, com a necessidade da descoberta de novas terapias antiparasitárias e conhecendo o potencial desses produtos naturais, este trabalho objetivou caracterizar quimicamente e estudar as atividades anti-nematoides de três óleos essenciais comerciais das plantas *Petroselinum crispum*, *Ruta graveolens* e *Thymus vulgaris* utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo. Esses produtos foram escolhidos entre 15 amostras de óleos essenciais comerciais de acordo com os dados mais promissores obtidos pela autora em pré-ensaios para a atividade nematicida.

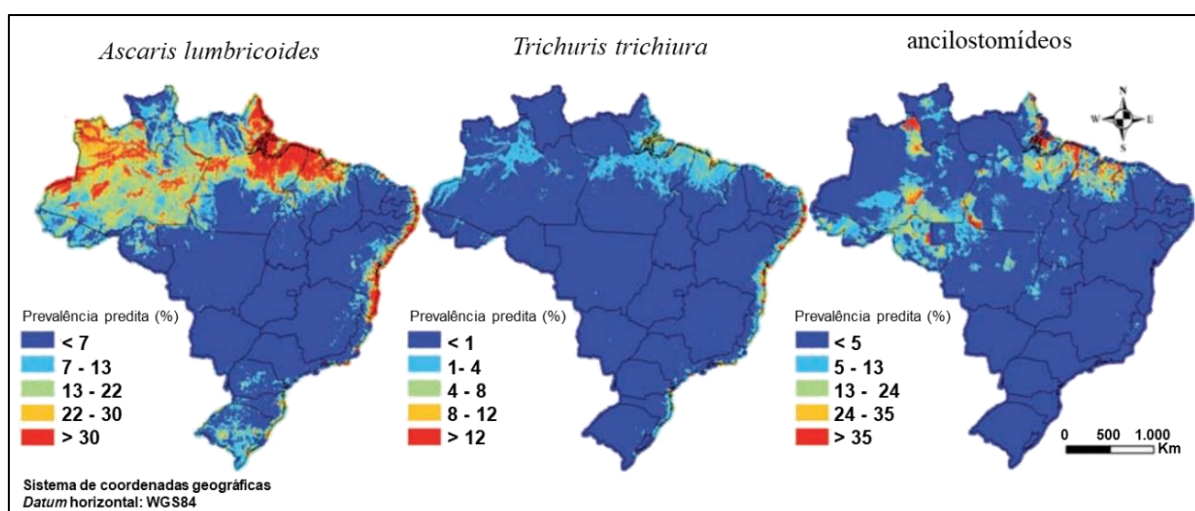
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Nematoides parasitos de importância mundial

Entre os nematoides que infectam humanos, os mais frequentes na população mundial são causados pelos geo-helmintos *Ascaris lumbricoides* (820 milhões), *Trichuris trichiura* (460 milhões) e os ancilostomídeos *Necator americanus* e *Acilostoma duodenale* (440 milhões), com maior prevalência em países em desenvolvimento (OPAS, 2018). Esses geo-helmintos infectam humanos via ingestão de seus ovos (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*) ou pela penetração ativa das larvas através da pele ou mucosa (ancilostomídeos) (JOURDAN et al., 2018).

No Brasil, estima-se que cerca de 29,9 milhões de pessoas estão infectadas com *A. lumbricoides*, 19,2 milhões com *T. trichiura* e 4,7 milhões com ancilostomídeos, se concentrando principalmente nas regiões do norte e nordeste (Figura 1) (SCHOLTE et al., 2013).

**Figura 1.** Estimativa da distribuição espacial da prevalência da infecção por geo-helmintos no Brasil.



Fonte: Adaptado de SCHOLTE et al., 2013.

As geo-helmintíases causadas por esses nematoides parasitos estão associadas a morbidades leves e graves. Entre as principais consequências dessas doenças estão anemia, dor abdominal crônica, desnutrição, prejuízos no desenvolvimento físico e cognitivo, obstrução de intestino e prolapso retal, podendo causar a morte em casos mais graves. As manifestações clínicas dessas doenças

são geralmente proporcionais à carga parasitária presente no indivíduo (VERCRUYSSSE et al., 2011; LO et al., 2017).

Como estratégia para combater as geo-helmintíases em larga escala, a administração preventiva de fármacos é um recurso utilizado para o tratamento de populações inteiras de regiões endêmicas, geralmente sem diagnóstico prévio individual. Essa estratégia se concentra principalmente nos grupos de maiores riscos, como crianças em idade escolar (entre 5 e 15 anos) (WHO, 2016; LO et al., 2017).

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de vacinas para auxiliar no controle de geo-helmintíases em humanos, estas vacinas ainda não passaram da fase de desenvolvimento para o mercado (HOTEZ et al., 2013; ZHAN et al., 2014). Alguns obstáculos estão presentes no desenvolvimento de vacinas para esses parasitos, como o seus ciclos de vida muito complexos e necessidade de entendimento mais preciso da interação parasito-hospedeiro (QUADRI et al., 2017).

Na área veterinária, destacam-se os nematoides do gênero *Haemonchus* spp., que acometem principalmente bovinos, ovinos e caprinos (*Haemonchus placei* e *Haemonchus contortus*), especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Esses parasitos, depois de ingeridos no estágio de larva infectante, desenvolvem-se no abomaso dos ruminantes, causando lesões na mucosa, além de se alimentarem do sangue do hospedeiro. A hemoncose pode gerar anemia progressiva com rápida evolução, emagrecimento e causar a morte do animal quando ocorrem altas cargas parasitárias, o que acarreta em enormes perdas no setor produtivo de carne e leite (FÁVERO et al., 2016). Ademais, uma ameaça ao combate desses parasitos é a ocorrência de casos de resistência aos fármacos anti-helmínticos disponíveis (VANDEN-BROM et al., 2015).

A realização do controle de parasitoses em rebanhos frequentemente é feita através do uso de anti-helmínticos sintéticos (GITHIORI et al., 2004). Contudo, esta estratégia é onerosa e pode deixar resíduos nos alimentos de origem animal (KINSELLA et al., 2010), causar contaminação ambiental (HORVAT et al., 2012) e aumentar a pressão de seleção de populações de nematoides resistentes aos anti-helmínticos (SOUTELLO; SENO; AMARANTE, 2007).

Na agricultura, os fitonematoides são responsáveis mundialmente pelo prejuízo estimado em 157 milhões de dólares anuais. Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* spp. acometem uma enorme variedade de culturas de importância

econômica, como tomate, algodão e café. Esses fitoparasitos são conhecidos como nematoides das galhas e infectam o sistema radicular das plantas, onde se alimentam e se reproduzem. Os sintomas externos são observados na forma de protuberâncias ou galhas de tamanhos variados na raiz. Como consequência ocorre a perda da produtividade do cultivo agrícola. Apesar do emprego de nematicidas sintéticos serem a forma mais confiável no controle dessas pragas, a sua toxicidade em humanos e no meio ambiente vem fazendo com que cada vez mais o seu uso seja descontinuado (ABAD et al., 2008).

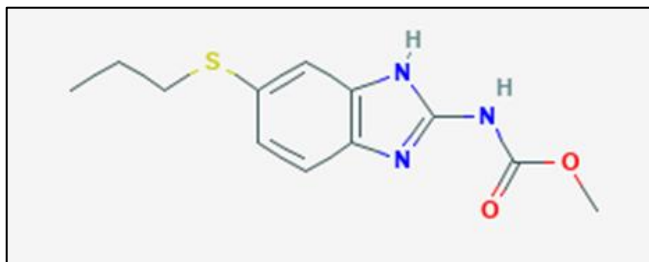
## **2.2 Fármacos anti-helmínticos**

O controle de helmintíases é realizado principalmente com o emprego de fármacos anti-helmínticos. Esses fármacos geralmente agem de forma seletiva em determinados alvos moleculares do parasito. Como consequência, os anti-helmínticos atuam incapacitando o helminto, principalmente, por paralisia muscular ou interferindo na função dos microtúbulos, inviabilizando a sua permanência no hospedeiro (VENTURINI et al., 2014).

As principais classes de anti-helmínticos são os benzimidazóis, os imidazotiazóis e o grupo das lactonas macrocíclicas. Essas classes diferenciam entre si no mecanismo de ação e nas formas de eliminação parasitária (MARTIN, 1997; HOLDEN-DYE; WALKER, 2014). Devido ao metabolismo dos helmintos variarem entre as espécies, um medicamento efetivo para combater um helminto pode não ser efetivo para outro (RANG et al., 2007).

### **2.2.1 Benzimidazóis**

O tiabendazol foi o primeiro anti-helmíntico da classe dos benzimidazóis a ser descoberto em 1961 (BROWN et al., 1961). Devido ao alto índice terapêutico desta molécula e toxicidade seletiva para helmintos, muitos compostos dessa mesma classe foram sendo desenvolvidas com eficácias melhoradas ao longo do tempo, incluindo o mebendazol e o albendazol (Figura 2). A estrutura química dos benzimidazóis é caracterizada por um anel benzênico condensado ao heterocíclico imidazol (BROWN et al., 1961, ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017).

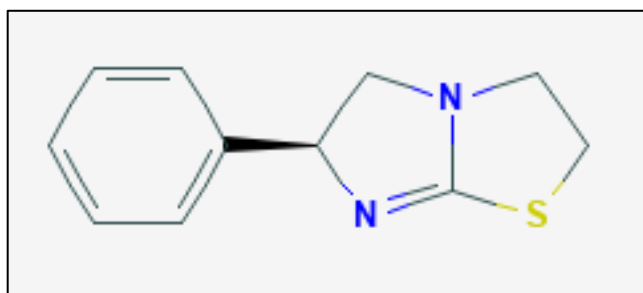
**Figura 2.** Estrutura química do albendazol.

Fonte: National Center for Biotechnology Information (2019a).

O mecanismo de ação dos benzimidazóis se baseia na interação com a proteína  $\beta$ -tubulina, impedindo a sua dimerização com a proteína  $\alpha$ -tubulina. Dessa forma, ocorre a inibição da formação dos microtúbulos, impedindo processos celulares vitais e causando a destruição da estrutura celular. Os benzimidazóis são, em geral, muito eficientes no tratamento de nematoides gastrointestinais, apresentando ação ovicida, larvicida e vermícida (LACEY, 1990; VENKATESAN, 1998; ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017).

### 2.2.2 Imidazotiazóis

Os imidazotiazóis começaram a ser utilizados como anti-helmínticos a partir de 1965, com a implementação do tetramisol (mistura racêmica), e, posteriormente, apenas do seu isômero levogiro levamisol (Figura 3), considerado mais potente (ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017). O levamisol tem atuação sobre adultos e larvas de nematoides gastrointestinais e pulmonares. Apesar de ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica de mamíferos, poucos efeitos colaterais foram observados para este fármaco (HOLDEN-DYE e WALKER, 2014).

**Figura 3.** Estrutura química do levamisol.

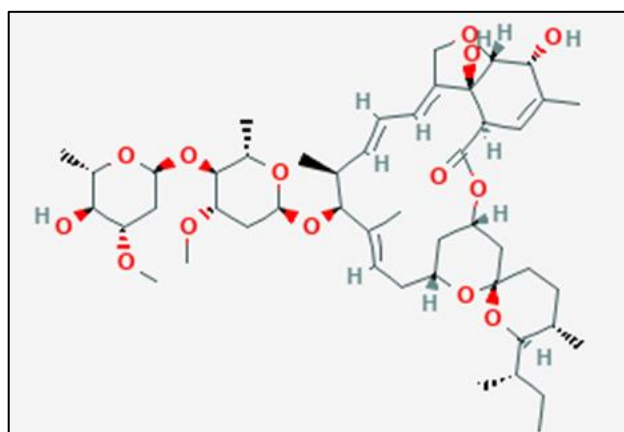
Fonte: National Center for Biotechnology Information (2019b).

O levamisol, ao ser absorvido pela cutícula do helminto, atua como agonista colinérgico dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) presentes nas células musculares. Conseqüentemente, ocorre a abertura de canais iônicos, a entrada de sódio nas células e a despolarização da membrana, seguido do bloqueio dos canais abertos sensíveis à voltagem e sua dessensibilização. O resultado deste processo é a hipercontração muscular e a paralisia espástica no helminto, auxiliando na sua expulsão do hospedeiro (HOLDEN-DYE; WALKER, 2014; ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017).

### 2.2.3 Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas foram introduzidas como fármacos de amplo espectro contra nematoides e artrópodes na década de 1980. As lactonas macrocíclicas são compostos de alto peso molecular derivados de moléculas obtidas no processo fermentativo de actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Fazem parte desta classe as avermectinas, como a ivermectina (Figura 4) e abamectina, e as milbemicinas, como a moxidectina e a milbemicina (ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017).

**Figura 4.** Estrutura química da ivermectina.



Fonte: National Center for Biotechnology Information (2019c).

As lactonas macrocíclicas podem penetrar no nematoide através da cutícula ou por via oral. Essa classe de compostos atua como agonista seletivo irreversível de canais de cloro controlados por glutamato (GluCl) presentes nos neurônios e músculos faríngeos, aumentando a permeabilidade de cloro. Como consequência

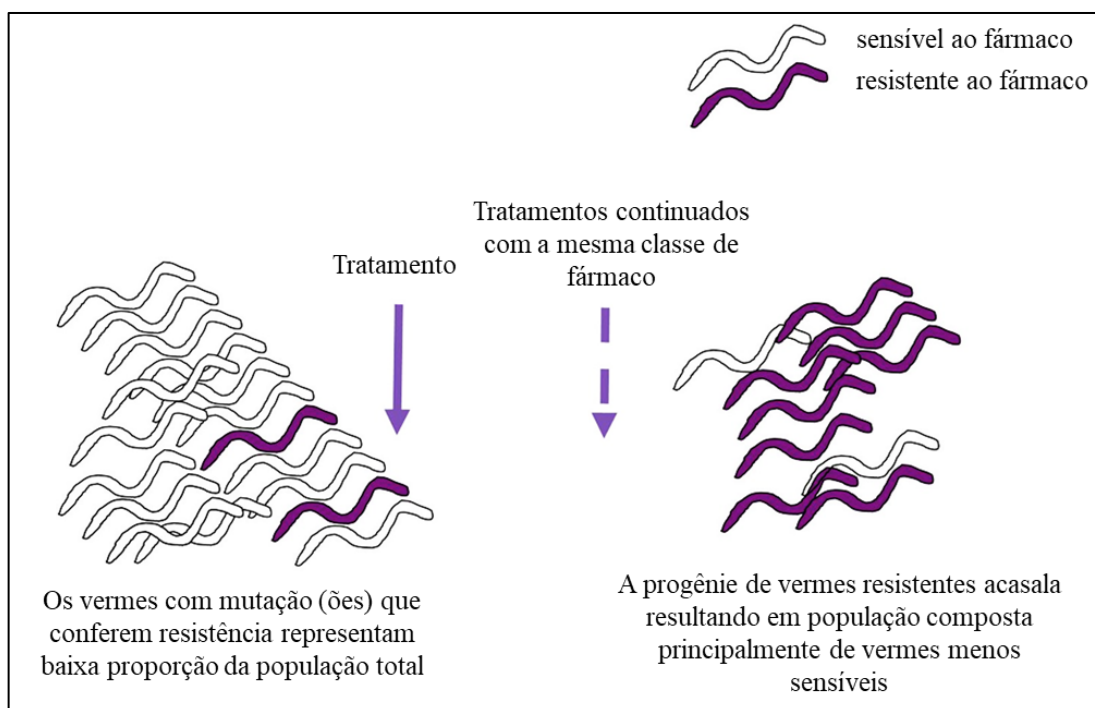
ocorre a inibição da transmissão nervosa e da contração muscular, acarretando na paralisia flácida e morte do nematoide (SARTOR; BICUDO, 1999; KABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017).

Em maiores concentrações, as avermectinas também atuam como antagonistas nos receptores de canais iônicos controlados por GABA e Gly (ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017). Apesar dos mamíferos utilizarem o GABA como neurotransmissor, as lactonas macrocíclicas geralmente não causam efeitos tóxicos nesses animais, já que não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (AYRES; ALMEIDA, 1999).

### 2.3 Resistência Anti-helmíntica

A resistência anti-helmíntica pode ser definida como a perda da sensibilidade do fármaco transmitido geneticamente em populações de helmintos que eram anteriormente sensíveis ao mesmo fármaco (Figura 5) (KÖHLER, 2001).

**Figura 5.** Desenvolvimento de resistência anti-helmíntica em uma população de helmintos.



Fonte: Adaptado de TZELO; MATTHEWS, 2016.

O tratamento de helmintos que possuem alelos que conferem a resistência ao fármaco empregado irá conferir a esses parasitos uma vantagem de

sobrevivência em relação aos não portadores desses alelos (GILLEARD; BEECH, 2007). Uma vez que a resistência é uma característica herdável, os sobreviventes irão transmitir seus alelos de resistência para os seus descendentes, aumentando a frequência de helmintos resistentes na população (SANGSTER, 1999).

A resistência a um determinado anti-helmíntico pode ser acompanhada também da resistência a outros anti-helmínticos. Isto ocorre devido ao compartilhamento de mecanismos de ação e alvos semelhantes entre os fármacos da mesma classe (resistência lateral) e até entre classes (resistência cruzada) (SANGSTER, 1999).

A prevalência e a severidade da resistência anti-helmíntica têm se espalhado e a resistência a múltiplos fármacos das três principais classes (benzimidazóis, imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas) está presente globalmente, principalmente em nematoides gastrointestinais de pequenos animais de produção (ovinos e caprinos). Essas ocorrências fizeram com que as preocupações de que isso possa se estender aos parasitos que infectam humanos se tornassem crescentes (GEERTS; GRYSEELS, 2000).

Entre os principais mecanismos de resistência estão as mutações nos genes que codificam os alvos (alteração ou deleção de aminoácidos no produto proteico), a diminuição da quantidade dos receptores e a redução da afinidade dos receptores aos fármacos (ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017).

Para combater a resistência anti-helmíntica há a necessidade de identificação de novos alvos de fármacos e a introdução de novas terapias anti-helmínticas com um mecanismo de ação diferente dos já existentes (KAMINSKY et al., 2008). Além disso, outros meios são: a realização da terapia combinada com diferentes classes de drogas e a realização de uma rotatividade de fármacos com diferentes mecanismos de ação entre os períodos de aplicação dos anti-helmínticos (ABONGWA; MARTIN; ROBERTSON, 2017).

## **2.4 *Caenorhabditis elegans* – modelo experimental**

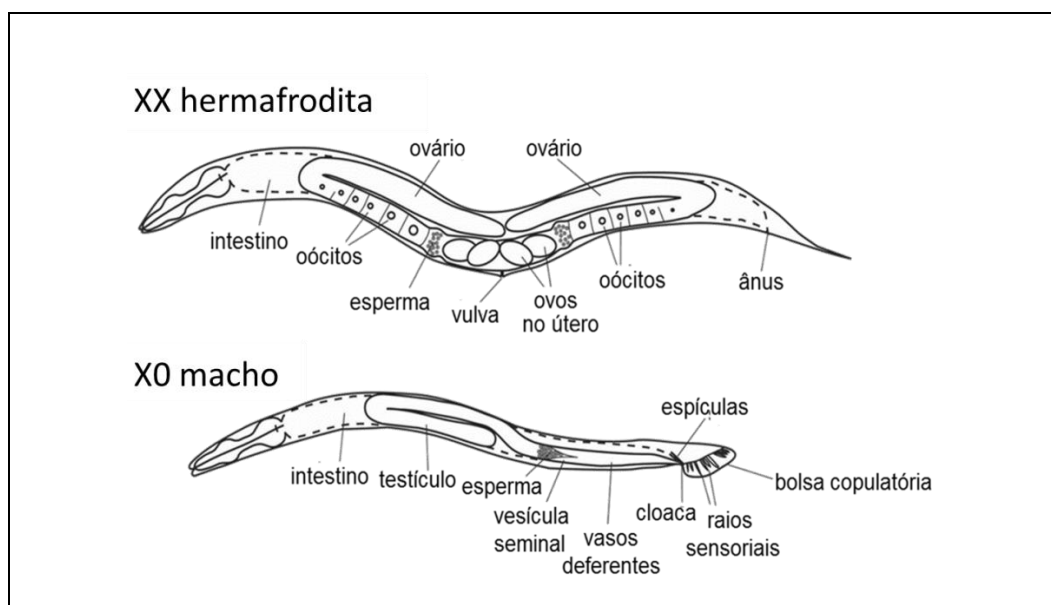
*Caenorhabditis elegans* (*Caeno* = recente; *rhabditis* = bastão; *elegans* = elegante) é um nematoide de vida livre geralmente encontrado no solo de regiões com clima temperado, alimentando-se de bactérias e fungos presentes em material vegetal em decomposição (BARRIÈRE; FÉLIX, 2014). O *C. elegans* possui o corpo



alongado com cerca de 1 mm de comprimento quando adulto e é formado por um conjunto completo de órgãos e um complexo sistema sensorial. Sua anatomia consiste basicamente em boca, faringe, músculo, sistema neural, intestino, gônadas, ânus e cutícula colagenosa (WATSON et al., 2006).

Naturalmente, os nematoides *C. elegans* podem ser hermafroditas (protândricos) ou machos (Figura 6). Os hermafroditas são formados por 959 células somáticas, as quais possuem cinco pares de cromossomos autossomos e um par de cromossomos sexuais (5AA; XX). Os nematoides machos são formados por 1.031 células somáticas, as quais possuem apenas um cromossomo sexual além dos 5 pares de cromossomos autossomos (5AA; XO). Os machos, gerados a partir do raro evento de não-disjunção meiótica do cromossomo X na formação de um dos gametas, apresentam baixa frequência na população (cerca de 0,1% a 0,2%). Entretanto, a fecundação cruzada é capaz de aumentar a frequência de machos em cerca de 50% (BRENNER, 1974; ZARKOWER, 2006; CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

**Figura 6.** Dimorfismo sexual em *Caenorhabditis elegans*.



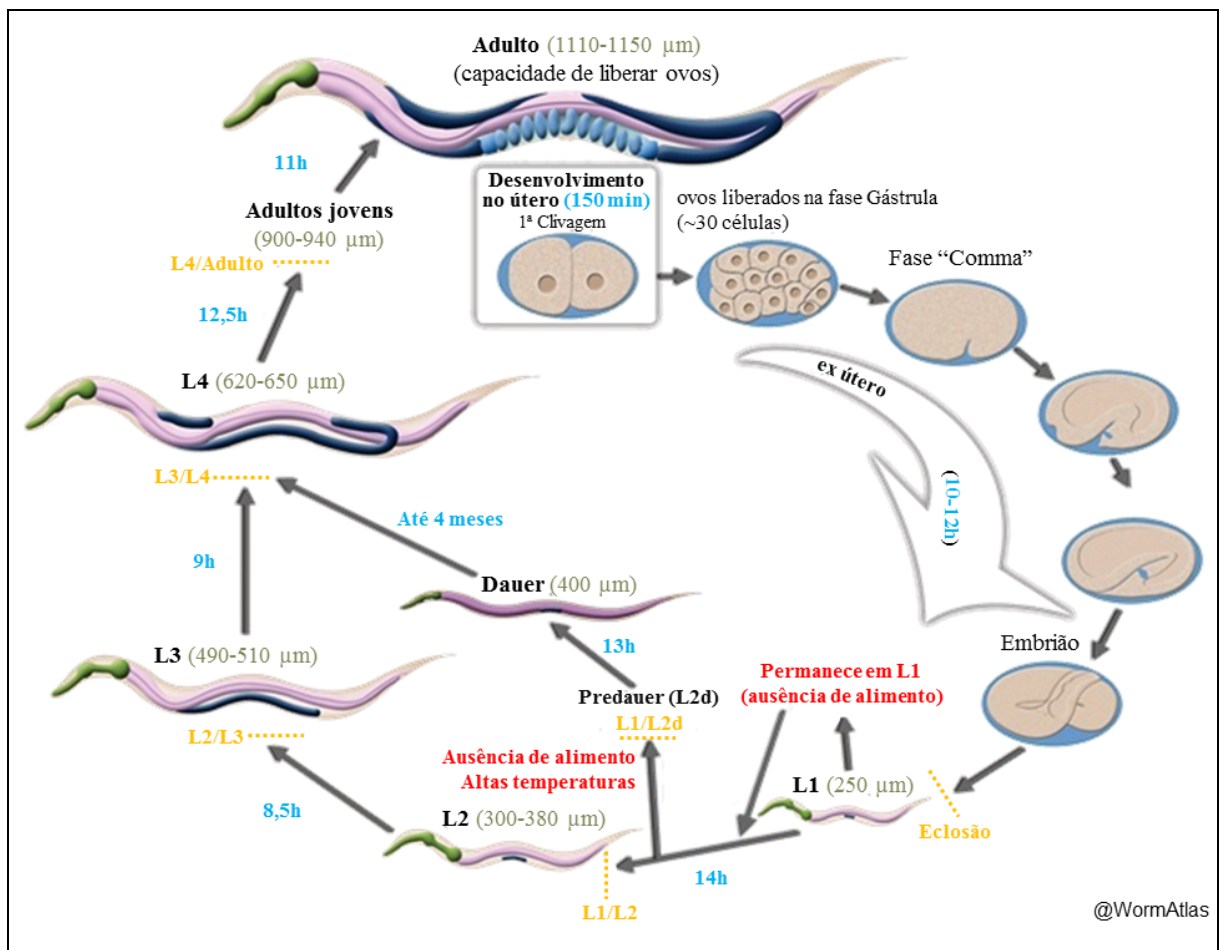
Fonte: adaptado de ZARKOWER, 2006.

Os *C. elegans* hermafroditas possuem dois ovotestis produtores de espermatozoides ameboides haploides, os quais são armazenados na espermateca. Quando estão próximos de atingirem a idade adulta, eles passam a desenvolver apenas os oócitos. A reprodução do hermafrodita frequentemente ocorre por

autofertilização com o esperma armazenado, sendo capaz de produzir até 300 ovos. Quando ocorre a fecundação cruzada com os machos, a capacidade reprodutiva dos hermafroditas pode chegar a cerca de 1.000 descendentes (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

O ciclo de vida do *C. elegans* (Figura 7) dura aproximadamente 3,5 dias se mantido a 20°C. Após a eclosão do embrião, o nematoide passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta, podendo sobreviver por até 3 semanas (WATSON et al., 2006). No final de cada estágio ocorre um período de inatividade (*lethargus*) durante a formação de uma nova cutícula até a muda da cutícula antiga (RAIZEN et al., 2008).

**Figura 7.** Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* a 20 °C. Os hermafroditas liberam os ovos no meio e, após a eclosão do embrião, passam por 4 estágios larvais até a fase adulta.



Legenda: Os números em azul representam o tempo que o nematoide demora a passar para a próxima fase. Os números em cinza representam a medida do comprimento do nematoide em cada fase. Fonte: adaptado de ALTUN; HALL, 2009.

Quando ocorrem condições estressantes (pouca comida, mudança de temperatura ou alta densidade populacional), o *C. elegans* no estágio de desenvolvimento L1 pode sinalizar um estágio de desenvolvimento alternativo, assumindo uma forma de resistência, denominada *dauer* (permanente), capaz de sobreviver durante meses em ambientes agressivos para o animal. No estágio *dauer*, a cutícula envolve as aberturas bucal e anal, impedindo-o de se alimentar e continuar o seu desenvolvimento. Quando as condições favoráveis ao nematoide são reestabelecidas, a larva *dauer* realiza a muda, volta a ser capaz de se alimentar e continua o seu desenvolvimento como larva L4 até o estágio adulto (ALTUN; HALL, 2009; CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Em 1963, o *C. elegans* começou a ser estabelecido em laboratório por Sydney Brenner para ser utilizado como um organismo modelo para estudar o desenvolvimento do sistema nervoso dos animais (BRENNER, 1974). Suas vantagens em laboratório são muitas: pequeno tamanho, grande capacidade reprodutiva, transparência em todos os seus estágios de desenvolvimento, curto ciclo de vida, fácil manipulação, capacidade de autofertilização, eutelia, pequeno genoma, alto potencial para análises gênicas e baixo custo de cultivo em comparação com outros organismos (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

O *C. elegans* tornou-se um dos animais de laboratório mais intensamente estudado e muito bem caracterizado a nível celular, genômico, embriológico e neurobiológico. Assim, este organismo vem sendo utilizado com relevância nas áreas de biologia do desenvolvimento (SCHIERENBERG; WOOD, 1985), genética (ZHONG; STERNBERG, 2006), envelhecimento celular (BEN-ZVI; MILLER; MORIMOTO, 2009), morte celular programada (LETTRE; HENGARTNER, 2006), toxicologia (HUNT, 2016), fármacos anti-helmínticos (SIMPKIN; COLES, 2007), além de biologia espacial (JOHNSON; NELSON, 1991).

A existência de recursos online que compartilham dados biológicos do *C. elegans*, como informações genéticas pelo *WormBase* ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)) ou metodologias e revisões pelo *WormBook* ([www.wormbook.org](http://www.wormbook.org)) têm dado suporte fundamental para o sucesso desse organismo modelo na pesquisa científica (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

## 2.5 Triagem e identificação de alvos de nematicidas em *Caenorhabditis elegans*

Um dos motivos apontados para a quantidade escassa de fármacos anti-helmínticos disponíveis é a dificuldade na identificação de compostos-líderes em nematoides parasitos como alvos para novos fármacos. É pouco viável avaliar um grande número de candidatos a fármacos nesses organismos com o rendimento necessário. Isso se deve ao ciclo de vida complexo desses parasitos, muitas vezes dependendo de um hospedeiro animal para a sua propagação em laboratório (BURNS et al, 2015).

O uso de organismos modelos em substituição ao estudo direto de espécies parasitárias tornou-se uma ferramenta poderosa e pode resolver questões tanto práticas quanto éticas desses estudos (BRITTON; MURRAY, 2006). O uso de testes em laboratório com *C. elegans* é simples, barato e rápido, e pode funcionar na detecção de anti-helmínticos de amplo espectro com alto rendimento (SALINAS; RISI, 2018). Devido também ao seu genoma pequeno e bem conhecido, o *C. elegans* tornou-se uma importante ferramenta nos estudos que buscam novos compostos contra nematoides.

A maioria dos alvos dos anti-helmínticos é ligada à neuromusculatura do nematoide, sendo a abundância de neurotransmissores uma característica importante do *C. elegans*. Esse organismo possui muitos dos neurotransmissores mais comuns, como ACh, GLU, GABA, DA e 5-HT e os seus respectivos receptores (HOBERT, 2013). Vários desses neuropeptídeos estão relacionados a processos vitais do nematódeo como alimentação, locomoção e postura de ovos (HOLDEN-DYE; WALKER, 2007). Estudos em *C. elegans* conseguiram validar canais de cálcio dependentes da acetilcolina, específicos de nematoide, como alvos de anti-helmínticos (WEVER; FARRINGTON; DENT, 2015).

Pesquisas demonstraram que a maioria dos fármacos anti-helmínticos disponíveis também possui ação em *C. elegans* (HOLDEN-DYE; WALKER, 2007). Além disso, esse organismo modelo foi fundamental para a compreensão do mecanismo de ação de vários desses medicamentos, como os benzimidazóis e o levamisol. A identificação dos alvos desses fármacos em *C. elegans* se deu através de rastreios genéticos, verificando para quais mutantes gerados aleatoriamente foi

observada a capacidade de resistir aos efeitos desses compostos. Posteriormente, foi identificado o gene mutante que conferiu essa resistência (BURNS et al, 2015; 2016).

Apesar de se tratar de um organismo de vida livre, a utilidade do *C. elegans* para a descoberta de anti-helmínticos vem sendo demonstrada em pesquisas e superado as suas desvantagens. Segundo Burns et al. (2015), as moléculas letais para *C. elegans* foram 15 vezes mais propensas a matar as espécies de nematoides parasitos *Cooperia oncophora* e *H. contortus* do que moléculas escolhidas aleatoriamente. Além disso, 40% das moléculas letais para *C. elegans* também foram letais para os mesmos parasitos. Dessa forma, a bioatividade em *C. elegans* pode ser um preditivo de bioatividade em nematoides parasitos.

A triagem em *C. elegans* possui o potencial de identificar compostos com alvos conservados nunca antes considerados em pesquisas baseadas em alvos moleculares. Além disso, é possível que moléculas letais possam ter mais de um alvo molecular. Se isso ocorrer, seria um evento extremamente raro gerar mutantes que tenham todos os alvos mutados (BURNS et al, 2015). Isso pode ser um indicativo de que a resistência a essas moléculas também possa ser muito difícil de acontecer naturalmente em nematoides parasitos. Esta situação também pode ocorrer na utilização de um conjunto de compostos com diferentes mecanismos de ação, como este trabalho sugere para os óleos essenciais.

## 2.6 Óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem-se de substâncias lipofílicas, odoríferas e voláteis provenientes do metabolismo secundário das plantas, podendo ser extraídos a partir de suas diversas partes, como flores, folhas, frutos, sementes, caules e raízes. Os métodos de obtenção empregados geralmente são hidrodestilação ou arraste a vapor (SIANI et al., 2000).

Embora, normalmente sejam utilizadas como flavorizantes, os óleos essenciais também possuem atividade antimicrobiana (MOUREY; CANILAC, 2002), antiviral (BISHOP, 1995), antimicótica (MARI et al., 2003), inseticida (KARPOUHTSIS et al., 1998), antiparasitária (ABIDI et al., 2018), entre outras. Essas propriedades estão diretamente relacionadas com funções necessárias à sobrevivência vegetal que exercem papel fundamental na defesa contra patógenos

(SIANI et al., 2000). Devido aos seus atributos, os óleos essenciais estão cada vez mais sendo utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

A composição química dos óleos essenciais podem ser terpenos, álcoois simples, adeídos, cetonas, fenóis, ésteres, peróxidos, óxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (SIMÕES et al., 2007). Esta composição pode sofrer interferências de vários fatores, como método de extração, época da colheita, tipo de solo, condições climáticas, além da possível variação interespecífica (BORSATO, 2006). Portanto, é necessário que a qualidade dos óleos seja verificada através de testes que determinem a sua pureza e composição. Uma delas é a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), que pode realizar a identificação, caracterização e quantificação dos compostos bioativos presentes no material analisado.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) permite a identificação e quantificação de picos individuais, através da indicação da massa molecular e padrão de fragmentação dos compostos, além da comparação dos índices de retenção da amostra com padrões descritos na literatura (ADAMS, 2007).

Na área da Parasitologia, o potencial farmacológico dos óleos essenciais tem sido investigado para o tratamento de doenças causadas por helmintos parasitos. Estudos recentes demonstraram a eficácia do óleo essencial de *Artemisia campestris* (família: Asteraceae) em *H. contortus* em inibir os ovos e afetar a motilidade do parasito *in vitro* e na redução da carga parasitária do nematoide *Heligmosomoides polygyrus* em camundongos (ABIDI, 2018). Já o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* (família: Myrtaceae) teve efeitos ovicidas e larvicidas e inibiu a motilidade de *H. contortus* (DE ARAÚJO-FILHO et al., 2018).

### **2.6.1 *Petroselinum crispum***

A espécie *Petroselinum crispum* Mill. (família: Apiaceae), popularmente conhecida como salsa ou salsinha no Brasil, é uma erva aromática e tem sua origem atribuída aos países da região ocidental do mediterrâneo. No entanto, a popularização do cultivo da *P. crispum* para outros países ocorreu a partir do século XVI, chegando ao Brasil durante o período da colonização (CHARLES, 2012). A utilização da *P. crispum* fez parte de várias crenças e celebrações ao logo da

história, além de ser utilizada na culinária e medicina. Atualmente, essa planta é um dos condimentos mais utilizados na culinária no mundo todo (HEREDIA et al., 2003).

*P. crispum* é uma planta herbácea anual (climas tropicais e subtropicais) ou bianual (climas temperados) que chega a medir entre 0,3 e 1 m. As folhas dessa planta são pinadas e dispostas alternadamente, possuindo a cor verde-escura. A inflorescência é do tipo umbela com pequenas flores amarela-esverdeadas hermafroditas. O fruto é um esquizocarpo e as sementes são ovoides. Após a maturação das sementes, a planta normalmente morre (AGYARE, et al. 2017). Sua melhor produtividade ocorre em solo areno-argiloso com pH entre 5,8 e 6,8, ricos em matéria orgânica (HEREDIA et al., 2003).

Além do seu uso culinário e em produtos alimentícios, o *P. crispum* possui propriedades diuréticas, estimula a menstruação e previne doenças cardiovasculares (CAMPOS; BALBI; ALVES, 2009).

As sementes de *P. crispum* produzem uma grande quantidade de óleo essencial. Sua composição química é principalmente uma mistura de monoterpenos e fenilpropanoides. Entre as propriedades do óleo de *P. crispum*, estão descritas as atividades antimicrobianas, antioxidantes, imunossupressoras, inseticidas e laxativas (FARZAEI et al., 2013; AGYARE, et al. 2017; INTIRACH et al., 2019).

### **2.6.2 *Ruta graveolens***

A espécie *Ruta graveolens* L. (família: Rutaceae), conhecida popularmente como arruda, é um subarbusto perene originário da Europa Meridional. Devido ao seu valor cultural e medicinal, o cultivo de *R. graveolens* atualmente é realizado em várias regiões do mundo, como América do Norte, Central e do Sul, China, Índia, Oriente Médio e África do Sul (ASGARPANAH; KHOSHKAM, 2012).

*R. graveolens* possui cheiro forte e um sabor amargo atribuído ao óleo da planta. O seu tamanho varia entre 0,5 e 1 m de altura. As folhas são alternadas, pecioladas, carnudas e glaucas (verde-azuladas). As pequenas flores são pentâmeras ou tetrâmeras de coloração amarela e os seus frutos são folículos com sementes pretas (PETIT-PALY et al., 1989).

A composição do óleo essencial de *R. graveolens* apresenta ácidos alifáticos, álcoois e cetonas (IVANOVA et al., 2004). Entre as propriedades do óleo de *R. graveolens*, têm-se as atividades anti-inflamatória, espasmolítica, anti-histamínica,

vermífuga, eupépticas e analgésicas (AL-SAID et al., 1990; ASGARPANAH; KHOSHKAM, 2012).

### 2.6.3 *Thymus vulgaris*

A espécie *Thymus vulgaris* L. (família: Lamiaceae), popularmente conhecida como tomilho, é um subarbusto perene aromático nativo do sul da Europa, da Espanha à Itália. *T. vulgaris* é uma planta medicinal com expressivo uso na indústria alimentícia e farmacêutica. Na medicina popular, esta planta é utilizada para tratar várias doenças inflamatórias, como reumatismo, inchaço muscular, dores e picadas de inseto (HOSSEINZADEH et al., 2015).

*T. vulgaris* é geralmente cultivada em climas temperados e subtropicais. O bom desenvolvimento desta planta ocorre em regiões áridas em solo arenoso com grande exposição aos raios solares (CASTRO; CHEMALE, 1995). Seu tamanho pode atingir entre 10 e 30 cm de altura. As folhas são pequenas, opostas e oblongo-lanceoladas, com coloração verde-acinzentada. Suas flores possuem coloração branca ou violeta clara e um cálice glandular piloso (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012).

O óleo essencial de *T. vulgaris* é composto principalmente de monoterpenos. O timol geralmente é o composto majoritário, também havendo a presença do seu isômero carvacrol, além do precursor dessa molécula, o p-cimeno. As propriedades desse óleo incluem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, anti-helmínticas, inseticidas e antiespasmódicas (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012; HOSSEINZADEH et al., 2015; FERREIRA et al., 2016).

As propriedades demonstradas de *T. vulgaris* apontam o potencial dessa planta no desenvolvimento de diversos produtos, como fármacos e suplementos alimentares. O fato dessa planta ser utilizada na alimentação sugere boa tolerância toxicológica em mamíferos (FERREIRA et al., 2016).

Neste contexto, estudos que objetivam a prospecção de novas terapias utilizando produtos naturais são de grande relevância para a medicina popular e para as populações menos favorecidas economicamente. Por isso, neste estudo foram selecionados três óleos essenciais de plantas conhecidas e difundidas na população brasileira para avaliar o potencial desses produtos como anti-helmínticos.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar quimicamente e avaliar as atividades anti-nematoides dos óleos essenciais comerciais de *Petroselinum crispum*, *Ruta graveolens* e *Thymus vulgaris* no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- 1) Determinar os principais constituintes químicos dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).
- 2) Avaliar a ação nematicida dos óleos essenciais sobre os *C. elegans* adultos por microscopia óptica.
- 3) Avaliar a interferência dos óleos essenciais no ciclo de vida do nematoide, verificando a presença de ovos e larvas juvenis vivas.
- 4) Avaliar alterações na motilidade dos nematoides adultos tratados com os óleos essenciais.
- 5) Avaliar a ação ovicida/ovistática dos óleos essenciais através do ensaio de inibição da eclodibilidade larval.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais comerciais (Laszlo Aromaterapia Ltda – Belo Horizonte, MG) de *Petroselinum crispum*, *Ruta graveolens* e *Thymus vulgaris* (Tabela 1) foram cedidos para este trabalho pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Lourenção Brighenti do Laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Araraquara, e mantidos em freezer a - 20 °C.

**Tabela 1.** Informações gerais dos óleos essenciais.

Família	Nome científico	Nome popular	País de cultivo	Lote	Parte	Extração
Apiaceae	<i>Petroselinum crispum</i>	salsa	França	001730	semente	destilação a vapor
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i>	arruda	Espanha	001696	erva	destilação a vapor
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i>	tomilho-branco	Hungria	001861	erva	destilação a vapor

Fonte: Arquivo pessoal.

### 4.2 Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa (GC 2010 Plus) acoplada à espectrometria de massa sequencial (MS TQ8040), com coluna capilar Rtx-5MS (Restek), fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm de espessura do filme) e hélio como gás de arraste (1 mL/min). As características operacionais foram as seguintes: injetor a 220 °C; a temperatura da coluna inicialmente a 40 °C foi mantida por 1 min, posteriormente foi aquecida a uma taxa de 8 °C/min até 280 °C, permanecendo nesta temperatura por 1 min. A temperatura de transferência da interface foi de 280 °C e a da fonte de íons de 300 °C. A injeção realizada foi do tipo split (30:1) e o volume de amostra introduzido foi de 1 µL.

O analisador de massas quadrupolar foi operado com varredura na faixa de 50 a 500 u. A identificação dos compostos voláteis foi realizada por comparação

com os dados espectrais da biblioteca (NIST 11.0), e, também, pela comparação dos índices de retenção com a literatura (ADAMS, 2007).

Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos pela análise de uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C7 a C40) aplicando-se a equação abaixo:

$$IR = 100n + 100 \times \frac{TR(i) - TR(n)}{TR(n+1) - TR(n)}$$

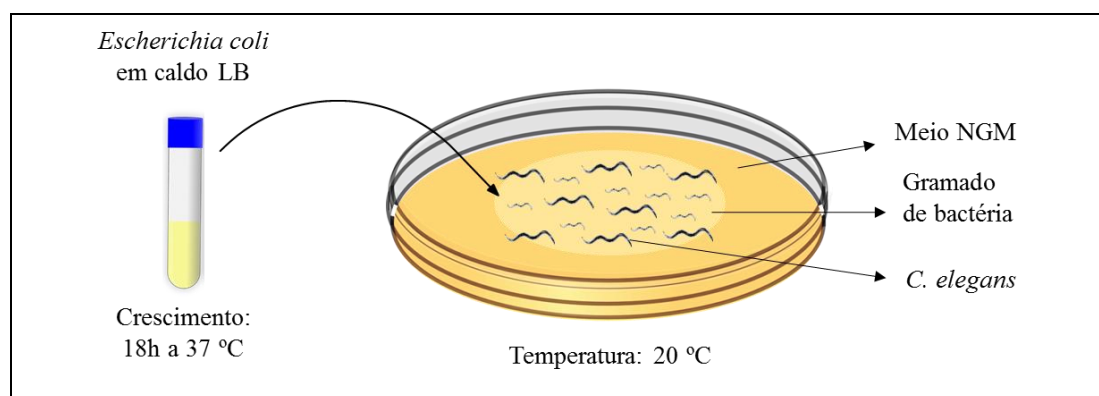
sendo **IR** o tempo de retenção, **i** o analito, **n** o número de carbonos do alcano adjacente menos retido, **n+1** o número do alcano adjacente mais retido.

### 4.3 Linhagem de *Caenorhabditis elegans*

Foi utilizada neste trabalho a linhagem do tipo selvagem de *C. elegans* (Bristol N2). Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Marisa Fusco-Almeida do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara.

### 4.4 Cultivo de *Caenorhabditis elegans*

Os *C. elegans* foram mantidos no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da UFSCar, coordenado pelo Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza. Os nematoides foram cultivados monoxenicamente (Figura 8) a 20 °C em placas de Petri contendo o meio sólido NGM (*Nematode Growth Medium*) (Tabela 2) semeado com bactéria. A cultura foi mantida a partir de repiques para um novo meio a cada sete dias.

**Figura 8.** Esquema do cultivo de *Caenorhabditis elegans*.

Fonte: Autor.

**Tabela 2.** Composição do meio NGM.

Componente	Quantidade
Ágar bacteriológico	17 g/L
NaCl	3 g/L
Peptona bacteriológica	2,5 g/L
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
Colesterol	5 mg/L
Tampão fosfato	25 mM
Água destilada	q.s.p.

Fonte: BRENNER, 1974.

Para ser obtido o meio NGM, foram preparadas separadamente as soluções de CaCl<sub>2</sub> (1 M), MgSO<sub>4</sub> (1 M), colesterol (5 mg/mL em etanol) e tampão fosfato (108,3 mg/mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 35,6 mg/mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) com pH 6. Com exceção da solução de colesterol, todas as soluções utilizadas foram esterilizadas por calor úmido sob pressão em autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Em ambiente estéril, estas soluções foram adicionadas à solução contendo ágar, NaCl e peptona bacteriológica de forma a ser obtido o meio NGM com a composição descrita na Tabela 2.

#### 4.5 Linhagem de *Escherichia coli*

Como fonte de alimento bacteriano para os nematoides *C. elegans* foi utilizada a linhagem de bactéria *Escherichia coli* OP50. A *E. coli* OP50 é auxotrófica

para uracila e apresenta crescimento limitado em meio NGM, de forma a não obscurecer os nematoides (BRENNER, 1974).

#### 4.6 Isolamento e cultivo de *Escherichia coli*

A *E. coli* OP50 foi previamente isolada em meio seletivo ágar MacConkey 5,1% (p/v) das placas cedidas de *C. elegans*. Uma colônia isolada da bactéria foi repicada para 5 mL de caldo LB (*Lysogeny Broth*) (Tabela 3) e incubadas durante 18h a 37 °C, sendo posteriormente mantidas refrigeradas a 4 °C. O caldo LB foi esterilizado por calor úmido sob pressão em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

**Tabela 3.** Composição do caldo LB.

Componente	Quantidade
Triptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Água destilada	q.s.p.

Fonte: STIERNAGLE, 2006.

#### 4.7 Obtenção dos ovos e sincronização das populações de nematoides

As placas de NGM contendo nematoides gravídicos, obtidas depois de quatro dias após o repique, foram submetidas à metodologia adaptada de lise alcalina de Solis e Petrascheck (2011). Por meio deste procedimento foram obtidos os ovos e a sincronização da idade dos nematoides.

Os nematoides e os ovos foram coletados das placas com a solução estéril do tampão M9 (Tabela 4) e transferidos para tubos cônicos de 15 mL. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi centrifugado (Centrífuga Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific, EUA) a 2.500 rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Para a lavagem do *pellet* e remoção das bactérias, os seguintes procedimentos foram realizados mais duas vezes: adição de 5 mL de tampão M9, centrifugação e descarte de sobrenadante.

**Tabela 4.** Composição das soluções tampão M9 e lise alcalina.

<b>Solução</b>	<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Tampão M9</b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g/L
	NaCl	5 g/L
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g/L
	Água destilada	q.s.p.
<b>Lise alcalina</b>	NaClO	0,85 % (v/v)
	NaOH	0,27 M
	Água destilada	q.s.p.

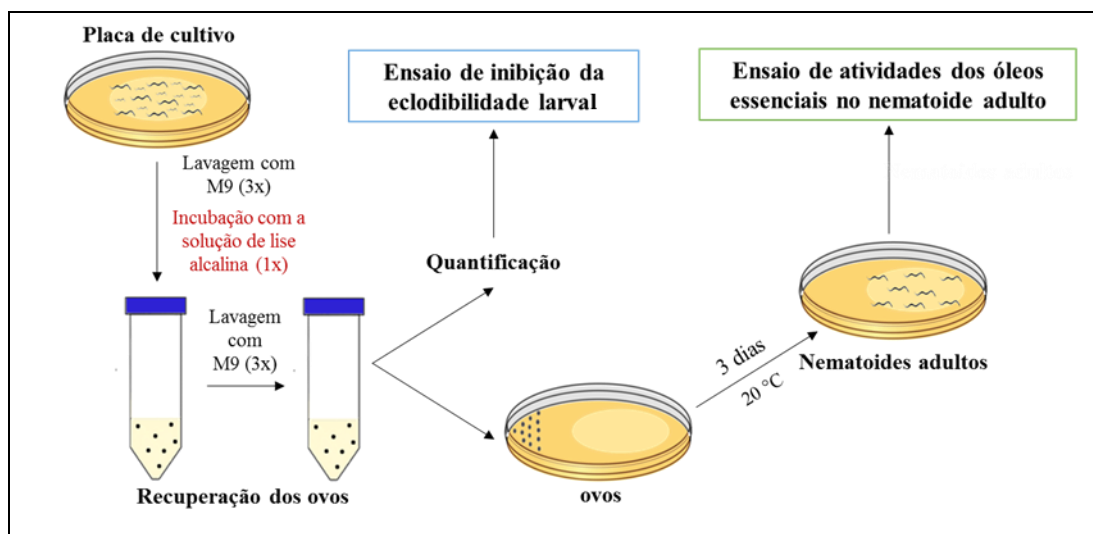
Fonte: Adaptado de SOLIS; PETRASCHECK, 2011.

Com o intuito de obter somente os ovos do nematoide, o *pellet* de cada tubo foi incubado com 5 mL da solução de lise alcalina (Tabela 4) durante 3 minutos para matar os nematoides e abrir os adultos grávidos para a liberação de mais ovos. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi novamente centrifugado (2.500 rpm por 2 minutos) e o sobrenadante descartado para a remoção da solução de lise alcalina. O *pellet* contendo os ovos de cada tubo foi lavado realizando três vezes os procedimentos de adição de 5 mL de tampão M9, centrifugação e descarte de sobrenadante.

O *pellet* contendo os ovos de cada tubo foi ressuspenso no pequeno volume de tampão M9 que restou no tubo e foram destinados para o ensaio de atividades dos óleos essenciais no nematoide adulto (item 4.8.2) ou para o teste de inibição da eclodibilidade larval (item 4.8.3) (Figura 9).

Para a obtenção de populações com idades sincronizadas para o ensaio do item 4.8.2. Os ovos foram transferidos para uma extremidade sem alimento da placa de cultura NGM semeada na região oposta com *E. coli* OP50. Em seguida, as placas foram incubadas a 20 °C. Após a eclosão das larvas L1, estas migraram para a região contendo a fonte de alimento bacteriana, separando-se dos restos dos nematoides mortos. Desta forma, após três dias do procedimento de lise alcalina, foram obtidos nematoides sincronizados na idade adulta (Figura 9).

**Figura 9.** Esquema da obtenção dos ovos e nematoides adultos sincronizados.



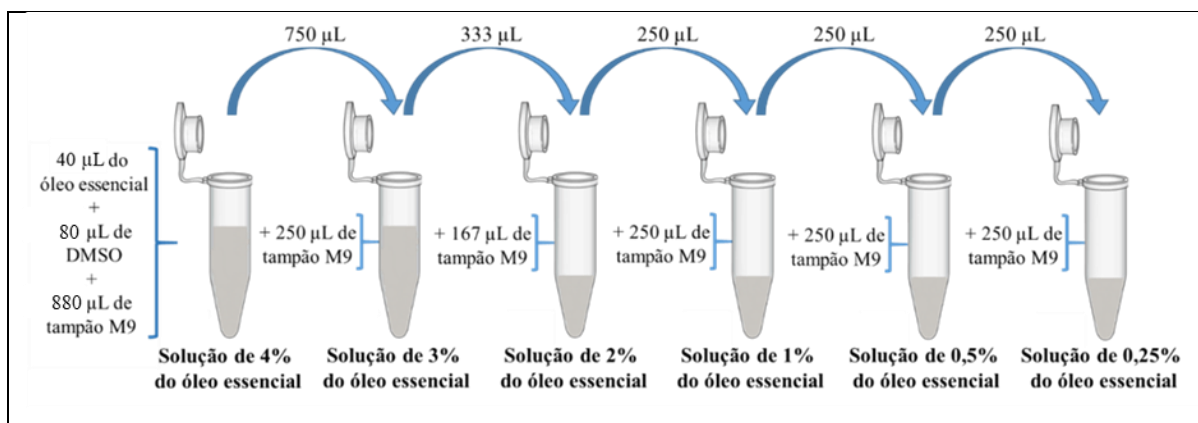
Fonte: Autor.

## 4.8 Ensaios biológicos com *Caenorhabditis elegans*

### 4.8.1 Preparo das soluções de tratamento com óleos essenciais

Cada óleo essencial foi diluído em um microtubo na proporção 1:3 em DMSO. Em seguida, foi adicionado o tampão M9 de forma que a solução passou a ter a concentração de tratamento de 4% (v/v) do óleo essencial e 8% de DMSO. Em seguida, por diluição seriada foram obtidas as demais concentrações de 3%, 2%, 1%, 0,5% e 0,25% (Figura 10). As soluções de tratamento foram preparadas logo antes de sua utilização.

**Figura 10.** Esquema da diluição dos óleos essenciais.



Fonte: Autor.

#### 4.8.2 Ensaio de atividades dos óleos essenciais no nematoide adulto

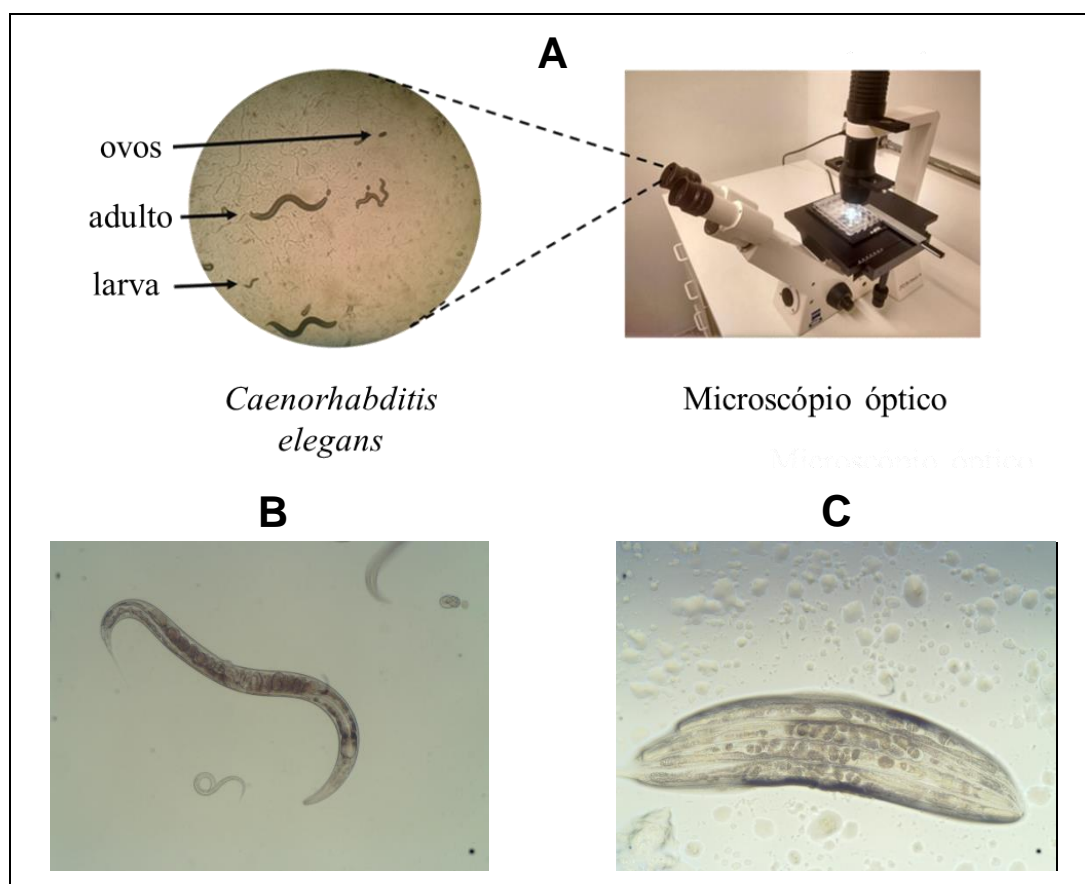
Os nematoides adultos, obtidos no item 4.7, foram coletados para um tubo cônico de 15 mL por meio de lavagem com tampão M9 da região das placas de cultura onde eles ficaram separados dos restos dos nematoides mortos no processo de sincronização. A concentração de nematoides na solução foi quantificada e ajustada de forma a conter cerca de 30 nematoides em uma gota de 10  $\mu$ L.

As placas de tratamento de 24 poços foram previamente preparadas com 0,5 mL de NGM por poço (HARTMAN; HERMAN, 1982). Em cada poço, foram adicionados 10  $\mu$ L da solução contendo os nematoides e as placas foram incubadas a 20 °C por um período de adaptação de 24h. Após este período, a superfície dos poços foi recoberta com 40  $\mu$ L das soluções de tratamento contendo os óleos essenciais. O solvente dos óleos, DMSO a 8% em tampão M9, foi utilizado como controle negativo. Como droga antiparasitária de referência, foi utilizado o composto nematicida levamisol a 25 mM (Sigma Aldrich, Lote: BCBR4973). Foram realizados três ensaios independentes com triplicatas para cada tratamento (n=9).

A contagem dos nematoides vivos foi realizada em microscópio óptico invertido 50x (Carl Zeiss, Alemanha) em intervalos de tempo fixos de tratamento de 0h, 6h, 24h e 48h. Os nematoides vivos foram identificados pela presença de movimentação corporal e conformação do corpo. Os nematoides com ausência de movimentação corporal, geralmente caracterizados com o corpo reto ou curvo, foram considerados mortos. Também foi observado se os compostos tem ação na motilidade dos nematoides adultos, que foram classificadas como normal, diminuída ou paralisada, e se houve a presença de ovos e larvas juvenis vivas nos poços após os tratamentos (Figura 11).



**Figura 11.** Visualização do *C. elegans* por microscopia óptica.

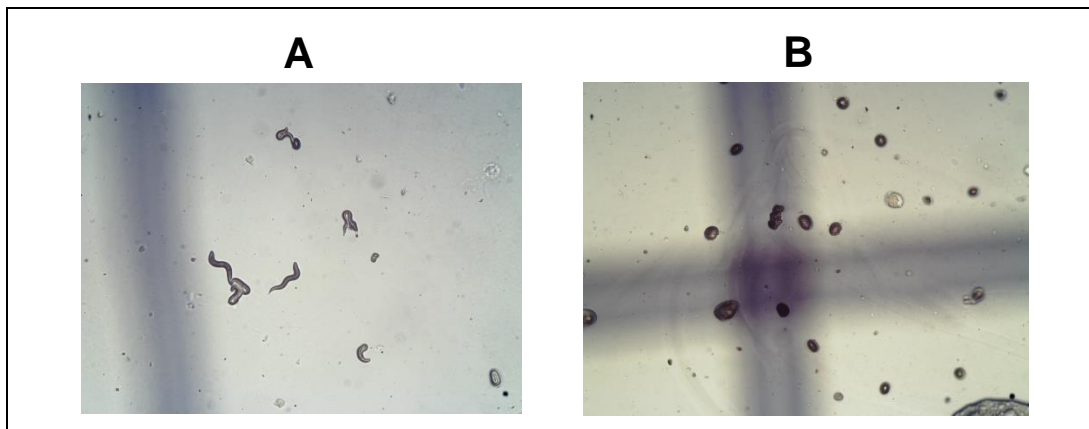


Legenda: (A): Esquema da avaliação do ensaio de atividades dos tratamentos no nematoide adulto e a presença de ovos e larvas (40x); (B): Conformação do corpo do nematoide adulto com motilidade normal (100x); (C): Conformação do corpo de nematoides adultos mortos (100x). Fonte: Autor.

#### 4.8.3 Ensaio de inibição da eclodibilidade larval

Os ovos, obtidos no item 4.7, foram quantificados em estereomicroscópio e a quantidade foi ajustada de forma a conter 50 ovos em 20  $\mu$ L. Em uma placa de 24 poços contendo 0,5 mL NGM por poço, foram colocados cerca 50 ovos em cada poço e adicionados 40  $\mu$ L das soluções de tratamento com os óleos essenciais (item 4.8.1) e de DMSO 8% em tampão M9 como controle negativo. Devido à ausência de atividade ovicida do levamisol, este composto não foi utilizado com droga antiparasitária de referência neste ensaio. Em seguida, as placas foram incubadas a 20 °C durante 24h. Após este período, o número de larvas que eclodiram dos ovos foi quantificado (Figura 12). Foram realizados três ensaios independentes com triplicatas para cada tratamento (n=9).

**Figura 12.** Visualização do ensaio de inibição da eclodibilidade larval por microscopia óptica.



Legenda: (A): Larvas juvenis que eclodiram dos ovos em até 24h de tratamento (100x); (B): Ovos em que as larvas não eclodiram após 24h de tratamento (100x). Fonte: Autor.

#### 4.8.4 Análise dos dados

Os dados de porcentagem de nematoides vivos e porcentagem de larvas eclodidas foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) e representados graficamente como média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os dados de porcentagem de nematoides vivos apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,0589$ ) e foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores (tempo e tratamento) seguido de post hoc de Bonferroni.

A avaliação comparativa dos dados de porcentagem de nematoides vivos entre os tratamentos com os óleos essenciais em cada período de tempo e também para avaliar os dados de porcentagem de larvas eclodidas (teste de Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,08$ ) foi realizada através Análise de Variância (ANOVA) a um fator seguido de post hoc de Tukey.

Para verificar a correlação dose-resposta (porcentagem de nematoides vivos decorrente da concentração dos óleos essenciais) e tempo-resposta (porcentagem de nematoides vivos decorrente do tempo de tratamento) foi utilizado o teste de correlação de Pearson a 5% de significância.

Os dados de motilidade dos nematoides e presença de larvas vivas e ovos foram analisados descritivamente.

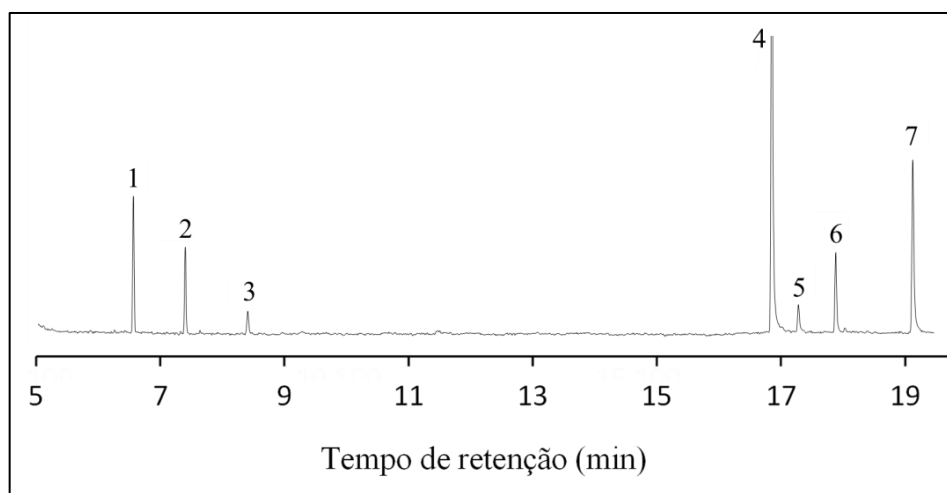
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização química dos óleos essenciais

#### 5.1.1 Caracterização química do óleo essencial de *Petroselinum crispum*

Um total de 7 compostos foi apontado na caracterização química do óleo essencial de *P. crispum*, sendo miristicina (52,5%), apiol (18,6%) e  $\alpha$ -pineno (10,4%) os compostos majoritários. Apenas um composto não pôde ser identificado (Figura 13 e Tabela 5).

**Figura 13.** Espectros obtidos do óleo essencial de *P. crispum* analisados por CG/EM.



Legenda: os números apresentados nos picos representam cada composto apontado na Tabela 5. Fonte: Autor.

**Tabela 5.** Caracterização química do óleo essencial de *P. crispum* por análise CG/EM.

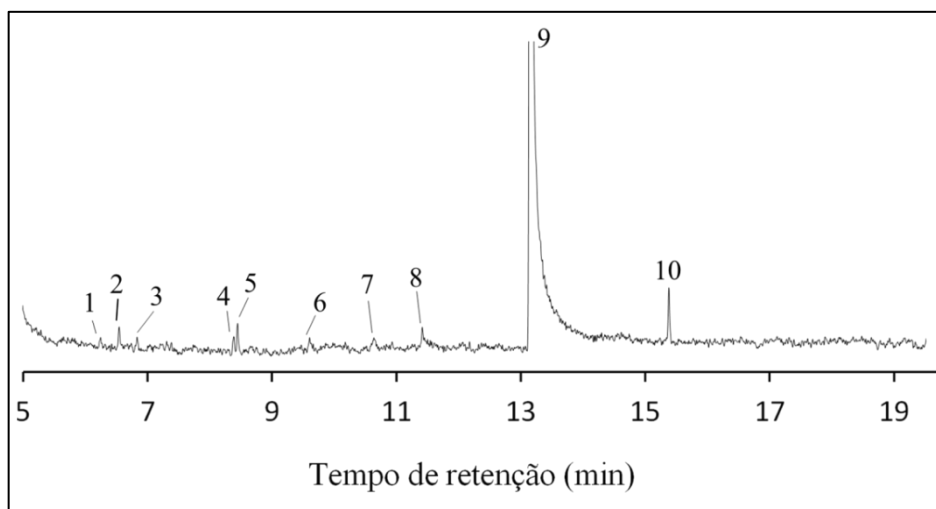
Pico	Componentes	TR	IR <sub>obs</sub>	IR <sub>tab</sub>	% Área relativa (média ± dp)
1	$\alpha$ -Pineno*	6.687	936	932	10,400 ± 0,090
2	$\beta$ -Pineno	7.553	981	974	6,380 ± 0,179
3	NI	8.594	1034	-	1,970 ± 0,025
4	Miristicina*	17.333	1535	1517	52,500 ± 0,317
5	Elemicina	17.776	1565	1555	2,830 ± 0,132
6	Aliltetrametoxibenzeno	18.398	1607	1595	7,300 ± 0,062
7	Apiol*	19.683	1697	1677	18,600 ± 0,134

Legenda: NI = não identificado; TR = tempo de retenção (min); IR<sub>obs</sub> = índice de retenção observado; IR<sub>tab</sub> = índice de retenção tabelado (ADAMS, 2007); dp = desvio padrão; \* = componentes majoritários. Fonte: Autor.

### 5.1.2 Caracterização química do óleo essencial de *Ruta graveolens*

Um total de 10 compostos foi apontado na caracterização química do óleo essencial de *R. graveolens*, sendo 2-undecanona (96%) o composto majoritário. Apenas um composto não pôde ser identificado (Figura 14 e Tabela 6).

**Figura 14.** Espectros obtidos do óleo essencial de *R. graveolens* analisados por CG/EM.



Legenda: os números apresentados nos picos representam cada composto apontado na Tabela 6. Fonte: Autor.

**Tabela 6.** Caracterização química do óleo essencial de *R. graveolens* por análise CG/EM.

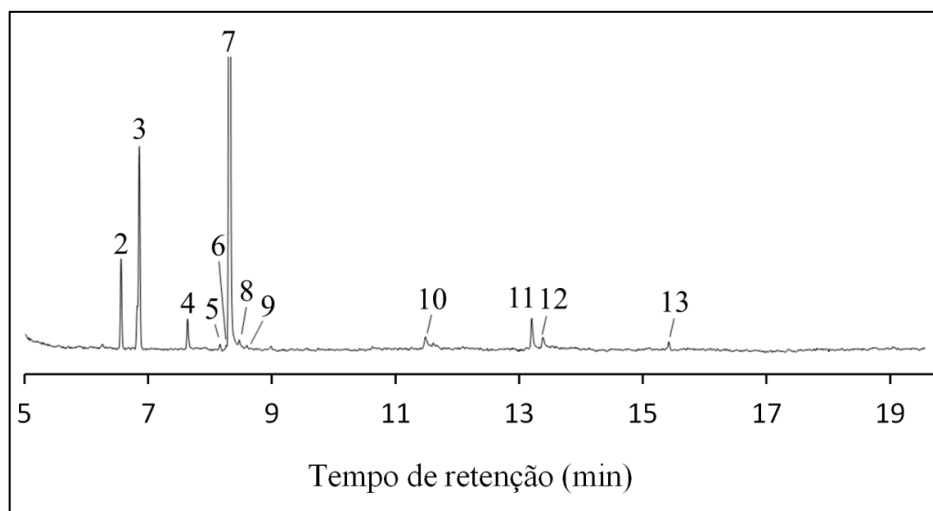
Pico	Componentes	TR	IR <sub>obs</sub>	IR <sub>tab</sub>	% Área relativa (média ± dp)
1	NI	6.384	921	-	0,200 ± 0,017
2	α-Pineno	6.689	937	932	0,396 ± 0,048
3	Canfeno	6.987	952	946	0,184 ± 0,120
4	D-Limoneno	8.578	1033	1024	0,354 ± 0,045
5	Eucaliptol	8.649	1037	1026	0,462 ± 0,072
6	2-Nonanona	9.840	1097	1087	0,455 ± 0,257
7	β-Pinona	10.904	1154	1135	0,398 ± 0,090
8	2-Decanona	11.704	1196	1190	0,399 ± 0,055
9	2-Undecanona*	13.486	1296	1293	96,000 ± 0,265
10	β-Cariofileno	15.777	1435	1423	1,140 ± 0,141

Legenda: NI = não identificado; TR = tempo de retenção (min); IR<sub>obs</sub> = índice de retenção observado; IR<sub>tab</sub> = índice de retenção tabelado (ADAMS, 2007); dp = desvio padrão; \* = componentes majoritários. Fonte: Autor.

### 5.1.3 Caracterização química do óleo essencial de *Thymus vulgaris*

Um total de 13 compostos foi apontado na caracterização do óleo essencial de *T. vulgaris*, sendo p-cimeno (73,6%) e canfeno (13,8%) os compostos majoritários. Um total de 3 composto não foram identificados (Figura 15 e Tabela 7).

**Figura 15.** Espectros obtidos do óleo essencial de *T. vulgaris* analisados por CG/EM.



Legenda: os números apresentados nos picos representam cada composto apontado na Tabela 7. Fonte: Autor.

**Tabela 7.** Caracterização química do óleo essencial de *T. vulgaris* por análise CG/EM.

Pico	Composto	TR	IR <sub>obs</sub>	IR <sub>tab</sub>	% Área relativa (média ± DP)
1	NI	6.377	922	-	0,198 ± 0,024
2	α-Pineno	6.689	937	932	4,850 ± 0,074
3	Canfeno*	6.987	952	946	13,800 ± 0,320
4	β-Mirceno	7.788	993	988	1,790 ± 0,004
5	Terpinoleno	8.327	1020	1086	0,348 ± 0,030
6	NI	8.430	1025	-	0,120 ± 0,023
7	p-Cimeno*	8.484	1028	1020	73,600 ± 0,291
8	NI	8.644	1036	-	0,234 ± 0,015
9	o-Cimeno	8.775	1043	1022	0,194 ± 0,017
10	α-Terpineol	11.738	1198	1186	1,140 ± 0,151
11	Timol	13.503	1297	1289	2,520 ± 0,320
12	Carvacrol	13.688	1308	1298	0,832 ± 0,065
13	β-Cariofileno	15.777	1435	1423	0,410 ± 0,086

Legenda: NI = não identificado; TR = tempo de retenção (min); IR<sub>obs</sub> = índice de retenção observado; IR<sub>tab</sub> = índice de retenção tabelado (ADAMS, 2007); dp = desvio padrão; \* = Componentes majoritários. Fonte: Autor.

Um total de 21 compostos cobrindo entre 76,9% e 90% da composição total dos óleos essenciais foi identificado por CG/EM, havendo uma variabilidade de constituintes entre as espécies. O composto comum identificado na caracterização dos três óleos essenciais foi o  $\alpha$ -pineno. Os compostos canfeno e  $\beta$ -cariofileno foram identificados na caracterização dos óleos essenciais de *R. graveolens* e *T. vulgaris*. Os dados obtidos mostraram que o óleo essencial de *P. crispum* é constituído por monoterpenos e, principalmente, por fenilpropanoides. A constituição do óleo essencial de *R. graveolens* identificada foi de monoterpenos, sesquiterpenos e, principalmente, cetonas. Por fim, os constituintes identificados do óleo essencial de *T. vulgaris* obtidos foi de sesquiterpenos e, principalmente, monoterpenos.

## 5.2 Ensaio de atividades anti-nematoides no nematoide adulto

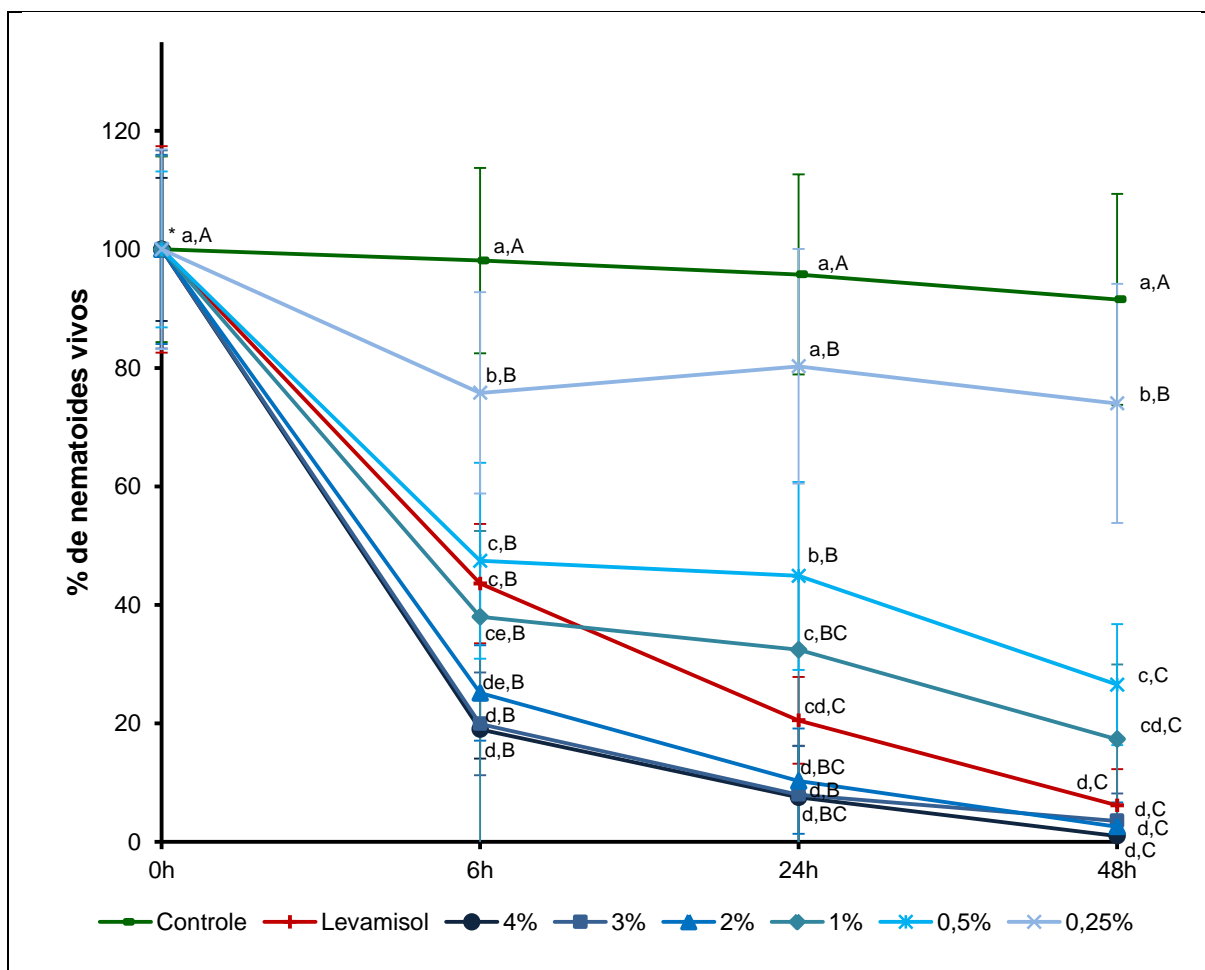
### 5.2.1 Óleo essencial de *Petroselinum crispum*

O óleo essencial de *P. crispum* (salsa) foi capaz de reduzir estatisticamente a quantidade de nematoides adultos vivos ( $p < 0,05$ ) a partir da concentração de 0,5% em comparação com o grupo Controle nos períodos de tempo de 6h, 24h e 48h (Figura 16), sendo letal para cerca de 50% dos nematoides nas primeiras 6h e cerca de 75% em 48h no tratamento com 0,5% do óleo essencial.

O tratamento realizado com 1% do óleo essencial de *P. crispum* apresentou resultados estatisticamente semelhantes aos do grupo Levamisol nos períodos de tempo de 6h, 24h e 48h ( $p > 0,05$ ). Já as concentrações de 2%, 3% e 4% apresentaram maior atividade nematicida que o grupo Levamisol no período de tempo de 6h e se mantiveram estatisticamente semelhantes ao grupo Levamisol comparando os períodos de 24h e 48h (Figura 16).

O óleo essencial de *P. crispum* em cada concentração de 0,5%, 1%, 2% e 4% e o grupo Levamisol reduziram significativamente a porcentagem de nematoides vivos entre os períodos de tempo de 6h para 48h ( $p < 0,05$ ). O grupo Levamisol não apresentou redução significativa na porcentagem de nematoides vivos no período de tempo de 24h para 48h ( $p > 0,05$ ) (Figura 16).

**Figura 16.** Porcentagem de nematoides vivos (média  $\pm$  dp) (n=9) após tratamento com o óleo essencial de *P. crispum* em diferentes concentrações nos períodos de tempo 0h, 6h, 24h e 48h.



Legenda: Letras minúsculas distintas (a, b, c, d) demonstram diferenças estatísticas entre os grupos de tratamentos considerando o mesmo período de tempo. Letras maiúsculas distintas (A, B, C) demonstram diferenças estatísticas entre os períodos de tempo considerando o mesmo grupo de tratamento (ANOVA a dois fatores, seguido de teste post hoc de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). \* = Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos no tempo 0h,  $p > 0,05$ . Fonte: Autor.

Não foram observados para o óleo essencial de *P. crispum* correlação dose-resposta ( $p \geq 0,0587$ ) e tempo-resposta ( $p \geq 0,2013$ ) estatisticamente significativos.

Os dados de motilidade (Tabela 8) indicam que o óleo essencial de *P. crispum* foi capaz de diminuir a motilidade dos nematoides adultos sobreviventes na concentração de 2% em 48h e nas concentrações superiores nos períodos de tempo 6h, 24h e 48h. Somente o grupo Levamisol foi capaz de causar a paralisia dos nematoides adultos sobreviventes em todos os períodos analisados.

Em todos os tratamentos foi observada a presença de ovos. Foi observada a ausência de larvas vivas no período de tempo de 6h somente para a concentração de 4% do óleo essencial. Nos períodos de tempo de 24h e 48h não houve a

presença de larvas vivas nas concentrações de 2%, 3% e 4% do óleo essencial (Tabela 8).

**Tabela 8.** Dados de motilidade, presença de ovos e larvas vivas após tratamento com o óleo essencial de *P. crispum*.

Tratamento	Ovos	6h			24h			48h		
		Larvas vivas	Motilidade (adultos)	Ovos	Larvas vivas	Motilidade (adultos)	Ovos	Larvas vivas	Motilidade (adultos)	
Óleo de <i>P. crispum</i>	0,25%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	0,5%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	1%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	2%	+	+	Normal	+	-	Normal	+	-	Diminuída
	3%	+	+	Diminuída	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída
	4%	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída
Controle	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal	
Levamisol	+	+	Paralisados	+	+	Paralisados	+	+	Paralisados	

Legenda: + = presença; - = ausência. Fonte: Autor.

### 5.2.2 Óleo essencial de *Ruta graveolens*

O óleo essencial de *R. graveolens* (arruda) reduziu estatisticamente a quantidade de nematoides adultos vivos em relação ao grupo Controle nas concentrações de 2%, 3% e 4 % nos períodos de tempo de 6h, 24h e 48h ( $p < 0,05$ ) (Figura 17). A concentração de 2% do óleo essencial foi letal para cerca de 40% dos nematoides nas primeiras 6h e cerca de 50% em 48h.

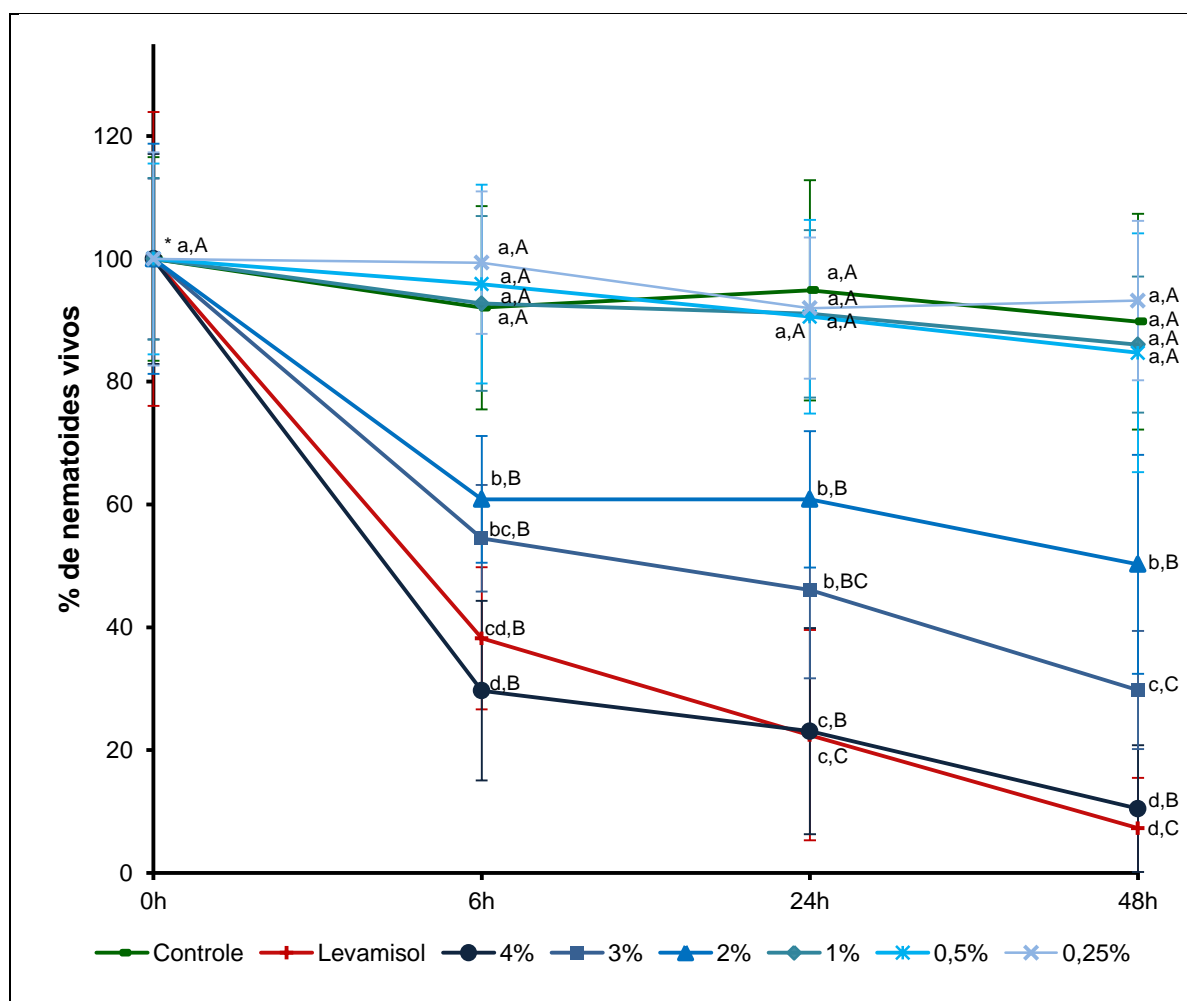
O óleo essencial de *R. graveolens* nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1% e o grupo Controle apresentaram porcentagens de nematoides vivos estatisticamente semelhantes ao longo de todos os períodos de tempo ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).

Somente a concentração máxima de 4% do óleo essencial de *R. graveolens* em todos os períodos de tempo apresentou uma redução de nematoides vivos estatisticamente semelhante ao grupo Levamisol ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).

O óleo essencial de *R. graveolens* na concentração de 3% e o grupo Levamisol reduziram significativamente a porcentagem de nematoides vivos entre os períodos de tempo de 6h para 48h ( $p < 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Porcentagem de nematoides vivos (média  $\pm$  dp) (n=9) após tratamento com o óleo essencial de *R. graveolens* em diferentes concentrações nos períodos de tempo 0h, 6h, 24h e 48h.



Legenda: Letras minúsculas distintas (a, b, c, d) demonstram diferenças estatísticas entre os grupos de tratamentos considerando o mesmo período de tempo. Letras maiúsculas distintas (A, B, C) demonstram diferenças estatísticas entre os períodos de tempo considerando o mesmo grupo de tratamento (ANOVA a dois fatores, seguido de teste post hoc de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). \* = Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos no tempo 0h,  $p > 0,05$ . Fonte: Autor.

Foi obtida uma significativa correlação dose-resposta ( $p \leq 0,0018$ ) classificada como muito forte ( $-0,96 \leq r^2 \leq -0,98$ ) para as diferentes concentrações do óleo essencial de *R. graveolens* em relação ao número de nematoides vivos dentro de cada tempo avaliado (6h, 24h e 48h).

Para os diferentes tempos de tratamento com o óleo essencial de *R. graveolens*, foi observada uma significativa ( $p = 0,0142$ ) correlação tempo-resposta classificada como muito forte ( $r^2 = -0,99$ ) apenas no tratamento com 0,5% do óleo essencial.

Os dados de motilidade (Tabela 9) indicam que o óleo essencial de *R. graveolens* foi capaz de diminuir a motilidade dos nematoides adultos sobreviventes

nas concentrações de 3% e 4% nos períodos de 6h, 24h e 48h. Somente o Levamisol foi capaz de causar a paralisia dos nematoides adultos sobreviventes em todos os períodos analisados (6h, 24h e 48h).

Em todos os tratamentos foi observada a presença de ovos. Foi observada a ausência de larvas vivas no período de tempo de 6h, 24h e 48h também nas concentrações de 3% e 4% do óleo essencial de *R. graveolens* (Tabela 9).

**Tabela 9.** Dados de motilidade, presença de ovos e larvas vivas após tratameto com o óleo essencial de *R. graveolens*.

Tratamento	6h			24h			48h			
	Ovos	Larvas vivas	Motilidade (adultos)	Ovos	Larvas vivas	Motilidade (adultos)	Ovos	Larvas vivas	Motilidade (adultos)	
Óleo de <i>R. graveolens</i>	0,25%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	0,5%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	1%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	2%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	3%	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída
	4%	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída
Controle	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal	
Levamisol	+	+	Paralisados	+	+	Paralisados	+	+	Paralisados	

Legenda: + = presença; - = ausência. Fonte: Autor.

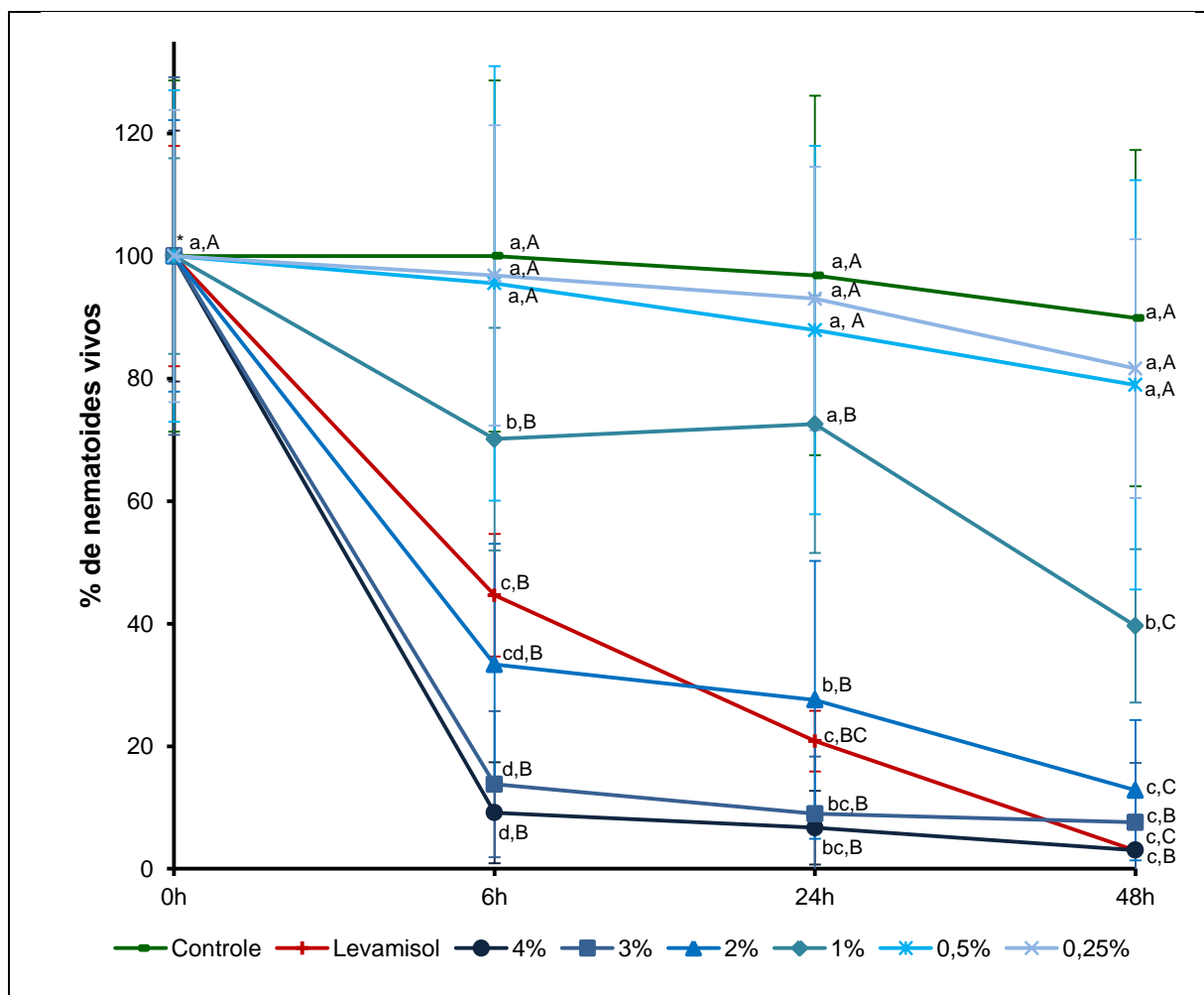
### 5.2.3 Óleo essencial de *Thymus vulgaris*

De acordo com o gráfico abaixo (Figura 18), o óleo essencial de *T. vulgaris* (tomilho-branco) reduziu estatisticamente a quantidade de nematoides adultos vivos em relação ao grupo Controle nas concentrações de 2%, 3% e 4 % nos períodos de tempo de 6h, 24h e 48h ( $p < 0,05$ ). A concentração de 2% foi letal para cerca de 60% dos nematoides nas primeiras 6h e cerca de 80% em 48h. Somente as concentrações de 3% e 4%, no período de tempo de 6h, apresentaram uma redução de nematoides vivos significativamente superior ao grupo Levamisol.

O óleo essencial nas concentrações de 0,25% e 0,5% e o grupo Controle apresentaram porcentagens de nematoides vivos estatisticamente semelhantes ao longo de todos os períodos de tempo ( $p > 0,05$ ). O mesmo ocorreu com o óleo nas concentrações de 2%, 3% e 4%, porém nos períodos de 6h, 24h e 48h (Figura 18).

O óleo essencial de *T. vulgaris* na concentração de 1% e 2% e o grupo Levamisol reduziram significativamente a porcentagem de nematoides vivos entre os períodos de tempo de 6h para 48h ( $p < 0,05$ ) (Figura 18).

**Figura 18.** Porcentagem de nematoides vivos (média  $\pm$  dp) (n=9) após tratamento com o óleo essencial de *T. vulgaris* em diferentes concentrações nos períodos de tempo 0h, 6h, 24h e 48h.



Legenda: Letras minúsculas distintas (a, b, c, d) demonstram diferenças estatísticas entre os grupos de tratamentos considerando o mesmo período de tempo. Letras maiúsculas distintas (A, B, C) demonstram diferenças estatísticas entre os períodos de tempo considerando o mesmo grupo de tratamento (ANOVA a dois fatores, seguido de teste post hoc de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). \* = Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos no tempo 0h,  $p > 0,05$ . Fonte: Autor.

Foi obtida uma significativa correlação dose-resposta ( $p \leq 0,0115$ ) classificada como muito forte ( $-0,91 \leq r^2 \leq -0,96$ ) para as diferentes concentrações do óleo essencial de *T. vulgaris* em relação ao número de nematoides vivos dentro de cada tempo avaliado (6h, 24h e 48h). Para os diferentes tempos de tratamento com o óleo essencial de *T. vulgaris*, foi observada uma significativa ( $p \leq 0,0127$ ) correlação

tempo-resposta classificada como muito forte ( $r^2=0,99$ ) apenas nos tratamentos com 0,25% e 0,5% do óleo essencial.

Os dados de motilidade (Tabela 10) indicam que o óleo essencial de *T. vulgaris* foi capaz de diminuir a motilidade dos nematoides adultos sobreviventes nas concentrações de 2%, 3% e 4% nos períodos de 6h, 24h e 48h. Somente o Levamisol foi capaz de causar a paralisia dos nematoides adultos sobreviventes em todos os períodos analisados.

Em todos os tratamentos foi observada a presença de ovos. Foi observada a ausência de larvas vivas no período de tempo de 6h, 24h e 48h nas concentrações 3% e 4% (Tabela 10).

**Tabela 10.** Dados de motilidade, presença de ovos e larvas vivas tratados com o óleo essencial de *T. vulgaris*.

Tratamento	Ovos	6h			24h			48h		
		Larvas vivas	Motilidade (adultos)	Ovos	Larvas vivas	Motilidade (adultos)	Ovos	Larvas vivas	Motilidade (adultos)	
Óleo de <i>T. vulgaris</i>	0,25%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	0,5%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	1%	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal
	2%	+	+	Diminuída	+	+	Diminuída	+	+	Diminuída
	3%	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída
	4%	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída	+	-	Diminuída
Controle	+	+	Normal	+	+	Normal	+	+	Normal	
Levamisol	+	+	Paralisados	+	+	Paralisados	+	+	Paralisados	

Legenda: + = presença; - = ausência. Fonte: Autor.

#### 5.2.4 Análise comparativa do efeito nematicida dos óleos essenciais por período de tempo

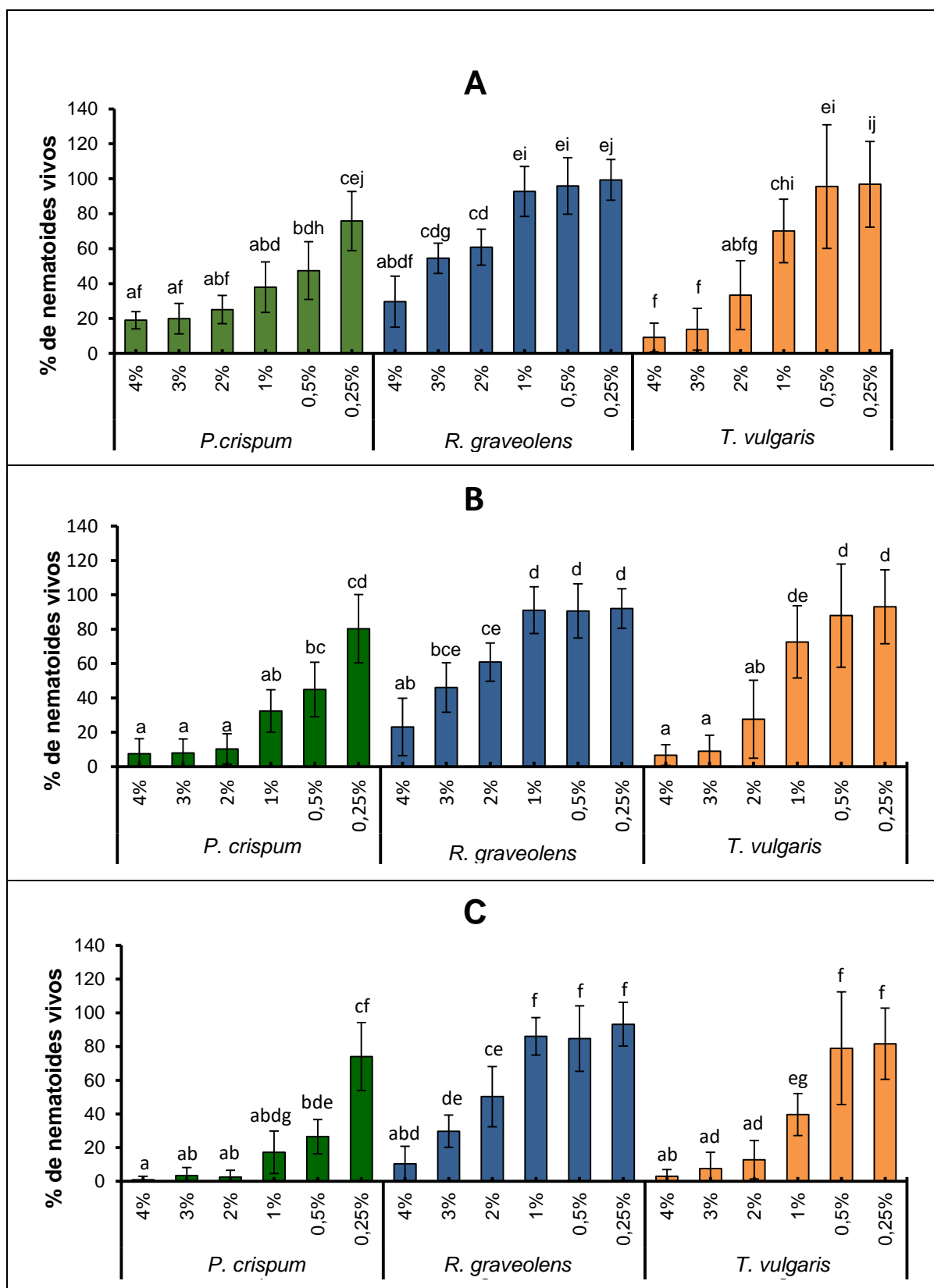
A Figura 19 apresenta a comparação dos dados dos três óleos essenciais nos períodos de tempo de 6h, 24h e 48h. Nos três períodos de tempo, os três óleos essenciais apresentaram desempenho estatisticamente semelhantes entre si nas concentrações de 0,25% e 4%.

Os óleos essenciais de *P. crispum* e *T. vulgaris* apresentaram maior efeito nematicida que a *R. graveolens* na concentração de 2% nos três períodos de tempo. O mesmo resultado foi observado na concentração de 3% nos períodos de tempo de 6h e 24h (Figura 19).

O óleo essencial de *P. crispum* apresentou maior atividade nematicida em comparação aos outros óleos nos três períodos de tempo na concentração de 0,5%. Já nos períodos de tempo de 6h e 24h, apresentou maior atividade nematicida na concentração de 1% e, no período tempo de 48h, na concentração de 3%. A menor concentração do óleo essencial de *P. crispum* capaz de reduzir significativamente ao longo de todos os períodos de tempo a porcentagem de nematoides vivos foi a de 0,5% (Figura 19).

O óleo essencial de *R. graveolens* só conseguiu apresentar atividade nematicida equivalente ou maior a do óleo de *P. crispum* na concentração de 0,5%, a partir da concentração de 2% em todos os períodos de tempo. Enquanto que o óleo de *T. vulgaris* teve efeito equivalente ou superior ao *P. crispum* (0,5%) a partir de 2% nos períodos de 6h e 24h e 1% com 48h de tratamento (Figura 19).

**Figura 19.** Porcentagem de nematoides vivos (média  $\pm$  dp) (n=9) após tratamento com os óleos essenciais de *P. crispum*, *R. graveolens* e *T. vulgaris* em diferentes concentrações nos períodos de tempo 6h, 24h e 48h.



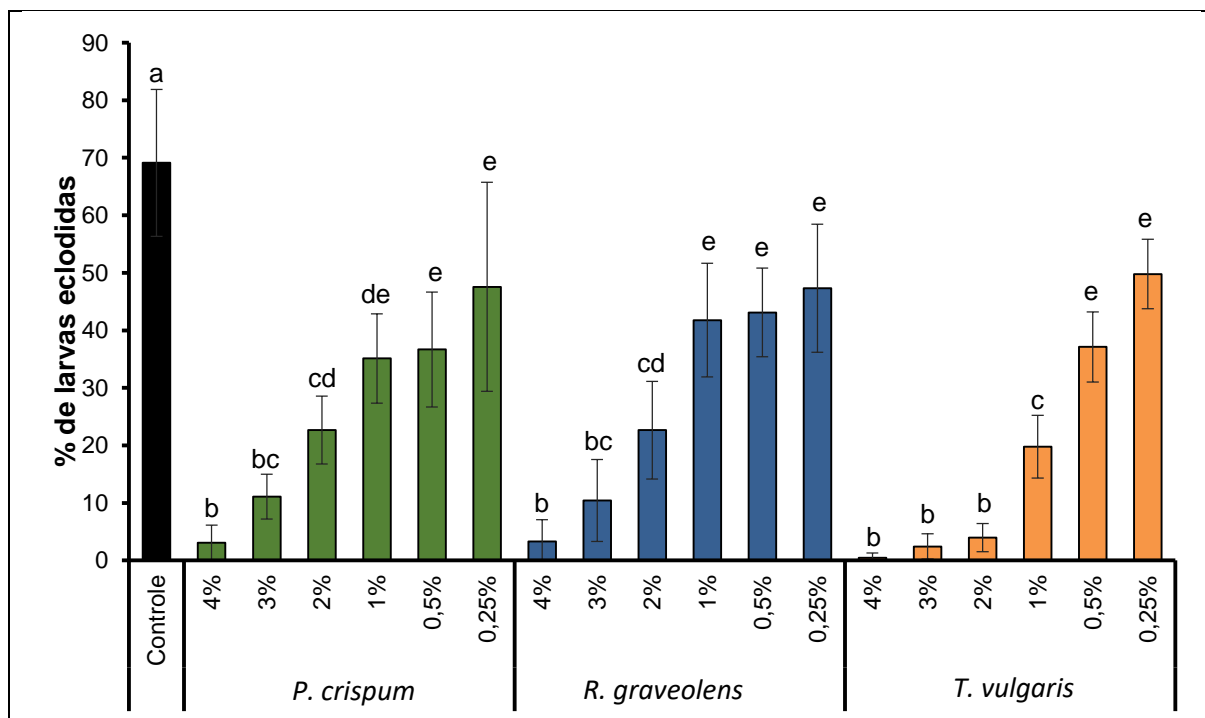
Legenda: Letras distintas (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j) demonstram diferenças estatísticas entre os óleos essenciais (ANOVA a um fator, seguido de teste post hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ). (A): Período de tempo de 6h; (B): período de tempo de 24h; (C): período de tempo de 48h. Fonte: Autor.

### 5.3 Ensaio de inibição da eclodibilidade larvar

Os resultados desse ensaio para inibição da eclodibilidade larvar (Figura 20) demonstram que os três óleos essenciais em todas as concentrações foram capazes de atuar sobre os ovos de *C. elegans*, impedindo a eclosão das larvas no período de 24h.

Os óleos essenciais de *P. crispum* e *R. graveolens* apresentaram desempenho estatisticamente semelhante ( $p > 0,05$ ) em todas as concentrações testadas. O óleo essencial de *T. vulgaris* também apresentou o mesmo desempenho em relação aos outros dois óleos, exceto nas concentrações de 1% e 2%. As concentrações de 1% e 2% do óleo de *T. vulgaris* foram capazes de reduzir uma maior quantidade de larvas eclodidas em comparação com os outros dois óleos nessas mesmas concentrações ( $p < 0,05$ ) (Figura 20).

**Figura 20.** Porcentagem de larvas eclodidas após tratamento dos ovos de *C. elegans* com o óleo essencial de *P. crispum*, *R. graveolens* e *T. vulgaris* em diferentes concentrações por 24h (n=9).



Legenda: Letras distintas (a, b, c, d, e) demonstram diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA a um fator, seguido de teste post hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ). Fonte: Autor.

## 6. DISCUSSÃO

Os poucos estudos e os escassos investimentos no desenvolvimento de novas terapias anti-helmínticas têm sido questões preocupantes para o controle de helmintíases há décadas (CSERMELY et al., 2013; MACKENZIE; GEARY, 2013). Este trabalho mostrou que os óleos essenciais oriundos das plantas *Petroselinum crispum* (salsa), *Ruta graveolens* (arruda) e *Thymus vulgaris* (tomilho-branco) apresentam potencial anti-nematoide, podendo ser considerados promissores para a elaboração de novas terapias eficazes contra espécies parasitas de nematoides.

Optou-se por utilizar o modelo *Caenorhabditis elegans* em substituição ao estudo direto de nematoides parasitos com ciclo de vida complexo, já que o mesmo é intensamente estudado e caracterizado a nível genômico, e possui diversas vantagens, como capacidade de alto rendimento e facilidade de cultivo em laboratório, além de funcionar bem no rastreamento de anti-helmínticos de amplo espectro (SALINAS; RISI, 2018).

Neste estudo, foram utilizadas concentrações mais altas do óleo essencial, assim como do levamisol, uma vez que estes foram aplicados sobre os nematoides em meio sólido, difundindo-se por toda a superfície do ágar. Esta metodologia foi utilizada devido à facilidade de avaliação do fenótipo do nematoide (motilidade e vivo/morto), visualização dos ovos e contagem do número de sobreviventes, em comparação com a metodologia que utiliza meio líquido. Além disso, o óleo de *P. crispum* não foi capaz de ser totalmente diluído em nenhum solvente testado (tween 20, tween 80, propilenoglicol, DMSO), sendo o DMSO o que apresentou melhores resultados sem apresentar efeitos tóxicos nas concentrações utilizadas nesta metodologia.

O óleo essencial com atividade mais pronunciada contra o estágio adulto de *C. elegans* e capaz de inibir a presença de larvas juvenis vivas foi o de *P. crispum*. Já a atividade ovicida/ovistática e de diminuição da motilidade de adultos foi mais expressiva no óleo essencial de *T. vulgaris*. Os efeitos anti-nematoides obtidos para os três óleos essenciais frente ao *C. elegans* podem estar relacionados ao fato dos óleos serem constituídos por misturas complexas de substância capazes de atuarem em conjunto produzindo efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (CHOUHAN, 2017). Segundo OKA (2001), outra possibilidade é que, devido à hidrofobicidade dos



seus constituintes, os óleos essenciais podem ser capazes de romper a membrana celular do nematoide e alterar a sua permeabilidade (OKA, 2001)

Segundo Charles (2012), os principais constituintes do óleo essencial de sementes de *P. crispum* são os fenilpropanoides miristicina, apiol e aliltetrametoxibenzeno e o monoterpeneo  $\alpha$ -pineno, sendo a miristicina e o apiol geralmente os compostos majoritários. Essas informações corroboram com os dados de CG/EM obtidos neste trabalho. Sendo assim, ambos compostos podem ter um importante papel no efeito nematicida do óleo essencial, uma vez que essas substâncias isoladas já apresentaram atividade contra o fitonematóide *M. incognita* (CABONI, 2014).

De acordo com Sousa et al (2012), tanto o óleo essencial de *P. crispum* quanto os constituintes miristicina e apiol foram capazes de reduzir a eclodibilidade em ovos do inseto *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). Além disso, a miristicina e o apiol já foram descritos como sinergistas de inseticidas naturais e sintéticos (LICHTENSTEIN; CASIDA, 1963; LICHTENSTEIN et al., 1974; BERENBAUM; NEAL, 1985). Trabalhos realizados por Oka et al. (2000) demonstraram que há uma forte associação entre a atividade nematicida e inseticida, como ocorre com as avermectinas, além de sugerirem que os componentes dos óleos essenciais podem estar envolvidos na interrupção do sistema nervoso do nematoide.

Estudos *in silico*, realizados por Babu et. al (2012), indicaram que a potencial atividade nematicida da miristicina poderia estar relacionada com a inibição da glutathione-S-transferase (GST), enzima multifuncional envolvida na desintoxicação de compostos endógenos reativos e xenobióticos. Além disso, a miristicina é capaz de interferir com oxidases de função mista e levar a suscetibilidade a outros metabólitos secundários, elevando a sua toxicidade (BERENBAUM; NEAL, 1985). Por outro lado, em um estudo realizado por López et al. (2015), a miristicina não foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase, mecanismo de ação de outras drogas anti-helmínticas.

A expressiva presença do composto 2-undecanona (96%) no óleo essencial de *R. graveolens* sugere que este composto está ligado às suas atividades anti-nematoides. Diversos pesquisadores já relataram o efeito nematicida de *R. graveolens*. Dias et al. (2000) demonstraram efeitos nematostático em *M. incognita* após tratamento *in vitro* com 2% do extrato aquoso desta planta. Além disso, o óleo

essencial de *R. graveolens* também apresentou efeito nematicida contra o nematoide parasito de pinheiro *Bursaphelenchus xylophilus* sem efeito fitotóxico considerável (FARIA et. al, 2015).

Já Cheng et al. (2017) estudou compostos orgânicos voláteis produzidos pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* contra o fitonematódeo *M. incognita*. Curiosamente, alguns dos compostos identificados produzidos por esta bactéria são encontrados no óleo essencial de *R. graveolens*, como o 2-undecanona, 2-decanona e 2-nonanona. Estes compostos testados individualmente tiveram ação nematicida, além de que 2-undecanona e 2-decanona também apresentaram atividade fumegante (CHENG et al., 2017). Dessa forma, estes compostos presentes no óleo essencial podem estar contribuindo significativamente para a sua atividade contra o nematoide *C. elegans*.

O segundo maior constituinte do óleo de *R. graveolens* foi o sesquiterpeno bicíclico  $\beta$ -cariofileno (1,14%). Entre as propriedades do  $\beta$ -cariofileno estão as atividades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, anti-cancerígenas e anestésicas locais. O  $\beta$ -cariofileno (50  $\mu$ M) já foi identificado como promotor do aumento de vida útil no organismo *C. elegans*, além de ser capaz de reduzir os níveis de radicais livres intracelulares e modular de forma eficaz o comportamento alimentar, o bombeamento faríngeo e o tamanho corporal. Neste mesmo estudo, foi identificada a modulação de genes ligados a estresse oxidativo e a longevidade pelo  $\beta$ -cariofileno (PANT et al., 2014). No entanto, apesar deste composto estar presente em proporções muito menores que o 2-undecanona, é possível que a interação do  $\beta$ -cariofileno com os demais constituintes do óleo essencial de *R. graveolens* possa ser do tipo antagônica, ou seja, este composto pode estar protegendo o nematoide de maiores efeitos causados por outros constituintes do óleo, o que poderia explicar o seu menor desempenho comparado com os demais óleos essenciais em algumas concentrações.

Os maiores constituintes do óleo essencial de *T. vulgaris* foram os monoterpenos p-cimeno (73,6%) e canfeno (13,8%). A molécula p-cimeno já foi identificada como nematicida em *M. incognita* (BAI; LIU; LIU, 2011). De acordo com Andrés et al. (2012), tanto o óleo essencial de *P. crispum* quanto dois de seus constituintes encontrados no presente trabalho como minoritários, timol (2,52%) e carvacrol (0,832%), são capazes de matar as larvas juvenis e suprimir fortemente a eclosão em ovos de *Meloidogyne javanica*. Já, Abdel-rahman et al. (2013), após

análises do efeito nematicida de 34 compostos em *C. elegans*, demonstraram que o carvacrol e o timol apresentaram os maiores efeitos nematicidas (3 µg/mL e 8 µg/ml respectivamente). Além disso, segundo Lei et al. (2010), os compostos carvacrol e timol também tem ação nematicida em *C. elegans* e no parasito de porco *Ascaris suum*, sendo este efeito causado pela interação destes compostos com receptores de tiramina (TyrR e SER-2), o qual pode ativar uma cascata de sinalização nas células do nematoide e causar a sua morte (LEI et al., 2010). Além disso, outro possível efeito do carvacrol é pela interação com receptores nicotínicos de acetilcolina em *Ascaris suum*, importante para contração e locomoção do nematoide (TRAILOVIĆ, 2015).

Os mecanismos envolvidos na atividade nematicida são conhecidos apenas para poucos grupos de plantas. A atividade nematicida e ovicida/ovostática em *C. elegans* relatada neste trabalho provavelmente reflete a contribuição de maneiras distintas dos diferentes constituintes dos óleos essenciais (majoritários e minoritários), de forma que as interações entre eles podem resultar em efeitos em múltiplos locais de ação. Neste sentido, pode ser mais informativo estudar o efeito do óleo essencial do que apenas alguns de seus componentes, pois as interações sinérgicas podem ser mais expressivas (BAKKALI et al., 2008). Também é importante estudar a segurança desses óleos essenciais para o uso em mamíferos, como ensaios de citotoxicidade e toxicidade em animal, e plantas, como os ensaios de fitotoxicidade que avaliam a taxa de germinação e os dados de caracterização morfológica.

Existe uma forte resistência da comunidade científica no que se refere à utilização de óleos essenciais comerciais como objetos de pesquisa. As opiniões contrárias geralmente se devem aos muitos fatores não controlados e, muitas vezes, desconhecidos pelos pesquisadores, os quais podem interferir na qualidade do óleo essencial (época de colheita, fatores climáticos, tipo de solo etc.). No entanto, há empresas especializadas onde os óleos essenciais podem ser prontamente adquiridos com confiabilidade, visto que essas empresas verificam periodicamente a qualidade dos seus produtos.

Por fim, os óleos essenciais de plantas são fontes naturais de compostos terapêuticos para a prevenção de nematoides parasitos para uso agrícola, veterinário e humano. Devido aos frequentes relatos de resistência de nematoides parasitos frente a uma variedade de medicamentos antiparasitários, buscar

alternativas naturais que possam ser implementadas na alimentação ou na potencialização da ação de drogas anti-helmínticas pode ser uma estratégia para combater os mecanismos de resistência dos parasitos (LEI, 2010; SANGSTER, 2018). Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar os mecanismos moleculares relacionados a esses efeitos, sendo que o nematoide *C. elegans* já é um organismo modelo reconhecido para a triagem de agentes nematocidas e estudo dos seus alvos moleculares (BURNS, 2015).

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que os óleos essenciais de *P. crispum*, *R. graveolens* e *T. vulgaris* apresentam atividades anti-nematoides em *C. elegans* e, portanto, são promissores para o tratamento alternativo de helmintíases. O óleo com atividade mais pronunciada contra o nematoide adulto e na inibição da presença de larvas juvenis foi o óleo essencial de *P. crispum*. No entanto, o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou melhor atividade ovicida/ovistática e de diminuição na motilidade do nematoide. A composição química majoritária dos óleos de *P. crispum*, *R. graveolens* e *T. vulgaris* foram de fenilpropanoides, cetonas e monoterpenos respectivamente.

- .

## 8. PERSPECTIVAS

Para melhorar a compreensão dos efeitos dos óleos essenciais de *P. crispum*, *R. graveolens* e *T. vulgaris* será necessária a realização de estudos complementares.

Uma perspectiva para melhor avaliar os efeitos dos óleos essenciais, seria trabalhar com os óleos nanoencapsulados, a fim de se obter um sistema de liberação desses fitoterápicos ao longo do tempo de tratamento e reduzir o efeito da volatilização dos seus componentes, além de melhorar a sua solubilidade. Com isso, poderá ser encontrado um melhor desempenho com uma menor dose.

Para avaliar o efeito do uso combinado dos óleos essenciais pode ser utilizada uma metodologia de modelagem de misturas para o planejamento experimental. Assim, poderá ser avaliado se há a ocorrência de efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos entre os óleos.

Também seria interessante verificar se houve danos causados à cutícula do nematoide *C. elegans* ou dos seus ovos após o tratamento com os óleos essenciais, através de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Além disso, a realização da avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais em células de mamífero seguido de testes toxicológicos *in vivo* seria importante para verificar a segurança e possíveis riscos à saúde desses óleos essenciais.

Por fim, como meio de investigar os mecanismos moleculares associados aos efeitos anti-nematoides dos óleos essenciais em *C. elegans*, seria informativo a realização de uma análise de expressão gênica diferencial, a fim de se obter informações de quais vias e funções biológicas podem estar sendo alteradas e precisam ser investigadas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008. doi: 10.1038 / nbt.1482

ABDEL-RAHMAN, F. H.; ALANIZ, N. M.; SALEH, M. A. Nematicidal activity of terpenoids. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 1, p. 16-22, 2013. doi:10.1080/03601234.2012.716686

ABIDI, A., et al. Chemical analyses and anthelmintic effects of *Artemisia campestris* essential oil. **Veterinary Parasitology**, v. 263, p. 59-65, 2018. doi:10.1016/j.vetpar.2018.10.003

ABONGWA, M.; MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. **Acta Veterinaria-Beograd**, v. 67, n. 2, p. 137-152, 2017. doi: 10.1515/acve-2017-0013

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing, 2007. 804 p.

AL-SAID, M. S. et al. Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 28, n.3, p. 305-312, 1990. doi: doi.org/10.1016/0378-8741(90)90081-4

ALTUN, Z. F.; HALL, D. H. Introduction. *In*: **WormAtlas**, 2009. doi:10.3908/wormatlas.1.1

ANDRÉS, M. F. et al. Nematicidal activity of essential oils: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 371-390, 2012. doi:10.1007/s11101-012-9263-3

ASGARPANA, J.; KHOSHKAM, R. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 23, p. 3942-3949, 2012. doi:10.5897/jmpr12.040

AYRES, M. C. C.; ALMEIDA, M. A. Agentes antinematódeos. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 453-465.

BABU, R. O. et al. Virtual screening and *in vitro* assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of *Meloidogyne incognita*. **Bioinformatics**, v. 8, n. 7, p. 319-325, 2012. doi: 10.6026/97320630008319

BAI, C. Q.; LIU, Z. L.; LIU, Q. Z. Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium Ambrosioides* aerial parts. **E-Journal of Chemistry**, v. 8 n. s1, p. S143-S148, 2011. doi:10.1155/2011/470862

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, 446-475, 2008. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARRIÈRE, A.; FÉLIX, M. A. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2014. doi/10.1895/wormbook.1.115.2,

BECKER, S. L. et al. Toward the 2020 goal of soil-transmitted helminthiasis control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, e0006606, 2018. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006606>

BEN-ZVI, A.; MILLER, E. A.; MORIMOTO, R. I. Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 35, p. 14914-14919, 2009. doi:10.1073/pnas.0902882106

BERENBAUM, M.; NEAL, J. J. Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally cooccurring plant toxicant. **Journal of Chemical Ecology**, v. 11, p. 1349-1358, 1985.



BIFFA, D.; JOBRE, Y.; CHAKKA, H. Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, p. 107-118, 2006. doi: 10.1017/s1466252307001132

BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. **Journal of Essential Oil Research**. v. 7, p. 641-644, 1995. doi: doi.org/10.1080/10412905.1995.9700519

BORSATO, A. V. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] submetida à secagem à 70° C. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 635-644, 2007. doi: dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n4p635

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BRITTON, C.; MURRAY, L. Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 651-659, 2006. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.02.010

BROWN, H. D. et al. Antiparasitic drugs. Iv. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 7, p. 1764-1765, 1961. doi:10.1021/ja01468a052

BURNS, A. R. et al. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. **Nature Communications**, v. 6, n. 7485, 2015. doi: 10.1038/ncomms8485

BURNS, A. R. et al. High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, 1906-1914, 2016. doi:10.1038/nprot.2006.283

CABONI, P. et al. Nematicidal activity of furanocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. **Pest Management Science**, v. 71, n. 8, p. 1099-1105, 2014. doi: 10.1002/ps.3890

CAMPOS, K. E.; BALBI, A. P. C.; ALVES, M. J. Q. F. Diuretic and hipotensive activity of aqueous extract of parsley seeds (*Petroselinum sativum* Hoffm.) in rats. **Revista**

**Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1a, p. 41-45, 2009. doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100010

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas**: Descrição e cultivo. Guaíba: Agropecuária, 1995. 196 p.

CHARLES, D. J. Parsley. *In*: PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of Herbs and Spices**. 2nd ed. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2012, p. 430-451. doi:10.1533/9780857095671.430

CHENG, W. et al. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. doi:10.1038/s41598-017-16631-8

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017. doi: doi.org/10.3390/medicines4030058

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A. Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015. doi: 10.1534/genetics.115.176099.

CSERMELY, P. et al. Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 3, p. 333-408, 2013. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.016

DE ARAÚJO-FILHO, J. V. et al. Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 294-299, 2018. doi:10.1016/j.indcrop.2018.07.059

DIAS, C. R. et al. Efeito de extratos aquoso de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 203-210, 2000.

FARIA, J. M. S. et al. Nematotoxic and phytotoxic activity of *Satureja montana* and *Ruta graveolens* essential oils on *Pinus pinaster* shoot cultures and *P. pinaster* with

*Bursaphelenchus xylophilus* in vitro co-cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 59-65, 2015. doi:10.1016/j.indcrop.2015.08.045

FARZAEI, M. H. et al., F. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. **Journal of traditional Chinese medicine**, v. 33, n. 6, p. 815-826, 2013. doi: doi.org/10.1016/S0254-6272(14)60018-2

FÁVERO, F. C. et al. Experimental infection of calves with *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus*: Assessment of parasitological parameters. **Veterinary Parasitology**, v. 217, p. 25-28, 2016. doi: doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.017

FERREIRA, L. E. et al. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 70-76, 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.08.011

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá - PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 757-768, 2015. doi: dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14\_064

GEERTS, S.; GRYSEELS, B: Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 207-222, 2000. doi: 10.1128/cmr.13.2.207-222.2000

GILLEARD, J.S.; BEECH, R.N. Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 134, n. 9, p. 1133-1147, 2007. doi: 10.1017/S0031182007000066

GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)** (Documento). Palatina: Embrapa Cerrados, jul. 2008, p. 30. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/571924>>. Acesso em: 10 Abr. 2019.

HARTMAN, P. S., HERMAN, R. K. Radiation-Sensitive Mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 102, n. 2, p. 159-178, 1982.

HEREDIA, Z. N. A. et al. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, n. 3, p. 574-577, 2003. doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-05362003000300032

HOBERT, O. The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*, **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2013. doi: 10.1895/wormbook.1.161.1

HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R. J. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, p. 1-29, 2014. doi: 10.1895/wormbook.1.143.2

HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R.J. Anthelmintic drugs, **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2007. doi: 10.1895/wormbook.1.143.1

HOSSEINZADEH, S. et al. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, p. 635-642, 2015. doi: dx.doi.org/10.4236/ijcm.2015.69084

HOTEZ, P. J. et al. Eliminating the neglected tropical diseases: Translational science and new technologies. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 3, e0003895, 2016. doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0003895

HOTEZ, P. J. et al. The human hookworm vaccine. **Vaccine**, v. 31, n. 2: p. B227-232, 2013. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.034

HOTEZ, P.J. et al. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007. doi: 10.1056/NEJMra064142

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2016. doi: 10.1002/jat.3357

INTIRACH, J. et al. Biochemical effects of *Petroselinum crispum* (Umbellifereae) essential oil on the pyrethroid resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Insects**, v. 10, n. 1, 2019. doi: 10.3390/insects10010001

IVANOVA, A. et al. Volatile components of some Rutaceae species. **Zeitschrift für Naturforschung C.**, v. 59, n. 3-4, p. 169-173, 2004. doi: doi.org/10.1515/znc-2004-3-405

JOHNSON, T. E.; NELSON, G. A. *Caenorhabditis elegans*: A model system for space biology studies. **Experimental Gerontology**, v. 26, n. 2-3, p. 299-309, 1991. doi: 10.1016/0531-5565(91)90024-g

JOURDAN, P. M. et al. Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 252-265, 2018. doi: 10.1016/s0140-6736(17)31930-x

KAMINSKY, R. et al. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, n. 452, v. 176-180, 2008. doi: 10.1038/nature06722

KARPOUHTSIS, I. et al. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1111-1115, 1998. doi: 10.1021/jf970822o

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 336-345, 2001. doi: doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00131-X

KUMARASINGHA, R. et al. Enhancing a search for traditional medicinal plants with anthelmintic action by using wild type and stress reporter *Caenorhabditis elegans* strains as screening tools. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 291-298, 2014. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.01.008

LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. **Parasitology Today**, v. 6, n. 4, p. 112-115, 1990. doi: 10.1016/0169-4758(90)90227-u

LEI, J.; LESER, M.; ENAN, E. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 7, p. 1062-1071, 2010. doi: 10.1016/j.bcp.2009.11.002

LETTRE, G.; HENGARTNER, M. O. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 97-108, 2006. doi: 10.1038/nrm1836

LICHTENSTEIN, E. P. et al. Insecticidal and synergistic components isolated from dill plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 658-664, 1974. doi: 10.1021/jf60194a037

LICHTENSTEIN, E. P.; CASIDA, J. E. Myristicin, an insecticide and synergist occurring naturally in the edible parts of parsnips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, p. 410-415, 1963. doi: 10.1021/jf60129a017

LO, N. C. et al. A call to strengthen the global strategy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: the time is now. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, e64-e69, 2017. doi: doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30535-7

LÓPEZ, V. et al. Antihelmintic effects of nutmeg (*Myristica fragans*) on *Anisakis simplex* L3 larvae obtained from *Micromesistius potassou*. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 148-52, 2015. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.03.033

MACKENZIE, C. D.; GEARY, T. G. Addressing the current challenges to finding new anthelmintic drugs. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 6, p. 539-541, 2013. doi: 10.1586/eri.13.49

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G. C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 761-766, 2003. doi: doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01920.x

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **Veterinary Journal**, v.154, n.1, p.11-34, jul. 1997. doi: doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80005-X

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, p. 289-292, 2002. doi: doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00026-9

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. **Albendazole**, CID=2082. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Albendazole>. Acesso em: 02 Jun. 2019a.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. **Levamisole**, CID=26879. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26879>. Acesso em: 19 Abr. 2019b.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. **Ivermectin**, CID=6321424. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ivermectin>. Acesso em: 02 Jun. 2019c.

OKA, Y. et al. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 710-715, 2000. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.7.710

OKA, Y. Nematicidal activity of essential oil components against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematology**, v. 3, n. 2, p. 159-164, 2001. doi: 10.1163/156854101750236286

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Diretrizes: Quimioterapia preventiva para o controle de infecções por helmintos transmitidos pelo contato com o solo em grupos de risco. Washington, D. C., 2018. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49072>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

PANT, A. et al. Beta-caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 57, p. 81-95, 2014. doi: 10.1016/j.exger.2014.05.007

PETIT-PALY, G.; RAMAWAT, K. G.; CHENIEUX, J. C.; RIDEAU, M. *Ruta graveolens*: *in vitro* production of alkaloids and medicinal compounds. In: BAJAJ, Y. P. S. (eds) **Medicinal and Aromatic Plants II**. Biotechnology in Agriculture and Forestry, v. 7. Springer, Berlin, Heidelberg, 1989, p. 488-505. doi: 10.1007/978-3-642-73617-9\_27

QUADRI et al. Resistance to Anthelmintic Medications in Animals: A Review. **Annals of Pharma Research**, v. 3, n. 9, 144-147, 2015.

RAIZEN, D. M. et al. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. **Nature**, v. 451, n. 7178, p. 569-572, 2008. doi: 10.1038/nature06535.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**, 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007

REIS, A. C. S. M. et al. O cenário de políticas públicas do Brasil diante do quadro das doenças negligenciadas. **Saúde & Ação**, v. 3, n. 1, 2016.

SALINAS, G., RISI, G. *Caenorhabditis elegans*: Nature and nurture gift to nematode parasitologists. **Parasitology**, v. 145, p. 979-987. 2018. doi: 10.1017/S0031182017002165

SANGSTER, N. C., COWLING, A., WOODGATE, R. G. Ten events that defined anthelmintic resistance research. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 7, p. 553-563, 2018. doi: 10.1016/j.pt.2018.05.001

SANGSTER, N. C. Anthelmintic resistance: past, present and future. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 115-124, 1999. doi: doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00188-X

SARTOR, I. F.; BICUDO, P. L. Agentes empregados no controle de ectoparasitas. *In*: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 480-492.

SCHIERENBERG, E.; WOOD, W. B. Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 107, n. 2, p. 337-354, 1985. doi: doi.org/10.1016/0012-1606(85)90316-1

SCHOLTE, R. G. Spatial analysis and risk mapping of soil-transmitted helminth infections in Brazil, using Bayesian geostatistical models. **Geospat Health**, v. 8, n. 1, p. 97-110, 2013. doi: 10.4081/gh.2013.58

SHALABY, H. A. Anthelmintics resistance; how to overcome it? **Iranian journal of parasitology**, v. 8, n. 1, p. 18, 2013.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**; v. 16, p. 38-43, 2000.

SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p. 1102.

SIMPKIN, K. G.; COLES, G. C. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 66-69, 2007. doi: 10.1002/jctb.503310110



SOLIS, G. M.; PETRASCHECK, M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates. **Journal of Visualized Experiments**, v. 49, e2496, 2011. doi: 10.3791/2496.

SOUSA, R. M. O. F. et al. Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 226-237, 2015. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.09.052

SOUTELLO, R. V. G.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 360-304, 2007. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.023

STAHL-BISKUP, E.; VENSKUTONIS, R. P. Thyme. In: PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of Herbs and Spices**. 2nd ed. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2012, p. 499-525. doi:10.1533/9780857095671.499

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006. doi: 10.1895/wormbook.1.101.1

TRAILOVIĆ, S. M. et al. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 3059-3068, 2015. doi: 10.1007/s00436-015-4508-x

TZELOS, T.; MATTHEWS, J. Anthelmintic resistance in equine helminths and mitigating its effects. **In Practice**, v. 38, n. 10, p. 489-499, 2016. doi: 10.1136/inp.i5287

VAN-DEN-BROM, R. et al. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 3-4, p. 278-280, 2015. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.02.026

VÁRADYOVÁ, Z., et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 2018. doi: 10.1186/s12917-018-1405-4

VENKATESAN, P. Albendazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 2, p. 145-147, 1998. doi: doi.org/10.1093/jac/41.2.145

VENTURINI, C. D. et al. Interações entre antiparasitários e alimentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 17-23, 2014.

VERCRUYSSSE, J. et al. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 1, n. 1, p. 14-27, 2011. doi: 10.1016/j.ijpddr.2011.09.002

WATSON, J. D. et al. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WEVER, C. M.; FARRINGTON, D.; DENT, J. A. The validation of nematode-specific acetylcholine-gated chloride channels as potential anthelmintic drug targets. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0138804

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Summary of global update on preventive chemotherapy implementation in 2015. **The Weekly Epidemiological Record**, n. 39, p. 441-460, 2016. Disponível em: <[https://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/resources/who\\_wer9139\\_pct/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/resources/who_wer9139_pct/en/)>. Acesso em: 19 Abr. 2019.

ZARKOWER, D. Somatic sex determination. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006. doi: 10.1895/wormbook.1.84.1

ZHAN, B. et al. Advancing a multivalent 'Pan-anthelmintic' vaccine against soil-transmitted nematode infections. **Expert Review Vaccines**, v. 13, p. 321-331, 2014. doi: 10.1586/14760584.2014.872035

ZHONG, W.; STERNBERG, P. W. Genome-Wide Prediction of *C. elegans* Genetic Interactions. **Science**, v. 311, n. 5766, p. 1481-1484, 2006. doi: 10.1126/science.1123287