

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Triagem de Fitoinsumos com Potencial Anti-helmíntico Utilizando o
Modelo de Organismo *Caenorhabditis elegans***

Paloma Mathias do Nascimento

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TRIAGEM DE FITOINSUMOS COM POTENCIAL ANTI-
HELMÍNTICO UTILIZANDO O MODELO DE ORGANISMO
*Caenorhabditis elegans***

PALOMA MATHIAS DO NASCIMENTO

Sob a Orientação do Professor
Dr. Fábio Barbour Scott

e Co-orientação
Dr^a. Viviane de Souza Magalhães

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N244t Nascimento, Paloma Mathias do, 1996-
Triagem de fitoinsumos com potencial anti
helmântico utilizando o modelo de organismo
Caenorhabditis elegans / Paloma Mathias do
Nascimento. - Seropédica, 2022.
73 f.

Orientador: Fábio Barbour Scott.
Coorientadora: Viviani de Souza Magalhães.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias, 2022.

1. Óleos essenciais. 2. Antiparasitários. 3.
Seleção. I. Scott, Fábio Barbour, 1966-, orient. II.
Magalhães, Viviani de Souza, 1982-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 530 / 2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.013192/2022-61

Seropédica-RJ, 02 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
PALOMA MATHIAS DO NASCIMENTO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/03/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 04/03/2022 20:34)
FABIO BARBOUR SCOTT
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)
Matrícula: 1173660

(Assinado digitalmente em 04/03/2022 17:25)
GUILHERME MARCONDES KLAFKE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 280.235.508-29

(Assinado digitalmente em 06/03/2022 12:32)
CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 058.965.206-03

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 530, ano:
2022, tipo: ATA, data de emissão: 02/03/2022 e o código de verificação: 910a3c78ca

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gregório e Ione, que batalharam muito para me oferecer uma educação de qualidade.

Aos meus familiares e amigos queridos que por muitas vezes acreditaram em mim mais que eu.

Ao meu namorado, Gabriel, pelo apoio e carinho.

Aos mestres do curso de Mestrado que durante esses dois anos compartilharam seus conhecimentos comigo, meu muito obrigada.

Ao meu orientador, Dr. Fábio Barbour Scott, obrigada pela oportunidade.

Não posso deixar de agradecer em especial a minha co-orientadora, Dra. Viviane de Souza Magalhães, que não mediu esforços para me auxiliar desde a graduação e principalmente no período da pandemia. Você não faz ideia do quanto foi e está sendo essencial para a minha vida acadêmica e pessoal. Gratidão!!

Outro agradecimento especial à Dr^a. Yara Cid e Dr^a. Thais Paes, muito obrigada por todas as caronas até a faculdade. Vocês foram imprescindíveis nesse percurso!

Às amigas do setor da Farmacometria, sou grata por todos os momentos de descontração e apoio.

Sou grata ao pessoal do LQEPV pelo suporte durante a pesquisa

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo apoio financeiro recebido para a realização deste trabalho.

Aos viveram muitos séculos antes de mim, sou grata por toda a sabedoria, força e determinação dos meus ancestrais.

Por fim, manifesto aqui a minha gratidão à Deus, por realizar o sonho de concluir mais uma etapa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

BIOGRAFIA

Paloma Mathias do Nascimento, filha de Gregório do Nascimento e Ione Mathias da Cruz, nascida em 8 de abril de 1996, no município do Rio de Janeiro - RJ. Mulher, negra e periférica, estudou majoritariamente em escolas particulares com bolsa de estudo na Zona Oeste de seu estado. No ano de 2014 foi selecionada no curso de Farmácia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo a primeira de sua família a ingressar no Ensino Superior público. Foi aluna de Iniciação Científica Voluntária, onde pode atuar na pesquisa por alternativas sustentáveis aos anti-helmínticos de uso na Medicina Veterinária, no ano de 2018 até a conclusão do curso em 2019. Neste mesmo período também participou de eventos acadêmicos e recebeu prêmio de Menção Honrosa na VII Reunião Anual Científica da UFRRJ. Em 2020 foi aprovada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em nível Mestrado, na mesma instituição, sob orientação do Professor Fábio Barbour Scott e Co-orientação de Viviane de Souza Magalhães, sendo bolsista CAPES entre março de 2020 a fevereiro de 2022.

“Se hoje estou aqui,
só devo a Dandara,
só devo a Zumbi.”

(Marcha Zumbi +10 em 16 de novembro de 2005)

RESUMO

Nascimento, Paloma Mathias. **Triagem de Fitoinsumos com Potencial Anti-helmíntico Utilizando o Modelo de Organismo *Caenorhabditis elegans***. 2022. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A produtividade da pecuária pode ser significativamente diminuída pelos efeitos do parasitismo gastrointestinal. Assim como, pode impactar cães e gatos e, conseqüentemente, seres humanos devido ao potencial zoonótico. A necessidade de alimentos sem resíduos de pesticidas, melhores condições de trabalho e aumento de casos de resistência anti-helmíntica abre um caminho para alternativas sustentáveis no controle de helmintíases, como os óleos essenciais. Neste contexto, *Caenorhabditis elegans* é utilizado para pesquisar fitoinsumos com atividade anti-helmíntica em diversos estágios de desenvolvimento através da avaliação toxicológica em diferentes cepas de *C. elegans*. Neste contexto, objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos dos diferentes fitoinsumos no desenvolvimento do ciclo de vida de *C. elegans*; determinar as CL₅₀ ou CI₅₀ e CL₉₀ ou CI₉₀ dos fitoinsumos com atividade anti-helmíntica; determinar o fator de resistência utilizando diferentes cepas resistentes às principais classes de antiparasitários de *C. elegans*; e propor uma linha analítica de testes capaz de triar fitoinsumos com possível atividade anti-helmíntica. Foram utilizados os seguintes óleos essenciais (OEs): *Cymbopogon flexuosus*, *Eugenia caryophyllus*, *Illicium verum*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Pelargonium graveolens* e *Thymus vulgaris*. Estes foram solubilizados em DMSO. Foram realizados testes *in vitro* de letalidade em adultos de cepa selvagem (N2) e cepas resistentes à ivermectina, albendazol e levamisol, eclodibilidade de ovos e postura de ovos. O OE de *I. verum* resultou em melhor atividade nematicida em adultos N2. Já o OE de *P. graveolens* exibiu melhor inibição de eclodibilidade de ovos. Quanto à inibição da ovoposição, os OEs de *C. flexuosus*, *E. caryophyllus*, *I. verum* e *T. vulgaris* apresentaram taxa semelhante, enquanto o OE de *P. graveolens* não resultou atividade. Os indivíduos adultos de *C. elegans* resistentes à ivermectina (DA1316) mostraram-se susceptíveis aos OEs de *I. verum* e *T. vulgaris*, entretanto demonstraram resistência cruzada ao OE de *P. graveolens*. Os indivíduos adultos de *C. elegans* resistentes ao albendazol (CB3474) mostraram-se susceptíveis aos OEs de *P. graveolens* e *T. vulgaris*, entretanto demonstraram resistência cruzada ao OE de *I. verum*. Já os indivíduos adultos de *C. elegans* resistentes levamisol (CB211) demonstraram resistência cruzada a todos os OEs testados.

Palavras-chave: Óleos essenciais; Antiparasitários; Seleção.

ABSTRACT

Nascimento, Paloma Mathias. **Screening of Active Phytopharmaceutical Ingredient with Anthelmintic Potential Using *Caenorhabditis elegans* Model**. 2022. 72p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The profitability of livestock activities can be significantly diminished by the effects of gastrointestinal parasitism. As well, it can also impact serious conditions in dogs and cats and, with a number of them also affecting the human population, due to their zoonotic potential. The demand for food without pesticide residues, safer working conditions and the increase cases of anthelmintic resistance opens a new pathway for sustainable alternatives in the control of helminthiases, such as essential oils. In this context, *Caenorhabditis elegans* is used to research phytoinputs with anthelmintic activity at different stages of development through toxicological evaluation in different strains of *C. elegans*. The aim of this study was to investigate the effects of different essential oils (EO) on the development of the life cycle of *C. elegans*; determine the LC₅₀ or IC₅₀ and LC₉₀ or IC₉₀ of essential oils with anthelmintic activity; determine the resistance factor using different strains resistant to the main classes of *C. elegans* antiparasitics; and to propose an analytical line of tests capable of screening essential oils with possible anthelmintic activity. The following EOs were used: *Cymbopogon flexuosus*, *Eugenia caryophyllus*, *Illicium verum*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Pelargonium graveolens* and *Thymus vulgaris*. All EOs were solubilized in DMSO. *In vitro* lethality tests were performed on adults of wild strain (N2) and strains resistant to ivermectin, albendazole and levamisole, egg hatchability and egg laying. *I. verum* EO showed better nematocidal activity in N2 adults. For oviposition inhibition, the *C. flexuosus*, *E. caryophyllus*, *I. verum* and *T. vulgaris* EOs showed a similar rate, while the *P. graveolens* EO did not result in activity. On the other hand, *P. graveolens* EO exhibited better inhibition of egg hatching. Adults ivermectin-resistant strain of *C. elegans* (DA1316) were shown to be susceptible to *I. verum* and *T. vulgaris* EOs, however they demonstrated cross-resistance to *P. graveolens* EO. Adults albendazole-resistant strain of *C. elegans* (CB3474) were shown to be susceptible to *P. graveolens* and *T. vulgaris* EOs, however they showed cross-resistance to *I. verum* EO. Adults levamisole-resistant strain of *C. elegans* (CB211) demonstrated cross-resistance to all tested EOs.

Keywords: Essential oils; Antiparasitics; Selection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> a 20 °C.	11
Figura 2. Desenho esquemático de manutenção de cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> com cultura líquida de <i>Escherichia coli</i> OP50.	13
Figura 3. Desenho esquemático do desenvolvimento de <i>Caenorhabditis elegans</i> após sincronização.	14
Figura 4. Desenho esquemático do teste <i>in vitro</i> de letalidade de indivíduos adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	16
Figura 5. Desenho esquemático do teste <i>in vitro</i> de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	17
Figura 6. Desenho esquemático do teste <i>in vitro</i> de postura de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	17
Figura 7. Árvore de decisão do estudo.	18
Figura 8. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem no tempo 48h dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Eugenia caryophyllus</i> , <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> .	22
Figura 9. Comparação de CL ₅₀ em Log ₁₀ dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem após 48h de incubação.	22
Figura 10. Curva de concentração - probabilidade de não-eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem no tempo 24h dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Eugenia caryophyllus</i> , <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> .	25
Figura 11. Comparação de CI ₅₀ em Log ₁₀ dos diferentes óleos essenciais frente a ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem após 24h de incubação.	26
Figura 12. Comparação dos diferentes óleos essenciais frente a postura de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem após 96h de incubação.	27
Figura 13. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente à ivermectina no tempo 48h dos óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> e <i>Thymus vulgaris</i> .	29
Figura 14. Comparação de CL ₅₀ em Log ₁₀ dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente à ivermectina após 48h de incubação.	30
Figura 15. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao albendazol no tempo 48h dos óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> .	32
Figura 16. Comparação de CL ₅₀ em Log ₁₀ dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao albendazol após 48h de incubação.	32
Figura 17. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao levamisol no tempo 48h dos óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> .	34

Figura 18. Comparação de CL_{50} em Log_{10} dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao levamisol após 48h de incubação. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais utilizados.	15
Tabela 2. Mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem tratados com diferentes óleos essenciais nas concentrações 10, 100 e 1000 µg.mL ⁻¹ após 48h.	19
Tabela 3. Mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem tratados com os óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Eugenia caryophyllus</i> e <i>Illicium verum</i> e <i>Pelargonium graveolens</i> em diferentes concentrações após 48h.	20
Tabela 4. Mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem tratados com o óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> em diferentes concentrações após 48h.	21
Tabela 5. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem após 48h de incubação.	21
Tabela 6. Eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem tratados com os óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Eugenia caryophyllus</i> e <i>Illicium verum</i> em diferentes concentrações após 24h.	23
Tabela 7. Eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem tratados com os óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> em diferentes concentrações após 24h.	24
Tabela 8. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem após 24h de incubação.	24
Tabela 9. Análise do teste <i>in vitro</i> de postura de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa selvagem tratados com óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Eugenia caryophyllus</i> , <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> após 96h.	26
Tabela 10. Mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente à ivermectina tratados com os óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> em diferentes concentrações após 48h.	28
Tabela 11. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente à ivermectina após 48h de incubação.	29
Tabela 12. Mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao albendazol tratados com o óleo essencial de <i>Illicium verum</i> em diferentes concentrações após 48h.	30
Tabela 13. Mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao albendazol tratados com os óleos essenciais de <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> em diferentes concentrações após 48h.	31
Tabela 14. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao albendazol após 48h de incubação.	31
Tabela 15. Mortalidade de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao levamisol tratados com os óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> e <i>Thymus vulgaris</i> em diferentes concentrações após 48h.	33

Tabela 16. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistente ao levamisol após 48h de incubação.	34
Tabela 17. Comparação do fator de resistência e status de susceptibilidade dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> de cepa resistentes e selvagem após 48h de incubação	35
Tabela 18. Linha analítica de triagem de óleos essenciais utilizando o <i>Caenorhabditis elegans</i> .	36

LISTA DE ABREVIACOES

A.C	antes de Cristo
ABIEC	Associao Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
ANOVA	análise de variância
CB211	cepa resistente ao levamisol de <i>Caenorhabditis elegans</i>
CB3474	cepa resistente ao albendazol de <i>Caenorhabditis elegans</i>
CEPEA/USP	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CI ₅₀	concentrao inibitória 50%
CI ₉₀	Concentrao inibitória 90%
CL ₅₀	concentrao letal capaz de matar 50 % dos indivíduos
CL ₉₀	concentrao letal capaz de matar 90 % dos indivíduos
CNA	Confederao da Agricultura e Pecuária do Brasil
D1	primeiro dia de bioensaio
D2	segundo dia de bioensaio
D3	Terceiro dia de bioensaio
DA1316	cepa resistente à ivermectina de <i>Caenorhabditis elegans</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DPA	Departamento de Parasitologia Animal
EC ₅₀	potência do fármaco ou a concentrao em que o fármaco produz 50% de seu efeito máximo
GABA	cido gama-aminobutírico
GluCl	canal de cloreto controlado por glutamato
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC95	intervalo de confiança de 95%
L1	larva de primeiro estdio
L2	Larva de segundo estdio
L3	larva de terceiro estdio
L4	larva de quarto estdio
LB	meio Luria Bertani
LQEPV	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
N2	cepa selvagem de <i>Caenorhabditis elegans</i>
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
OE	leo essencial
pH	potencial hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
R ²	coeficiente de correlao linear
Sars-CoV-2	vírus da família dos coronavírus que, ao infectar humanos, causa uma doença chamada Covid-19
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal
TEC	tonelada equivalente carcaça
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
X ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Panorama da Agropecuária Brasileira	2
2.2 Panorama do Mercado Pet Brasileiro	2
2.3 Importância do Combate de Endoparasitos	3
2.4 Controle Químico de Helmintos Gastrointestinais	4
2.5 Resistência Anti-helmíntica	6
2.6 Alternativas ao Controle Químico	6
2.7 Óleos Essenciais	7
2.7.1 Óleo Essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	8
2.7.2 Óleo Essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i>	8
2.7.3 Óleo Essencial de <i>Illicium verum</i>	9
2.7.4 Óleo Essencial de <i>Mentha piperita</i>	9
2.7.5 Óleo Essencial de <i>Mentha spicata</i>	9
2.7.6 Óleo Essencial de <i>Pelargonium graveolens</i>	9
2.7.7 Óleo Essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	9
2.8 <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
2.8.1 Morfologia	10
2.8.2 Uso na Pesquisa de Novos Anti-helmínticos	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local do Experimento	13
3.2 Aquisição de Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> e <i>Escherichia coli</i>	13
3.3 Manutenção de Cepas	13
3.4 Meios de Cultura	14
3.5 Sincronização de <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
3.6 Óleos Essenciais	15
3.7 Reagentes Químicos	15
3.8 Testes <i>in vitro</i>	15
3.8.1 Letalidade em Indivíduos Adultos	15
3.8.2 Eclodibilidade de Ovos	16
3.8.3 Postura de Ovos	17
3.9 Análise Estatística	17
4 RESULTADOS	19
4.1 Teste <i>in vitro</i> de Letalidade em Adultos de Cepa Selvagem	19
4.2 Teste <i>in vitro</i> de Eclodibilidade de Ovos de Cepa Selvagem	23
4.3 Teste de Postura de Ovos de Cepa Selvagem	26
4.4 Teste <i>in vitro</i> de Letalidade de Adultos de Cepas Resistentes	27
4.4.1 Cepa Resistente à Ivermectina	27
4.4.2 Cepa Resistente ao Albendazol	30
4.4.3 Cepa Resistente ao Levamisol	33
4.5 Comparação da Letalidade em Adultos dos Óleos Essenciais de Diferentes Cepas	35

4.6 Linha Analítica de Triagem	35
5 DISCUSSÃO	37
5.1 Atividade em Adultos e Ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
5.1.1 Atividade do Óleo Essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	37
5.1.2 Atividade do Óleo Essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i>	37
5.1.3 Atividade do Óleo Essencial de <i>Illicium verum</i>	38
5.1.4 Atividade do Óleo Essencial de <i>Mentha piperita</i>	38
5.1.5 Atividade do Óleo Essencial de <i>Mentha spicata</i>	40
5.1.6 Atividade do Óleo Essencial de <i>Pelargonium graveolens</i>	40
5.1.7 Atividade do Óleo Essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	41
5.2 Atividade em Adultos de Cepas Resistentes	43
5.2 Modelo de Árvore de Decisão	44
6 CONCLUSÃO	45
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

A agropecuária tem grande responsabilidade no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, entretanto a rentabilidade dessa atividade pode ser consideravelmente diminuída pelos efeitos das helmintíases que afetam os animais. Os animais de estimação, como cães e gatos, também são afetados pelo parasitismo e devido a sua proximidade com humanos, são transmissores de zoonoses, causando problemas à saúde pública.

De um modo geral, o controle de helmintos é feito com o uso de anti-helmínticos das classes de benzimidazóis, imidazóis, lactonas macrocíclicas, entre outros. O uso contínuo, em alguns casos irracional, destes fármacos associado com a falta de inovação da indústria farmacêutica e a evolução desses indivíduos culminou na resistência aos anti-helmínticos.

Diante dessa situação, novas informações são essenciais para maximizar o controle e retardar o desenvolvimento da resistência aos anti-helmínticos. Portanto, torna-se necessário investir em pesquisas que visem a busca de alternativas de controle de parasitoses que sejam de baixo custo e pouco nocivas tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana.

Muitas plantas são tradicionalmente conhecidas como possuidoras de atividade anti-helmíntica. Neste trabalho, o uso de óleos essenciais é avaliado como alternativa para o controle de helmintoses. A espécie *Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre e foi utilizado como modelo experimental para a busca de novas moléculas com capacidade anti-helmínticas na saúde animal.

Neste contexto, objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos dos diferentes fitoinsumos no desenvolvimento do ciclo de vida de *C. elegans*; determinar as CL_{50} ou CI_{50} e CL_{90} ou CI_{90} dos fitoinsumos com atividade anti-helmíntica; determinar o fator de resistência utilizando diferentes cepas resistentes às principais classes de antiparasitários de *C. elegans*; e propor uma linha analítica de testes capaz de triar fitoinsumos com possível atividade anti-helmíntica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da Agropecuária Brasileira

A história da agricultura e agropecuária no Brasil se confunde com a própria formação econômica do país, dois tópicos indissociáveis entre si. A partir da chegada dos portugueses, o país passou por uma série de ciclos econômicos voltados à agricultura de subsistência (cana-de-açúcar, tabaco, milho, mandioca, entre outros). Esse processo levou ao desenvolvimento da pecuária brasileira no interior do país, um setor também importante como fornecedor de alimentos (MIRANDA, 2020).

Mesmo em um período marcado por uma crise mundial causada pela pandemia do Coronavírus (Sars-CoV-2), o ano de 2020 foi particularmente importante para o setor agropecuário brasileiro. Enquanto o crescimento do PIB total do Brasil foi negativo, - 4,1% - o pior desempenho desde 1990 quando a queda foi de 4,35%, o PIB da agropecuária apresentou crescimento de 24,2% em relação a 2019, alcançando a participação de 26,6% do PIB total, de acordo com os dados divulgados pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/USP), em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) (CEPEA, 2021).

Parte deste resultado se devem aos investimentos por dos produtores rurais em pacotes tecnológicos arrojados na safra 2019/2020, clima favorável e a inclusão da atividade agropecuária como atividade essencial no início da pandemia garantindo a produção, seu processamento, sua venda e garantindo a segurança alimentar tanto no mercado interno, como no internacional. (CNA, 2021).

Em números, a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), contabilizou que o rebanho brasileiro possui 187,55 milhões de cabeças, a pecuária brasileira registrou em 2020 um abate de 41,5 milhões de cabeças. Nesse mesmo período o Brasil registrou 2,69 milhões TEC (tonelada equivalente carcaça) de carne bovina. Deste total de carne produzida, 73,93% tiveram como destino o mercado interno, enquanto 26,07% foram destinadas às exportações (ABIEC, 2021).

Desta forma, a agropecuária seguiu sua trajetória de alta e, assim, contribuiu para que a queda no PIB total fosse menos acentuada do que poderia ter sido caso o setor não alcançasse tal resultado positivo, evidenciando a força do setor na economia brasileira (IBGE, 2021).

2.2 Panorama do Mercado Pet Brasileiro

A história dos pets tem início quando o homem começa a domesticar alguns animais. Ao que tudo indica, os primeiros a criar uma relação de simbiose com os humanos foram os cães. No início desta relação entre homens e animais, a palavra “estimação” talvez não fosse a mais apropriada. Os cães - assim como, posteriormente, os gatos, as hienas e até os falcões - “trabalhavam” para seus mestres ajudando-os nas perseguições a ratos, lebres, cervos e perdizes ou protegendo e pastoreando rebanhos de ovelhas e cabras. Sendo assim, a relação com esses bichos era estritamente “profissional” (INSTITUTO PET BRASIL, 2020).

Atualmente, as estimativas apontam que a população Pet no Brasil é de 144,3 milhões. Dentre estes, cerca de 38,7% correspondem a população de cães e 17,7% à população de gatos, sendo a primeira e terceira maiores populações de animais Pet, respectivamente, no ano de 2020 (ABINPET, 2020). Em uma pesquisa realizada com proprietários de animais domésticos, durante a pandemia do Coronavírus 31% dos correspondentes adquiriu ao menos um cão e 50% dos correspondentes adquiriu um gato. (SINDAN, 2021a)

No Brasil, o segmento industrial pet apresenta sólido crescimento com faturamento de produtos para animais de estimação alcançando os R\$ 27,2 bilhões em 2020. Esses valores englobam a movimentação das indústrias e das empresas que fazem parte da cadeia de distribuição dos segmentos de alimentos (Pet Food), medicamentos veterinários (Pet Vet) e cuidados com saúde e higiene do pet (Pet Care). Neste mesmo ano, em comparação com o ano de 2019, houve um crescimento de 18%, 9,5% e 24% para Pet Vet, Pet Care e Pet Food, respectivamente. Em relação ao faturamento do mercado mundial, o país ocupa a 7ª posição, representando 3,9% dos US\$ 145,8 bilhões envolvidos (ABINPET, 2020; INSTITUTO PET BRASIL, 2020).

O motivo para este crescimento pode ser explicado por diversos fatores, seja pela aceleração do crescimento da população Pet no Brasil, que já acontecia mesmo antes da pandemia, como também pelo fato das pessoas estarem passando mais tempo em casa. O isolamento social trouxe mudanças para a rotina das pessoas e favoreceu o desejo de terem um animal de estimação como companhia. Uma coisa é certa: o fenômeno pet veio para ficar. A relação homem-animal traz benefícios para ambos, e estima-se que a população de gatos e cães no Brasil cresça cada vez mais com o passar dos anos (BÚSSOLA, 2021).

2.3 Importância do Combate de Endoparasitos

Diversas são as doenças que afetam a produção e reduzem o rendimento e lucratividade dos produtores. Boa parte dessas doenças, principalmente as provocadas por vírus e bactérias, podem ser evitadas ou controladas pelo uso de vacinas e outras medidas preventivas. No caso dos parasitos, é difícil a imunização do rebanho e estes acabam sendo o problema sanitário de maior importância para a produção de gado de corte em todo o mundo, em especial nos trópicos (CANÇADO et al., 2012).

Dentro do grupo de helmintos gastrointestinais prevalentes na criação de bovinos, caprinos e ovinos pode-se observar os gêneros: *Cooperia*; *Haemonchus*; *Oesophagostomum*; *Ostertagia*; e *Trichostrongylus* parasitando trato gastrointestinal destes ruminantes (VIVEIROS, 2009). A variabilidade entre os impactos da produção pode ser atribuída a diferentes níveis de infecção, estágio de desenvolvimento do parasito, histórico genético do hospedeiro, manejo da alimentação e outros fatores ainda desconhecidos (VERCRUYSSSE; CLAEREBOUT, 2001). É essencial conhecer todos esses fatores para criar estratégias de controle que funcionem bem, evitando que os parasitos adquiram resistência (FORTES, 2004).

Os prejuízos do parasitismo gastrointestinal podem ser observados em danos à mucosa do abomaso e intestinos e perda de peso causado pelo hematofagismo, competição com o hospedeiro por minerais e outros nutrientes e diminuição do apetite (ABIDU-FIGUEIREDO et al., 2005). Já os impactos são observados no consumo de ração, taxa de crescimento, peso da carcaça, composição da carcaça, crescimento da lã, fertilidade e produção de leite. Há ainda impactos na saúde alimentar. A segurança dos alimentos é ameaçada por patógenos existentes e emergentes, incluindo os patógenos transmitidos por alimentos e infecções zoonóticas, patógenos virais ou bacterianos, que contribuem para o risco a população humana (FITZPATRICK, 2013). Existe uma dificuldade de quantificar o impacto na pecuária brasileira recentemente devido aos poucos estudos experimentais na área, entretanto Grisi et al. (2014) estimaram que os danos levam a uma perda anual de US\$ 7,11 bilhões.

No segmento Pet, a preocupação com zoonoses supera a importância econômica. As zoonoses parasitárias, doenças transmissíveis do animal para o homem e vice-versa, constituem algumas das infecções mais importantes e comuns que ameaçam as populações humanas (BANETH et al., 2015). O convívio desses animais com humanos é indiscutivelmente benéfico, porém cães e gatos podem abrigar muitos endoparasitos

potencialmente transmissíveis ao homem, o que pode representar um risco à saúde, principalmente de crianças, idosos e imunocomprometidos (IRWIN, 2002).

O impacto de algumas dessas doenças é desproporcionalmente mais alto em países em desenvolvimento como o Brasil, porque as condições de vida das populações geralmente favorecem a exposição a certos parasitos, cuja transmissão pode estar associada a más condições sanitárias e de habitação, bem como com iniquidades no acesso à educação e serviços de atenção primária à saúde. Os gêneros *Toxocora*, *Ancylostoma* e *Strongyloides*, *Trichuris* são parasitos comuns de cães e gatos que podem afetar seres humanos em diferentes países do mundo (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014).

Daí surge a necessidade de uma abordagem de “One Health” - Saúde Única - para gestão e controle mais eficientes desses parasitos. O conceito proposto já na década de 90, remete a estratégias interdisciplinares e integrativas de promoção à saúde, em que a saúde humana, saúde animal são interdependentes e vinculadas à saúde dos ecossistemas (LERNER; BERG, 2015). Uma abordagem de Saúde Única para a produção de leite, saúde do rebanho, segurança alimentar e prevenção de doenças zoonóticas pode levar a avanços significativos na segurança alimentar, nutrição, higiene alimentar, bem como no avanço da saúde global. Esta abordagem integrativa para resolver problemas complexos que afetam a saúde e a conservação onde animais, humanos e o ecossistema é imperativa nos países em desenvolvimento (GARCIA et al., 2019).

2.4 Controle Químico de Helmintos Gastrointestinais

Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal, a classe com maior participação no mercado desde de 2015 é a de antiparasitários, sendo responsável por 27 % do faturamento líquido na indústria veterinária em 2020, o que equivale R\$ 7,586 bilhões. Os ruminantes ocupam o primeiro lugar no mercado destes produtos, 51%, seguidos de cães e gatos (22%) (SINDAN, 2021b).

Um desafio particular para as empresas engajadas na pesquisa de anti-helmínticos e nematicidas é que a relação custo-benefício é uma preocupação primordial. Além disso, existem restrições adicionais em termos dos níveis de toxicidade que o hospedeiro pode tolerar (HOLDEN-DYE; WALKER, 2014). Um antiparasitário para uso veterinário de sucesso deve ter uma larga margem terapêutica e existir um antídoto para casos de sobredosagem. Seu efeito deve ser potente e rápido. O efeito residual deve ser bem definido e de preferência prolongado, pois ambos, agricultores e proprietários de animais, querem administrar os produtos aos seus animais da maneira mais eficiente, rápida e menos frequente possível. O efeito residual do fármaco tem, no entanto, de ser compatível e seguro para o animal que está a ser tratado, e não comprometer a segurança dos produtos animais destinados à alimentação humana. Ter uma razão custo-benefício favorável. Ter um amplo espectro antiparasitário para o controle de parasitos de importância comercial. Ser de fácil administração (LOPEZ; CAMBEROS, 2006). Atualmente os produtos disponíveis no mercado têm características distintas entre eles.

Compreender o mecanismo de ação dos anti-helmínticos existentes pode fornecer muitas informações sobre os aspectos da fisiologia e do metabolismo dos helmintos que diferem do hospedeiro e são alvos para o desenvolvimento de novas famílias químicas com atividade anti-helmíntica. Desta forma, é possível indicar maneiras pelas quais a eficácia anti-helmíntica pode ser melhorada ou a toxicidade do hospedeiro reduzida, e pode ser instrutivo quanto ao mecanismo de resistência anti-helmíntica e como essa resistência pode ser superada. Além disso, o conhecimento do metabolismo e da fisiologia dos parasitos pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas (PRICHARD, 1997).

Os benzimidazóis são comercialmente encontrados como fembendazol, oxibendazol, albendazol, tiabendazol, entre outros. Possuem um amplo espectro de atividade, sendo altamente eficaz contra ovos, adultos, estádios larvais de nematoides, cestódeos e trematódeos (BOGAN; ARMOUR, 1987).

As avermectinas e as milbemicinas têm em sua estrutura lactonas macrocíclicas com ação nematicida, inseticida e acaricida, sendo, portanto, endectocidas (SHOOP et al., 1995). As avermectinas potencializam a capacidade de neurotransmissores como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA) de estimular um influxo de íons cloreto nas células nervosas, resultando na perda da função celular. Esse efeito interrompe os impulsos nervosos, resultando em paralisia e morte na maioria dos invertebrados afetados (SHOOP; SOLL, 2002).

As salicilanilidas agem desacoplando a fosforilação oxidativa ao acaso, interferindo na produção de energia, o que leva à morte por paralisia espástica pelo aumento de íons de cálcio nas células musculares. É eficaz contra trematódeos, cestódeos e nematoides (FAIRWEATHER; BORAY, 1999).

O levamisol e tetramisol pertencem à classe dos imidazóis, agindo em nematoides gastrointestinais e pulmonares (VIANA, 2000). Esses fármacos possuem ação semelhante à nicotina, estimulando e, subsequentemente, bloqueando as junções neuromusculares, sendo os vermes paralisados eliminados nas fezes (RANG et al., 2003).

Os compostos organofosforados tiveram suas origens como pesticidas e somente posteriormente foram utilizados como anti-helmínticos de espectro limitado. Entre os organofosforados usados como anti-helmínticos em animais estão diclorvós, triclorfon, haloxon, coumafós, naftalofós e crufomato (LANUSSE et al., 2009). Esses fármacos atuam por inibição irreversível das acetilcolinesterases, determinando interferência na transmissão neuromuscular com consequente morte do parasito. Sua toxicidade fez com que deixassem de ser usados na maioria dos casos (VIANA, 2000).

Os anti-helmínticos pirantel, morantel e oxantel da classe das tetraidroimidazóis. Atuam seletivamente como agonistas nos receptores nicotínicos de acetilcolina nas células musculares dos nematoides e produzem contração e paralisia espástica (LANUSSE et al., 2009).

Os compostos heterocíclicos, como a piperazina, são utilizados no tratamento de infecções por áscaris e por oxiúros. Essa classe inibe reversivelmente a transmissão neuromuscular no verme ao atuar como o GABA, neurotransmissor inibitório dos canais de cloreto regulados por GABA no músculo do nematoide (RANG et al., 2003).

Recentemente, três novas classes de anti-helmínticos tornam-se comercialmente disponíveis, emodepside, monepantel e derquantel. Todos os três novos compostos têm um efeito na transmissão neuromuscular devido a um modo de ação diferente dos anti-helmínticos clássicos (EPE; KAMINSK, 2013).

Atualmente, o controle de parasitos por anti-helmínticos comercialmente disponíveis para animais de produção e de companhia é insuficiente (PIÑA-VÁZQUEZ et al., 2017). O simples motivo é que as nações que mais sofrem com essas doenças tropicais têm pouco dinheiro para investir na descoberta de medicamentos ou na terapia. Não é nenhuma surpresa, portanto, que os medicamentos disponíveis para o tratamento humano foram desenvolvidos inicialmente como medicamentos veterinários. Existe um repertório lamentavelmente pequeno de agentes quimioterápicos disponíveis para tratamento. Em alguns aspectos, essa situação foi exacerbada pelo notável sucesso da ivermectina nos últimos 30 anos (GEARY, 2005), o que diminuiu a motivação para programas de descoberta de medicamentos anti-helmínticos (GEARY et al., 1999).

2.5 Resistência Anti-helmíntica

Cinquenta anos depois que a resistência anti-helmíntica em parasitos de bovinos foi relatada pela primeira vez, a prevalência de resistência aumentou globalmente e é cada vez mais significativa nas indústrias de animais. A resistência se desenvolve quando os parasitos sobrevivem ao tratamento e passam genes associados à resistência para seus descendentes. Com mais seleção e reprodução, esses genes aumentam de frequência na população. A resistência às classes de drogas anti-helmínticas quimicamente definidas parece desenvolver uma classe de cada vez. Para que a resistência se desenvolva em uma espécie, os parasitos com genes de resistência devem sobreviver ao tratamento, continuar a se reproduzir e ser transmitidos ao próximo hospedeiro. Uma vez desenvolvida, a resistência é difícil de reverter; portanto, para vencer a resistência, nossa melhor abordagem é evitá-la (SANGSTER et al., 2018).

A espécie *Haemonchus contortus* é o nematoide tricostrongilídeo mais extensamente estudado no que diz respeito à resistência anti-helmíntica. Em parte, isso se deve ao fato de ter demonstrado grande capacidade de desenvolver resistência a todas as principais classes de medicamentos; portanto, as resistências apresentadas por esta espécie tiveram um impacto econômico significativo em escala mundial. No entanto, além do impacto econômico de suas resistências, esta espécie também tem sido mais extensivamente estudada do que outras devido aos aspectos de sua biologia e fisiologia que a tornam um bom modelo experimental (GILLERAD, 2006, 2013).

A resistência aos benzimidazóis por *H. contortus* tem sido associada à perda de receptores de alta afinidade e alteração do padrão de isoforma da β -tubulina (LUBEGA; PRICHARD, 1991), com base em uma mutação bem conservada nos aminoácidos 200 ou 167 (fenilalanina para tirosina) em ambos os isotipos de β -tubulina 1 e 2 (KWA et al. 1994; PRICHARD, 2001).

A resistência ao levamisol é produzida por alterações nas propriedades das populações de receptores nicotínicos (ROBERTSON et al., 1999) e por uma alteração da ligação do fármaco aos receptores nicotínicos nas células musculares dos nematoides.

A resistência às lactonas macrocíclicas envolve a seleção de genes relacionados à expressão de algumas subunidades dos canais de cloreto dependente de glutamato e à glicoproteína P de transporte de medicamentos. Além disso, genes relacionados a uma subunidade do canal de cloreto dependente de GABA e a β -tubulina também parecem estar associados à resistência às lactonas macrocíclicas (ENG; PRICHARD, 2005).

Também já foi relatada resistência ao monepantel, fármaco recentemente introduzido da classe das aminoacetonitrilas. No entanto, o mecanismo responsável ainda não foi descrito (MEDEROS et al., 2014; VAN DEN BROM et al., 2015).

A existência de populações de campo mostrando resistência a todas as três principais classes de drogas e o aparecimento precoce de resistência ao monepantel ameaçam a sustentabilidade dos sistemas de produção de ovinos e caprinos em todo o mundo (KOTZE; PRICHARD, 2016).

2.6 Alternativas ao Controle Químico

As plantas medicinais sempre foram e ainda são uma valiosa fonte de agentes terapêuticos. Existem várias terapêuticas eficazes de fontes naturais amplamente utilizadas hoje. Historicamente, a descoberta de medicamentos dependia exclusivamente de produtos naturais como a principal fonte, o que influenciou significativamente os avanços na biologia e inspirou a descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Drogas naturais ou drogas de origem natural são aquelas que contêm seus ativos derivados de fontes biológicas ou minerais

e destinadas ao uso no diagnóstico, cura, mitigação e prevenção de doenças (ALAMGIR, 2017).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR. et al., 2006). Tradicionalmente, os medicamentos naturais eram amplamente usados como misturas ou extratos de plantas concentrados sem isolamento de compostos ativos, mas os avanços nos procedimentos experimentais no século XIX possibilitaram o isolamento e purificação dos princípios ativos dessas plantas (THOMFORD et al., 2018).

As diversidades estruturais e abundância de produtos naturais servem como uma base importante para a geração de novos projetos de bibliotecas de compostos (DAVISON; BRIMBLE, 2019). Apesar dos potenciais que os produtos naturais podem ter, as empresas farmacêuticas parecem reduzir significativamente os programas de produtos naturais por causa dos avanços notáveis na síntese combinatória e a triagem de alto rendimento que, conseqüentemente, possibilitaram a geração de um grande número de bibliotecas de pequenas moléculas sintéticas (SHEN, 2015). O número decrescente de programas de descoberta de produtos naturais não parece afetar o número de drogas naturais aprovadas, já que foi estimado que aproximadamente metade de todas as drogas recentemente aprovadas podem ser atribuídas a um produto natural (STRATTON et al., 2015).

É notável a importância histórica do uso de plantas em saúde no Brasil, especialmente na área farmacêutica. Isto pode ser justificado ao considerarmos a origem de nossa indústria farmacêutica, voltada inicialmente ao emprego de diversos insumos vegetais. Esta realidade se mantém atualmente com grande parte da indústria nacional utilizando plantas como insumo básico. Todavia, o impacto na economia brasileira não é significativo. Isto é contrastante em um país de grande potencial em biodiversidade e dado às excelentes condições climáticas, edáficas e potencial hídrico, onde é possível aqui adaptar inúmeras espécies vegetais (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010)

2.7 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são compostos secundários que, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam frequência inferior a 1% do carbono total, são compostos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, que lhes conferem características organolépticas (SIMÕES et al., 2007). Sua eficácia é frequentemente atribuída aos principais componentes tendo sua ação de forma individual ou sinérgica (ELLSE; WALL, 2014).

Desempenham um papel importante na adaptação ambiental da planta atuando como reguladores químicos e mensageiros na bioquímica vegetal, tendo papel fundamental na fertilização, polinização e adaptação ambiental da planta (FUMAGALI et al., 2008). A biossíntese dos OEs é controlada geneticamente, associada à fisiologia da planta e dependente do seu estado metabólico, mas fortemente influenciada por fatores ambientais, na colheita e pós-colheita (SANGWAN et al., 2001).

Devido ao grande número de constituintes, os OEs parecem não ter alvos celulares específicos. Como são lipofílicos típicos, eles atravessam a parede celular e a membrana

citoplasmática, rompem a estrutura de suas diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios e os permeabilizam. A citotoxicidade parece incluir tais danos à membrana. Para fins biológicos, é mais informativo estudar um OE inteiro, em vez de alguns de seus componentes, porque o conceito de sinergismo parece ser mais significativo (BAKKALI et al., 2008).

Diante do quadro atual de resistência aos anti-helmínticos disponíveis comercialmente, a procura de novas moléculas é uma necessidade para garantir a saúde de humanos e animais (de companhia e de produção), a produtividade da pecuária brasileira, menor risco de resíduos nos alimentos e de contaminação ambiental. Opções como a utilização de fitoingredientes pode representar uma alternativa para o controle das parasitoses e minimizar alguns desses problemas, apresentando a vantagem de serem sustentáveis e ambientalmente aceitos.

Muitos estudos demonstraram uma possibilidade real do uso de fitoativos no controle de nematoides. O OE de *Eucalyptus citriodora*, que possui o citronelal como componente majoritário têm ação sob a motilidade de *H. contortus* além de reduzir o número de ovos por grama de fezes (ARAÚJO-FILHO et al., 2019). Os efeitos anti-helmínticos do OE de coentro e seus cinco constituintes (geraniol, acetato de geranila, eugenol, metil iso-eugenol e linalol) resultaram em atividade em *H. contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus* e *Cooperia oncophora*. O efeito sinérgico entre o OE de coentro e o linalol, reduziu valores de CI_{50} (concentração inibitória média) quando tratados isoladamente e induziu um dano estrutural considerável a L3s dos helmintos (HELAL et al., 2020).

2.7.1 Óleo Essencial de *Cymbopogon flexuosus*

Também chamado de OE de capim-limão, é o óleo volátil obtido das folhas e partes aéreas dos citratos *Cymbopogon* e *C. flexuosus*. A planta é nativa da Índia e cultivada na Índia, China, Mianmar, África Oriental e Ocidental, Guatemala, América do Sul, Java, Madagascar e muitos outros países. Ambas as espécies são gramíneas perenes em tufos que crescem bem em dias ensolarados, quentes e condições úmidas, como os trópicos. Eles precisam de pelo menos 2500 - 3000 mm de precipitação anual. Uma temperatura diurna de 25 - 30 °C é considerada ótima para a produção máxima de óleo sem temperaturas noturnas extremamente baixas. As plantas podem ser cultivadas em uma variedade de solos, normalmente em torno de pH neutro (BHATTACHARYA, 2016).

Estudos demonstraram sua atividade como anestésico (LIMMA-NETTO et al., 2016), antifúngico (KUMAR et al., 2009), agente anticâncer e antioxidante (SHARMA et al., 2009) e antimicrobiana (AHMAD; VILJOENA, 2015).

2.7.2 Óleo Essencial de *Eugenia caryophyllus*

O OE de cravo é obtido dos botões de flores secos de *E. caryophyllus*. É nativo das ilhas Molucas e cultivado em Zanzibar, Pemba, Penang, Madagascar, ilhas do Caribe, Sri Lanka e, portanto, solo argiloso rico e profundo com alto teor de húmus é adequado para o cultivo de cravo. Também é encontrado crescendo favoravelmente em aberto solos franco-arenosos e lateríticos. Necessita de clima quente e úmido e cresce bem à beira mar. Uma precipitação anual na faixa de 150 - 250 cm é outro requisito para o cultivo desta planta. A planta começa a produzir após 7 a 8 anos e um rendimento satisfatório é alcançado somente após 15 - 20 anos de crescimento (BHATTACHARYA, 2016).

Apresenta atividade agente antimicrobiano e antioxidante (EL AMRANI et al., 2019), bem como apresenta atividade inseticida (MATOS et al., 2020), antifúngica (GUCWA et al., 2018) e antiinflamatória (HAN & PARKER, 2017).

2.7.3 Óleo Essencial de *Illicium verum*

Árvore perene da família Illiiciaceae de até 12 metros de altura com tronco branco alto e delgado. Seus frutos são constituídos por cinco a 13 folículos portadores de sementes presos a um eixo central em forma de estrela, daí seu nome comum - OE de anis estrelado. Nativa do sudeste da China, também Vietnã, Índia e Japão e produzida principalmente na China (LAWLESS, 2013).

O OE de anis estrelado exibiu alta atividade antioxidante e antimicrobiana (SINGH et al., 2006), atividade inseticida e atividade antifúngica (CHOUKSEY et al., 2010). É usado em produtos de panificação, confeitaria e licores (DE et al., 2002). Além de ser um condimento comum para chás medicinais, mistura para tosse e pastilhas (CHOUKSEY et al., 2010).

2.7.4 Óleo Essencial de *Mentha piperita*

As espécies de *Mentha* spp. pertencem à família Lamiaceae e cultivadas em várias partes do mundo. Ela cresce selvagem na Europa, enquanto é cultivada no Japão, Inglaterra, França, Itália, EUA, Bulgária, Rússia e Índia. Para o cultivo de hortelã-pimenta (*M. piperita*), areia fértil bem drenada e solo argiloso com pH neutro são necessários. Outros requisitos para o cultivo incluem chuva na faixa de 95 - 105 cm, altitude de 250 - 400 m e temperatura entre 15 e 25 °C (BHATTACHARYA, 2016).

O OE de *M. piperita* tem atividade hipoglicemiante (ABDELLATIEF et al., 2017), antioxidante e antibacteriana (ADDAI et al., 2016), antifúngica (DESAM et al., 2017).

2.7.5 Óleo Essencial de *Mentha spicata*

Outra espécie de *Mentha* spp., pertencente à mesma família e com características semelhantes. A hortelã (espécie *Mentha* L.) é uma das importantes plantas econômicas aromáticas e é usada de várias maneiras. As atividades do óleo de hortelã se assemelham às do óleo de hortelã-pimenta, mas seus efeitos são menos poderosos (LAWLESS, 2013).

2.7.6 Óleo Essencial de *Pelargonium graveolens*

Pertencente à família Geraniaceae, o gerânio é um arbusto perene de até 1 metro de altura com folhas pontiagudas, serrilhado nas bordas e pequenas flores rosa. É nativa da África do Sul; amplamente cultivada na Rússia, Egito, Congo, Japão, América Central e Europa (Espanha, Itália e França). No que diz respeito à produção de OE, são três principais regiões: Ilhas Reunião (Bourbon), Egito e Rússia. Existem várias espécies produtoras de OE, como *P. odorantissimum* e *P. radens*, mas *P. graveolens* é o principal cultivado (LAWLESS, 2013).

A atividade nematocida frente ao nematoides do solo foi descrita por Leela et al. (1992) e Oka et al. (2000). Também apresenta atividade antifúngica (GUCWA et al., 2018), antioxidante, anticolinesterásica e antimicrobiana (ENNAIFER et al., 2020).

2.7.7 Óleo Essencial de *Thymus vulgaris*

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.), pertencente à família Lamiaceae, é um subarbusto perene com vida útil de aproximadamente 10 - 15 anos. A planta adulta pode ter 25 cm de altura, com fuste quadrangular e ramos; as folhas sem pedúnculo têm 6 - 12 mm de comprimento e são ovais de forma oblonga (OZGUVEN; TANSI, 1998). É uma planta nativa da Espanha e da região do Mediterrâneo; agora encontrada em toda a Ásia Menor, Argélia,

Turquia, Tunísia, Israel, EUA, Rússia, China e Europa Central. O OE é principalmente produzido na Espanha, mas também na França, Israel, Grécia, Marrocos, Argélia, Alemanha e EUA (LAWLESS, 2013).

O uso não medicinal de *T. vulgaris* é de grande importância, sendo utilizado nas indústrias de alimentos e aromas, sendo usado como intensificador de sabor em uma ampla variedade de alimentos, bebidas e produtos de confeitaria (RAMADAN et al., 2013). Além disso, o OE de *T. vulgaris* também possui atividade antimicrobiana, antioxidante e antifúngica (DOBRE et al., 2011a; DOBRE et al., 2011b), portanto, muito utilizado na conservação de alimentos.

2.8 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é um pequeno nematoide de vida livre e não parasitário. Na natureza, *C. elegans* e outras espécies de *Caenorhabditis* são encontradas na maioria dos continentes e em muitos territórios isolados. Mais de 25 espécies do gênero *Caenorhabditis* foram caracterizadas até o momento. Embora as espécies tenham muitas semelhanças morfológicas, elas são divergentes no nível genético. A divergência genética reflete a especialização ecológica e a distribuição territorial de diferentes espécies (HODGKIN, 2001).

É um organismo modelo importante para pesquisa biológica em muitos campos, incluindo genômica, biologia celular, neurociência e envelhecimento. Entre suas muitas vantagens para o estudo estão seu curto ciclo de vida, genoma compacto, desenvolvimento estereotipado, facilidade de propagação e tamanho pequeno (o adulto chega a um milímetro de comprimento). O plano do corpo adulto é anatomicamente simples, com cerca de 1000 células somáticas. É passível de cruzamentos genéticos e produz um grande número de progênes por adulto. Reproduz-se com um ciclo de vida de cerca de 3 dias em condições ideais. Pode ser mantido em laboratório, onde é cultivado em placas de ágar NGM (“Nematode Growth Medium”) ou culturas líquidas com *Escherichia coli* como fonte de alimento. A descrição morfológica deste nematoide foi concluída em nível de microscopia eletrônica e sua linhagem celular completa, que é invariável entre os animais, foi estabelecida (BRENNER, 1974; BYERLY et al., 1976; SULSTON et al., 1983; LEWIS; FLEMING, 1995).

Entretanto, nenhum organismo modelo pode ser usado para responder a todas as perguntas de pesquisa e trabalhar com *C. elegans* tem algumas limitações, devendo seus resultados serem confirmados no organismo-alvo (RUVKUN; HOBERT, 1998).

2.8.1 Morfologia

Quanto à sua morfologia, *C. elegans* apresenta-se semelhante a outros nematoides, possui um corpo cilíndrico não segmentado e afilado nas extremidades, com um tubo externo e um tubo interno separados pelo espaço pseudo-celômico. O tubo externo (parede corporal) consiste em cutícula, hipoderme, sistema excretor, neurônios e músculos, e o tubo interno compreende a faringe, o intestino e, no adulto, a gônada. Todos esses tecidos estão sob pressão hidrostática interna, regulada por um sistema osmorregulador. Existem dois sexos de *C. elegans*: hermafrodita autofertilizante (XX) e masculino (XO), porém os machos surgem com pouca frequência (0,1%). O ciclo de vida, descrito na Figura 1, de *C. elegans* é composto pelo estágio embrionário, quatro estágios larvais (L1-L4) e adulto. Também pode suportar condições ambientais adversas, mudando para um estágio facultativo de diapausa chamado larva “dauer”, isto acontece no final do estágio L2 (CASSADA; RUSSELL, 1975; ALTUN; HALL, 2009).

A casca do ovo de *C. elegans* é composta por três camadas bem definidas: camada vitelina mais externa, camada de quitina média e uma camada mais interna de proteoglicano de condroitina. Separando a casca de ovo externa trilaminar da barreira de permeabilidade interna está a matriz extra-embriônica. Sob a camada de barreira de permeabilidade está uma camada peri-embriônica amorfa, que reveste o embrião propriamente dito. Essas camadas podem ser visualizadas por meio de microscopia eletrônica e por tratamentos bioquímicos que possuem a capacidade de remover as camadas individuais do embrião. Sua função é conferir proteção física ao embrião conforme ele encontra o ambiente no qual se desenvolverá. (SCHIERENBERG; JUNKERSDORF, 1992; RAPPLEYE et al., 1999; BENENATI et al., 2009; OLSON et al., 2012; STEIN; GOLDEN, 2018).

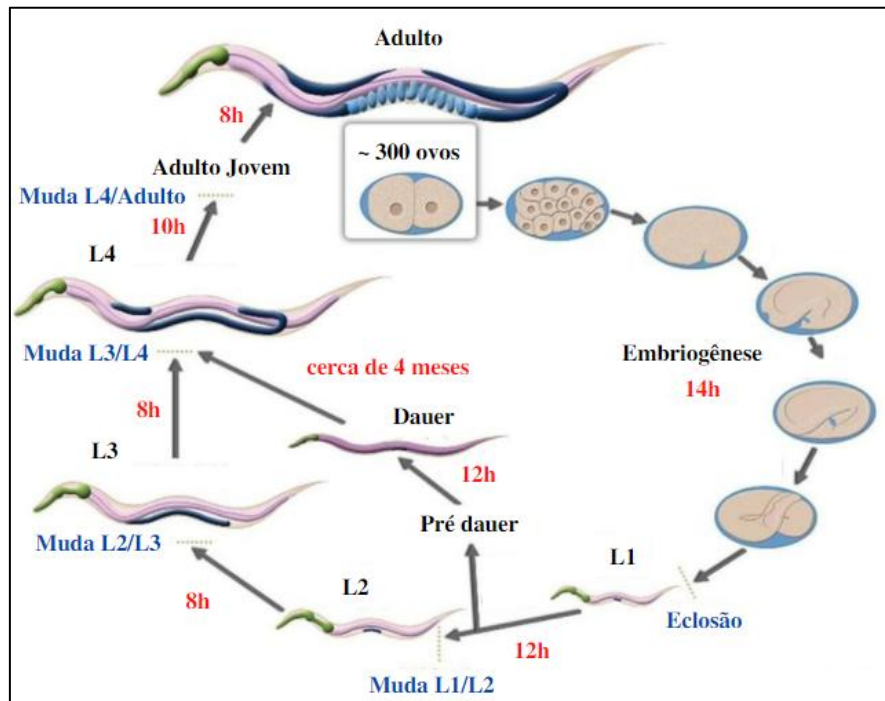


Figura 1. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* a 20 °C. Os números em vermelho ao longo das setas indicam o tempo que o indivíduo passa em um determinado estágio. Adaptado de ALTUN & HALL, 2009.

2.8.2 Uso na Pesquisa de Novos Anti-helmínticos

No ramo da pesquisa de novos anti-helmínticos, *C. elegans* têm se mostrado um modelo de organismo promissor para pré-triagem de moléculas, o que pode aumentar o rendimento de futuras descobertas, pois as moléculas podem ser rastreadas com certa facilidade e velocidade. Basicamente, *C. elegans* pode ser usado para avaliar centenas de milhares de moléculas em múltiplas concentrações a uma fração de custo e tempo que seriam necessários na maioria dos modelos de nematoide parasitos. Há ainda a possibilidade de gerar em laboratórios cepas resistentes aos efeitos de benzimidazóis, imidazóis e outras classes tradicionais, sendo favorável para a descoberta de novas moléculas (BURNS et al., 2015). A triagem baseada em *C. elegans* reduz custos, promove grandes bibliotecas químicas em base líquida nos formatos de 96, 384 ou 1536 poços e expande o número de medicamentos que podem ser identificados. Todos esses avanços podem contribuir para o desenvolvimento de fármacos contra helmintos e na compreensão dos mecanismos de resistência (O'REILLY et al., 2013).

Em suma, um composto que tem um efeito anti-helmíntico em *C. elegans* também pode ter um efeito em uma ampla gama de nematoides parasitos, como foi demonstrado com

a maioria dos anti-helmínticos disponíveis comercialmente. Além disso, o modo de ação das drogas pode ser facilmente estudado com este modelo através do comportamento dos nematoides, locomoção, reprodução e morte (SEPÚLVEDA-CRESPO et al., 2020).

Ensaio com *C. elegans* devem ser considerados como uma ferramenta útil adicional no estágio de triagem. Resultados primários devem ser identificados por meio de ensaios de sobrevivência *C. elegans* como um filtro inicial, seguido por ensaios de eficácia *in vitro* com parasitos adultos, ensaios de eficácia *in vivo* com animais infectados experimentalmente e devem em seguida, avaliar a toxicidade do hospedeiro de novos anti-helmínticos usando linhas de células de mamíferos ou modelos de vertebrados (KEISER et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

Os experimentos biológicos foram realizados no período de abril de 2020 a dezembro de 2021 no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ.

3.2 Aquisição de Cepas de *Caenorhabditis elegans* e *Escherichia coli*

As seguintes cepas de *C. elegans* e *E. coli* foram obtidas do “Caenorhabditis Genetics Center” (Massachusetts, EUA): N2 (selvagem), DA1316 (resistente à ivermectina), CB3474 (resistente ao benzimidazol), CB211 (resistente ao levamisol) e OP50 (mutante de *E. coli*).

3.3 Manutenção de Cepas

As cepas de *C. elegans* foram cultivadas e mantidas em placas de “Nematode Growth Medium” (NGM), incubadas a 20 °C em BOD e alimentadas com *E. coli* OP50, como ilustrado na Figura 2. O método “chunking”, em que um pedaço da placa antiga é transferido com auxílio de alça descartável para uma placa nova, foi utilizado para a transferência de *C. elegans* entre as placa de petri a cada 14 dias (STIERNAGLE, 2006).

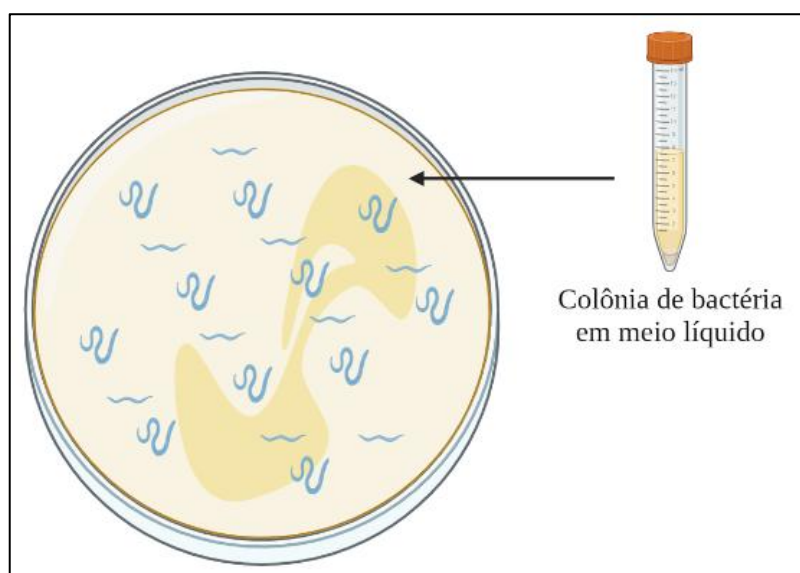


Figura 2. Desenho esquemático de manutenção de cepas de *Caenorhabditis elegans* com cultura líquida de *Escherichia coli* OP50.

A colônia de *E. coli* OP50 é mantida em placa de petri em estrias múltiplas, feitas com alça descartável, em meio Luria Bertani (LB). *E. coli* OP50 em meio líquido foi preparada ao inocular uma única colônia da placa no caldo de LB. Os tubos são deixados à 37 °C por 8h e armazenados sob refrigeração após esse tempo.

3.4 Meios de Cultura

Seguindo os protocolos de Byerly et al. (1976) foram preparados os seguintes meios de cultura: “Nematode Growth Medium” (NGM), Luria Bertani (LB) e tampão S.

3.5 Sincronização de *Caenorhabditis elegans*

Para obtenção de indivíduos em mesmo estágio evolutivo foi realizado o método de sincronização (LEWIS; FLEMING, 1995). Ao fim deste processo, apenas os ovos protegidos por cápsula estavam viáveis, permitindo o acompanhamento do crescimento e seleção dos nematoides, conforme a ilustração na Figura 3.

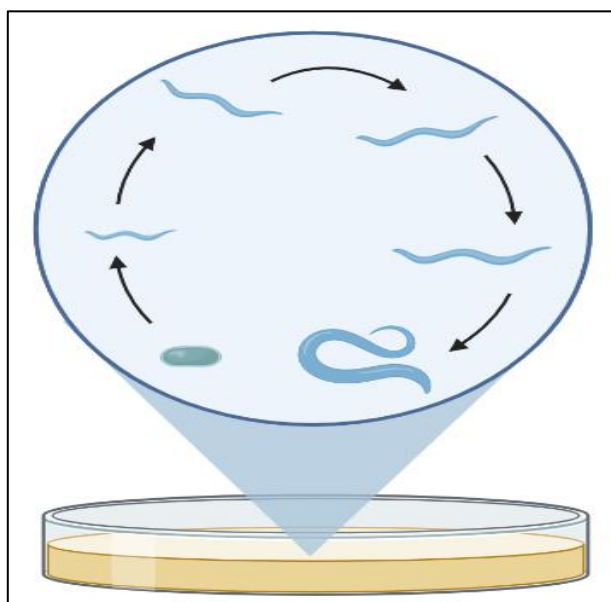


Figura 3. Desenho esquemático do desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans* após sincronização.

Foram transferidas, três dias antes do processo de sincronização, hermafroditas jovens adultas para placa de petri contendo NGM. As placas foram mantidas sob temperatura de 20 °C em BOD para o crescimento da população. No fluxo laminar, preparou-se previamente, em tubo estéril, 2 mL de hipoclorito de sódio 4 a 6% adicionado a 5 mL de NaOH 1M [40 g/L aquoso]. A placa escolhida foi lavada com H₂O Mili-Q, para recuperação dos indivíduos, e transferida um tubo. Foi realizada a centrifugação do tubo a 1200 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi aspirado até restar 1 mL de volume. Adicionou-se, então, a solução de hipoclorito de sódio 4 a 6% + NaOH 1M. Agitou-se o tubo. A solução foi centrifugada novamente. O sobrenadante foi aspirado até restar 1 mL de volume no tubo. Completou-se o volume até 10 mL com H₂O Mili-Q e misturou-se a solução, que foi novamente centrifugada. Os dois últimos passos foram repetidos por três vezes, esse processo não pode levar mais que dez minutos cronometrados. O sobrenadante foi aspirado até restar 1 mL de volume no tubo. Adicionou-se 5 mL de caldo de NGM e misturou-se. O sobrenadante foi aspirado até restar 1 mL de volume no tubo. O restante foi transferido para uma placa de NGM incubada por 8 horas sob temperatura de 20 °C em BOD. No dia seguinte, foi adicionada *E.coli* OP50 à placa para sua alimentação.

3.6 Óleos Essenciais

Os OEs de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* foram adquiridos da QUINARÍ®. Os OEs de *C. flexuosus*, *I. verum* e *P. graveolens* foram adquiridos da ViaAroma®. O OE de *M. piperita* foi adquirido da BioEssência® e o OE de *M. spicata* foi produto da extração das folhas da planta, segundo dos Santos et al. (2020). A composição química dos OEs foi descrita pelas empresas onde foram adquiridos, conforme a Tabela 1. Com exceção, do OE de *M. spicata*, que foi analisado em estudo anterior.

Todos os OEs foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% (DMSO, Labsynth, São Paulo, Brasil) e para diluições subsequentes foi utilizada H₂O Mili-Q.

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais utilizados.

Óleo Essencial	Composição Química
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	geranial (43,4%), neral (33%) e geraniol (8,3%).
<i>Eugenia caryophyllus</i>	eugenol (N.I.)
<i>Illicium verum</i>	trans-anetol (86,6%)
<i>Mentha piperita</i>	mentol (42,76%), mentona (24,77%) e eucaliptol (6,08%)
<i>Mentha spicata</i>	carvona (83,3%) e geranial (6,2%)
<i>Pelargonium graveolens</i>	citronelol (39,6%), geraniol (15,1%) e formato de citronelila (10,2)
<i>Thymus vulgaris</i>	timol (N.I.)

N.I.: não informado

3.7 Reagentes Químicos

A ivermectina foi adquirida comercialmente da Champion Farmoquímico® e o albendazol foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich®. E O DMSO foi adquirido do Labsynth®. Ambos os produtos químicos foram diluídos em DMSO e H₂O Mili-Q.

3.8 Testes *in vitro*

3.8.1 Letalidade em Indivíduos Adultos

Uma placa sincronizada, com indivíduos adultos de *C. elegans* (N2, DA1316, CB3474 e CB211) foi coletada. Os nematoides foram lavados com tampão S. Aproximadamente 20 indivíduos adultos foram transferidos e incubados para placas de 96 poços contendo 20 µL de diferentes concentrações de cada óleo dissolvido em 0,1% de DMSO e H₂O Mili-Q. O volume final foi de 200 µL. DMSO 0,1% foi utilizado como controle negativo. Foi utilizado ivermectina na concentração de 1 µg.mL⁻¹ como controle positivo nas cepas N2, CB3474 e CB211. Para a cepa DA1316 foi utilizado o albendazol na concentração de 0,5 µg.mL⁻¹. As placas foram incubadas de 20 °C em BOD por 48h e observadas em 0 e 48h. Foi realizada a quantificação de indivíduos vivos e mortos com o auxílio de estereomicroscópio com transiluminador. O critério utilizado foi a motilidade, ou seja, os indivíduos vivos foram notados por seu movimento livre enquanto os mortos não mostraram nenhum movimento (CHAWEEBORISUIT et al., 2016).

Foram utilizados os OEs de *C. flexuosus*, *E. caryophyllus*, *I. verum*, *M. piperita*, *M. spicata*, *P. graveolens* e *T. vulgaris*.

Os testes foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa todos os OEs foram diluídos nas concentrações 10, 100 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para determinação da CL₁₀ e CL₉₀. Este teste foi realizado apenas em um dia de estudo e em quintuplicata. Os OEs com valores superiores de CLs não seguiram para segunda etapa.

Na segunda etapa, foi determinada uma nova faixa com 10 concentrações equidistantes a partir das CLs definidas na etapa anterior. Em geral, os testes seguiram com os OEs em que as concentrações se encontraram dentro da faixa inicial, para estes foram realizados dois dias de estudo e também em quintuplicata. O procedimento foi ilustrado na Figura 4.

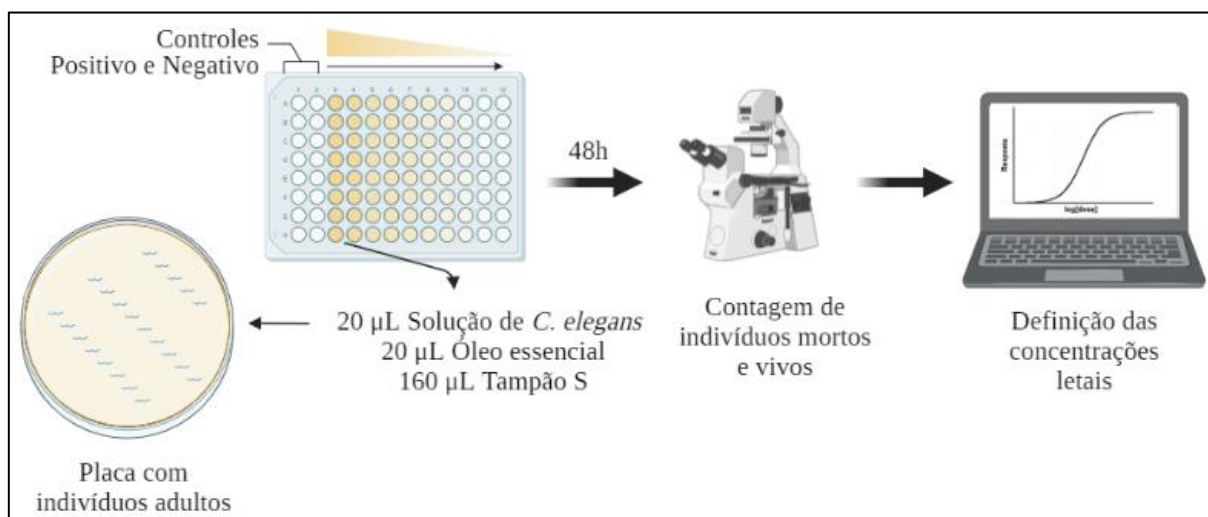


Figura 4. Desenho esquemático do teste *in vitro* de letalidade de indivíduos adultos de *Caenorhabditis elegans*.

3.8.2 Eclodibilidade de Ovos

Uma placa com indivíduos adultos gravídicos N2 e ovos foi sincronizada. Aproximadamente 20 ovos foram transferidos e incubados para placas de 96 poços contendo 20 μL de diferentes concentrações de cada óleo dissolvido em 0,1% de DMSO e H₂O Mili-Q. O volume final foi de 200 μL . Albendazol 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e DMSO 0,1% foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. As placas foram incubadas de 20 °C em BOD por 24h. Ovos não eclodidos e larvas L1 foram observados e contados (BIZIMENYERA et al., 2006).

O teste foi realizado em quintuplicata e em dois dias diferentes apenas com os cinco OEs que resultaram menores valores de CI₅₀ e CI₉₀. O procedimento foi descrito na Figura 5.

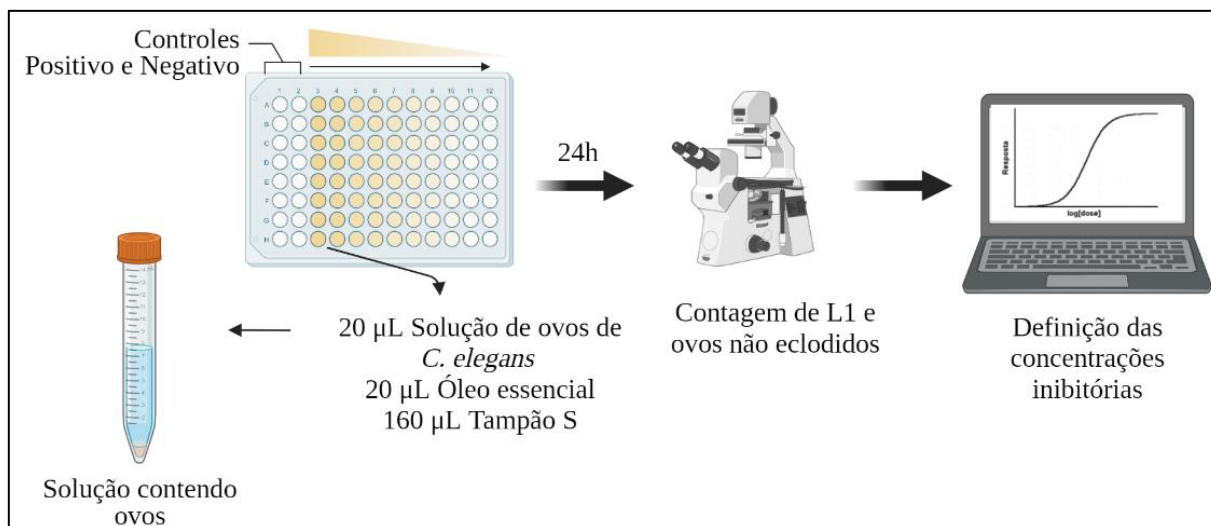


Figura 5. Desenho esquemático do teste *in vitro* de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans*.

3.8.3 Postura de Ovos

Aproximadamente 10 indivíduos adultos grávidos de *C. elegans* (N2) foram transferidos para placas de petri com NGM contendo OE na CL₁₀, pois concentrações altas podem matar o indivíduo, não permitindo a avaliação da reprodutividade. As placas foram incubadas a 20 °C em BOD por 24h e os indivíduos foram transferidos para novas placas. Este procedimento foi repetido por 5 dias consecutivos. Os ovos foram observados e contados diariamente (LEE; KANG, 2017).

O teste foi realizado em duplicata e em três dias diferentes. O procedimento foi ilustrado na Figura 6.



Figura 6. Desenho esquemático do teste *in vitro* de postura de ovos de *Caenorhabditis elegans*.

3.9 Análise Estatística

Foi utilizada uma árvore de decisão como meio de construir uma linha de testes que predizem o resultado final do estudo (Figura 7).

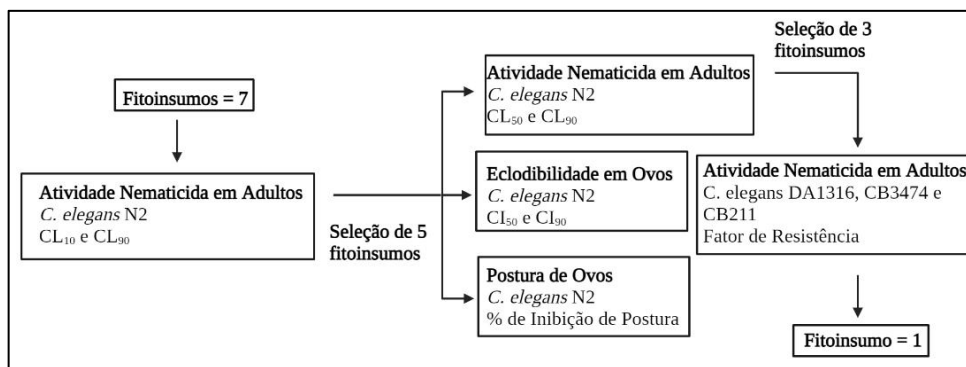


Figura 7. Árvore de decisão do estudo.

Foram realizadas duas etapas para a análise estatística para os testes *in vitro* de letalidade de adultos e eclodibilidade de ovos, sendo os resultados expressos por meio de médias e desvios-padrão. Para verificação dos valores aberrantes foi realizado o teste de Bartlett. Esses dados são retirados da análise. Na segunda etapa foi realizada a análise de probit. O resultado gerado possibilitou a obtenção da CL_{50} ou CI_{50} , CL_{90} ou CI_{90} e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, do coeficiente de inclinação (intercepto), coeficiente angular (slope), R^2 e chi-quadrado, permitindo comparar os tratamentos. Foi utilizado o programa RStudio® versão 3.6.1 com pacote de “ecotoxicology” e ExpDes (CARVALHO et al., 2017).

Para o ensaio de postura de ovos, os resultados foram expressos pelo total de ovos contados durante o bioensaio por meio de médias e desvios-padrão e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de um fator e teste de comparação múltipla de Tukey foram usados através do software Excel com nível de significância de 95%.

Os fatores de resistência para comparação da CL_{50} e seus intervalos de confiança foram gerados usando a fórmula descrita por Robertson et al. (2007). A significância de cada comparação foi determinada quando o RR IC95% calculado foi $> 1,0$.

4 RESULTADOS

4.1 Teste *in vitro* de Letalidade em Adultos de Cepa Selvagem

Os indivíduos adultos de *C. elegans* foram submetidos a um teste *in vitro* com concentrações iniciais comum a todos os OEs. Os valores de CL₁₀ e CL₉₀ foram determinados a fim de delimitar uma faixa de concentração com 10 valores equidistantes a partir da análise de probit. Esta faixa de concentração foi utilizada nos testes subsequentes. Os OEs de *M. piperita* e *M. spicata* resultaram em valores muito acima da faixa testada, portanto, foram descartados. O resultado da triagem inicial está descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem tratados com diferentes óleos essenciais nas concentrações 10, 100 e 1000 µg.mL⁻¹ após 48h.

Tratamento	Concentração (µg.mL ⁻¹)	Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Faixa CL ₁₀ - CL ₉₀ (µg.mL ⁻¹)
Controle	0	131	21	16,0	
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	10	151	33	21,9	19,8 - 861,6
	100	141	63	44,7	
	1000	130	125	96,2	
<i>Eugenia caryophyllus</i>	10	141	20	14,2	31,4 - 764,2
	100	98	39	39,8	
	1000	59	59	100,0	
<i>Illicium verum</i>	10	77	20	26,0	11,4 - 406,9
	100	65	33	50,8	
	1000	95	94	98,9	
<i>Mentha piperita</i>	10	134	22	16,4	192,4 - 4097,9922
	100	142	25	17,6	
	1000	134	69	51,5	
<i>Mentha spicata</i>	10	134	27	20,1	28,1 - 181175,7
	100	128	42	32,8	
	1000	100	49	49,0	
<i>Pelargonium graveolens</i>	5	87	3	3,4	5 - 50
	25	94	16	19,0	
	50	94	46	48,9	
<i>Thymus vulgaris</i>	10	94	53	56,4	14,4 - 369,3
	100	98	74	75,5	
	1000	57	57	100,0	

Na segunda etapa, todos os OEs resultaram atividade contra os adultos de *C. elegans* na faixa de concentração testada após 48h de exposição. Os OEs de *T. vulgaris*, *E. caryophyllus* e *C. flexuosus* resultaram em 100% de atividade nas concentrações de 257,7, 536,2 e 861,6 µg.mL⁻¹, respectivamente. O OE de *I. verum* resultou em 92,1% de atividade em 406,9 µg.mL⁻¹, já o OE de *P. graveolens* resultou em 46,8% de atividade em 50 µg.mL⁻¹. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os resultados de mortalidade de adultos de *C. elegans* para a faixa de concentração dos OEs.

Tabela 3. Mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem tratados com os óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*, *Eugenia caryophyllus*, *Illicium verum* e *Pelargonium graveolens* em diferentes concentrações após 48h.

Óleo Essencial	Concentração (µg.mL ⁻¹)	D1			D2			Média da % de Mortalidade
		Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	0	137	5	3,6	125	4	3,2	3,4 ± 0,3
	19,8	129	56	43,4	209	10	4,8	24,1 ± 27,3
	30,1	136	71	52,2	142	4	2,8	27,5 ± 34,9
	45,8	133	61	45,9	150	4	2,7	24,3 ± 30,5
	69,6	194	99	51,0	156	3	1,9	26,5 ± 34,7
	105,9	133	72	54,1	184	7	3,8	29,0 ± 35,6
	161,1	135	94	69,6	167	52	31,1	50,4 ± 27,2
	245	145	123	84,8	183	150	82,0	83,4 ± 2,0
	372,5	116	116	100,0	213	179	84,0	92,0 ± 11,3
	566,6	112	112	100,0	159	153	96,2	98,1 ± 2,7
861,6	123	123	100,0	189	189	100,0	100,0 ± 0,0	
<i>Eugenia caryophyllus</i>	0	125	12	9,6	159	12	7,5	8,6 ± 1,5
	31,4	152	23	15,1	173	0	0,0	7,6 ± 10,7
	44,8	117	19	16,2	116	10	8,6	12,4 ± 5,4
	63,9	122	29	23,8	111	14	12,6	18,2 ± 7,9
	91,1	111	24	21,6	189	40	21,2	21,4 ± 0,3
	129,9	120	42	35,0	203	115	56,7	45,8 ± 15,3
	185,5	124	85	68,5	213	186	87,3	77,9 ± 13,3
	263,9	90	83	92,2	207	200	96,6	94,4 ± 3,1
	376,2	114	111	97,4	113	113	100,0	98,7 ± 1,9
	536,2	113	113	100,0	105	105	100,0	100,0 ± 0,0
764,2	105	105	100,0	123	123	100,0	100,0 ± 0,0	
<i>Illicium verum</i>	0	119	7	5,9	119	7	5,9	5,9 ± 0,0
	11,4	191	66	34,6	183	63	34,4	34,5 ± 0,1
	16,9	101	53	52,5	169	88	52,1	52,3 ± 0,3
	25,2	149	64	43,0	158	69	43,7	43,3 ± 0,5
	37,5	105	52	49,5	137	69	50,4	49,9 ± 0,6
	55,8	67	43	64,2	131	79	60,3	62,2 ± 2,7
	83,1	65	38	58,5	108	68	63,0	60,7 ± 3,2
	123,6	78	54	69,2	118	82	69,5	69,4 ± 0,2
	183,9	101	77	76,2	103	78	75,7	76,0 ± 0,4
	273,5	62	51	82,3	125	105	84,0	83,1 ± 1,2
406,9	81	75	92,6	84	77	91,7	92,1 ± 0,7	
<i>Pelargonium graveolens</i>	0	78	2	2,6	31	5	16,1	9,3 ± 9,6
	5	87	3	3,4	29	6	20,7	12,1 ± 12,2
	6,5	61	6	9,8	56	14	25,0	17,4 ± 10,7
	8	78	6	7,7	45	11	24,4	16,1 ± 11,8
	11	82	5	6,1	50	15	30,0	18,0 ± 16,9
	14	71	6	8,5	61	19	31,1	19,8 ± 16,0
	18	75	18	24,0	63	32	50,8	37,4 ± 18,9
	21	83	15	18,1	65	26	40,0	29,0 ± 15,5
	30	70	16	22,9	72	31	43,1	33,0 ± 14,3
	39	73	20	27,4	54	28	51,9	39,6 ± 17,3
50	94	46	48,9	79	35	44,3	46,6 ± 3,3	

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio.

Tabela 4. Mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem tratados com o óleo essencial de *Thymus vulgaris* em diferentes concentrações após 48h.

Óleo Essencial	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média da % de Mortalidade
		Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	
<i>Thymus vulgaris</i>	0	159	12	7,5	137	5	3,6	5,6 \pm 2,8
	14,4	159	13	8,2	156	15	9,6	8,9 \pm 1,0
	20,7	210	35	16,7	175	16	9,1	12,9 \pm 5,3
	29,7	176	29	16,5	160	22	13,8	15,1 \pm 1,9
	42,6	170	61	35,9	134	26	19,4	27,6 \pm 11,7
	61,1	232	90	38,8	130	30	23,1	30,9 \pm 11,1
	87,5	165	100	60,6	131	59	45,0	52,8 \pm 11,0
	125,5	186	133	71,5	155	89	57,4	64,5 \pm 10,0
	179,8	196	167	85,2	133	128	96,2	90,7 \pm 7,8
	257,7	131	131	100,0	114	114	100,0	100,0 \pm 0,0
	369,3	120	120	100,0	119	119	100,0	100,0 \pm 0,0

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio.

Os pontos aberrantes foram retirados e foi realizada a análise de probit utilizando a soma dos dados brutos nos dois dias estudados a fim de determinar a CL_{50} e CL_{90} dos diferentes OEs. Os dados obtidos a partir desta análise para os diferentes OEs frente a adultos de *C. elegans* após 48h de exposição são descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem após 48h de incubação.

Óleo Essencial	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CL_{90} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intercepto	Slope	R ²	X ²
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	107,51	100,00 - 115,50	454,33	403,72 - 518,95	0,8406	2,0474	0,8588	1
<i>Eugenia caryophyllus</i>	135,87	131,34 - 140,52	209,51	199,50 - 221,72	-9,5351	6,8139	0,8148	1
<i>Illicium verum</i>	35,56	30,38 - 41,20	629,27	450,59 - 964,80	3,4071	1,0269	0,9089	0,9996
<i>Pelargonium graveolens</i>	54,57	46,04 - 68,71	242,64	165,68 - 420,31	1,5647	1,9777	0,9148	0,9999
<i>Thymus vulgaris</i>	85,84	81,68 - 90,25	213,78	197,65 - 233,37	-1,2535	3,2339	0,9128	1

CL_{50} : concentração letal 50; **CL_{90} :** concentração letal 90; **IC95%:** intervalo de confiança a 95%; **Intercepto:** intercepto da curva; **Slope:** coeficiente angular; **R²:** coeficiente de determinação; **X²:** chi-quadrado.

A atividade nematicida pode ser comparada através do valor de CL_{50} , menores valores indicam maior atividade. Sendo assim, o OE de *I. verum* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} 35,56 e 629,27 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, O OE de *P. graveolens* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} de 54,57 e 242,64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *T. vulgaris* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} 85,84 e 213,78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *C. flexuosus* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} 107,51 e 454,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *E. caryophyllus* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} 135,87 e 209,51 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A representação gráfica das análises de probits podem ser verificadas na Figura 8.

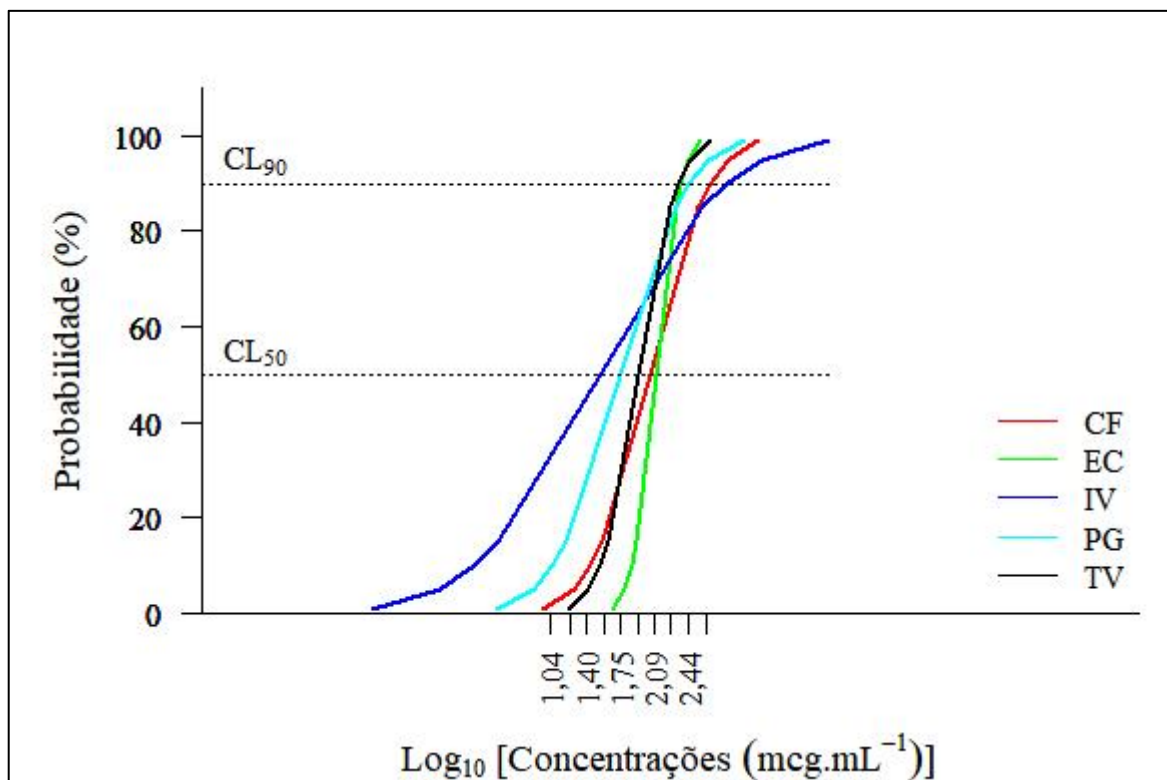


Figura 8. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem no tempo 48h dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (CF), *Eugenia caryophyllus* (EC), *Illicium verum* (IV), *Pelargonium graveolens* (PG) e *Thymus vulgaris* (TV).

Na Figura 9 pode ser observada a comparação entre as CL_{50} encontradas. O menor e maior valor de CL_{50} foi observado após o tratamento com os OEs de *I. verum* e *E. caryophyllus*, respectivamente.

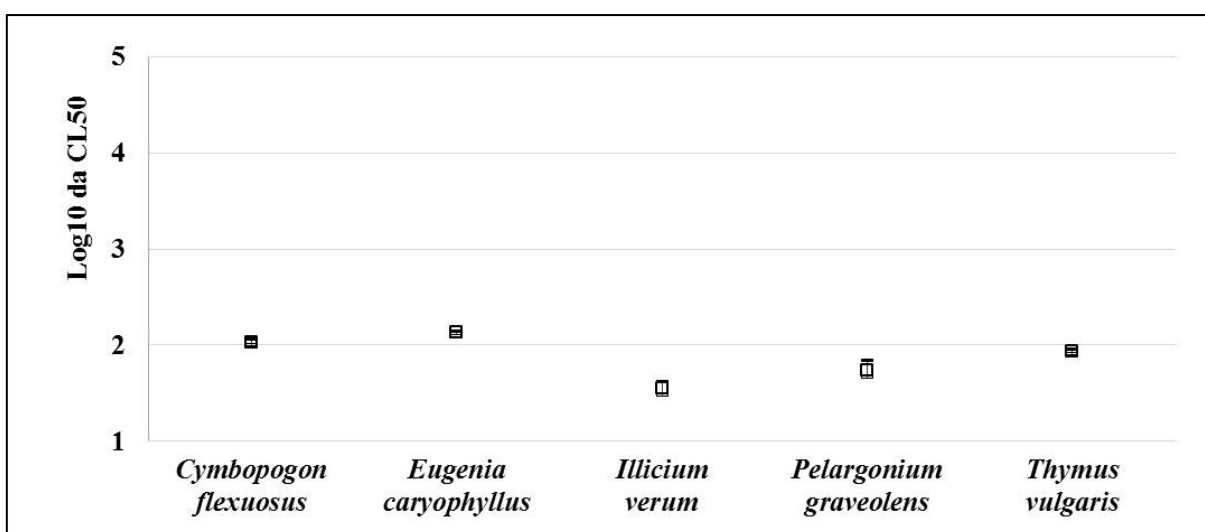


Figura 9. Comparação de CL_{50} em Log_{10} dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem após 48h de incubação. CL_{50} : concentração letal 50; CL_{90} : concentração letal 90.

4.2 Teste *in vitro* de Eclodibilidade de Ovos de Cepa Selvagem

Os 5 OEs utilizados no teste anterior foram usados neste teste. Todos os OEs pesquisados foram capazes de diminuir a taxa de eclodibilidade de ovos *C. elegans* na faixa de concentração testada.

O OE de *P. graveolens* foi o único a resultar em 100% de atividade na concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os OEs de *E. caryophyllus* e *C. flexuosus* resultaram em 96,9% de atividade na concentração de 764,2 e 861,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O OE de *I. verum* resultou em 86,0% de atividade em 406,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, já o OE de *T. vulgaris* resultou em atividade de 74,6% em 369,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas Tabelas 6 e 7 são apresentados os resultados de eclodibilidade de ovos de *C. elegans* para a faixa de concentração dos OEs.

Tabela 6. Eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem tratados com os óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*, *Eugenia caryophyllus* e *Illicium verum* em diferentes concentrações após 24h.

Óleo Essencial	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média da % de Ovos Não-eclodidos
		Número de Ovos	Número de Ovos Não-eclodidos	% de Ovos Não-eclodidos	Número de Ovos	Número de Ovos Não-eclodidos	% de Ovos Não-eclodidos	
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	0	105	2	1,9	88	1	1,1	1,5 \pm 0,5
	19,8	116	25	21,6	94	30	31,9	26,7 \pm 7,3
	30,1	157	44	28,0	127	41	32,3	30,2 \pm 3,0
	45,8	115	55	47,8	97	49	50,5	49,2 \pm 1,9
	69,6	236	116	49,2	192	102	53,1	51,1 \pm 2,8
	105,9	226	138	61,1	187	117	62,6	61,8 \pm 1,1
	161,1	201	150	74,6	163	127	77,9	76,3 \pm 2,3
	245	136	119	87,5	136	123	90,4	89,0 \pm 2,1
	372,5	155	139	89,7	125	119	95,2	92,4 \pm 3,9
	566,6	147	128	87,1	135	123	91,1	89,1 \pm 2,9
861,6	160	155	96,9	130	126	96,9	96,9 \pm 0,0	
<i>Eugenia caryophyllus</i>	0	105	2	1,9	88	1	1,1	1,5 \pm 0,5
	31,4	119	10	8,4	103	6	5,8	7,1 \pm 1,8
	44,8	132	11	8,3	108	7	6,5	7,4 \pm 1,3
	63,9	109	16	14,7	90	13	14,4	14,6 \pm 0,2
	91,1	123	22	17,9	111	22	19,8	18,9 \pm 1,4
	129,9	122	25	20,5	118	25	21,2	20,8 \pm 0,5
	185,5	83	44	53,0	66	37	56,1	54,5 \pm 2,2
	263,9	87	77	88,5	87	78	89,7	89,1 \pm 0,8
	376,2	97	86	88,7	79	72	91,1	89,9 \pm 1,8
	536,2	119	114	95,8	98	95	96,9	96,4 \pm 0,8
764,2	106	103	97,2	87	84	96,6	96,9 \pm 0,4	
<i>Illicium verum</i>	0	213	0	0,0	268	2	0,7	0,4 \pm 0,5
	11,4	86	21	24,4	136	36	26,5	25,4 \pm 1,5
	16,9	78	18	23,1	129	29	22,5	22,8 \pm 0,4
	25,2	88	29	33,0	170	54	31,8	32,4 \pm 0,8
	37,5	83	20	24,1	86	24	27,9	26,0 \pm 2,7
	55,8	80	22	27,5	130	34	26,2	26,8 \pm 1,0
	83,1	115	35	30,4	190	58	30,5	30,5 \pm 0,1
	123,6	109	28	25,7	180	42	23,3	24,5 \pm 1,7
	183,9	122	33	27,0	202	54	26,7	26,9 \pm 0,2
	273,5	82	66	80,5	132	110	83,3	81,9 \pm 2,0
406,9	94	87	92,6	188	164	87,2	89,9 \pm 3,8	

D1: primeiro dia de bioensaio; D2: segundo dia de bioensaio.

Tabela 7. Eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem tratados com os óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* e *Thymus vulgaris* em diferentes concentrações após 24h.

Óleo Essencial	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média da % de Ovos Não-eclodidos
		Número de Ovos	Número de Ovos Não-eclodidos	% de Ovos Não-eclodidos	Número de Ovos	Número de Ovos Não-eclodidos	% de Ovos Não-eclodidos	
<i>Pelargonium graveolens</i>	0	213	0	0,0	268	2	0,7	0,4 ± 0,5
	5	247	10	4,0	203	9	4,4	4,2 ± 0,3
	6,5	208	14	6,7	170	13	7,6	7,2 ± 0,6
	8	247	23	9,3	203	20	9,9	9,6 ± 0,4
	11	214	19	8,9	176	15	8,5	8,7 ± 0,3
	14	235	46	19,6	192	39	20,3	19,9 ± 0,5
	18	233	83	35,6	191	68	35,6	35,6 ± 0,0
	21	196	189	96,4	160	155	96,9	96,7 ± 0,3
	30	214	214	100,0	175	175	100,0	100,0 ± 0,0
	39	215	215	100,0	170	170	100,0	100,0 ± 0,0
50	231	231	100,0	188	188	100,0	100,0 ± 0,0	
<i>Thymus vulgaris</i>	0	105	2	1,9	88	1	1,1	1,5 ± 0,5
	14,4	169	53	31,4	139	49	35,3	33,3 ± 2,8
	20,7	176	55	31,3	145	51	35,2	33,2 ± 2,8
	29,7	182	62	34,1	148	56	37,8	36,0 ± 2,7
	42,6	165	52	31,5	135	48	35,6	33,5 ± 2,9
	61,1	145	60	41,4	120	54	45,0	43,2 ± 2,6
	87,5	193	73	37,8	158	66	41,8	39,8 ± 2,8
	125,5	225	91	40,4	184	80	43,5	42,0 ± 2,1
	179,8	213	106	49,8	174	90	51,7	50,7 ± 1,4
	257,7	184	118	64,1	152	102	67,1	65,6 ± 2,1
369,3	165	123	74,5	135	106	78,5	76,5 ± 2,8	

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio.

Os pontos aberrantes foram retirados e foi realizada a análise de probit utilizando a soma dos dados brutos nos dois dias estudados a fim de determinar a CI_{50} e CI_{90} dos diferentes OEs. Os dados obtidos a partir desta análise para os diferentes OEs frente a ovos de *C. elegans* após 24h de exposição são descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a ovos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem após 24h de incubação.

Óleo Essencial	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$IC_{95\%}$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CI_{90} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$IC_{95\%}$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intercepto	Slope	R ²	X ²
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	59,71	53,44 - 66,07	417,84	360,32 - 502,26	2,3126	1,5130	0,8011	0,9998
<i>Eugenia caryophyllus</i>	160,08	150,37 - 170,59	405,79	367,83 - 454,05	-1,9931	3,1724	0,8822	1
<i>Illicium verum</i>	166,93	141,16 - 202,44	3741,19	2310,90 - 7034,60	2,8908	0,9489	0,8982	1
<i>Pelargonium graveolens</i>	16,20	15,74 - 16,67	28,15	26,95 - 29,53	-1,4607	5,3412	0,8797	1
<i>Thymus vulgaris</i>	125,34	105,00 - 153,87	8312,10	4162,09 - 21808,76	3,5238	0,7035	0,9778	1

CI₅₀: concentração inibitória 50; **CI₉₀:** concentração inibitória 90; **IC_{95%}:** intervalo de confiança a 95%; **Intercepto:** intercepto da curva; **Slope:** coeficiente angular; **R²:** coeficiente de determinação; **X²:** chi-quadrado.

A atividade ovicida pode ser comparada através do valor de CI_{50} , menores valores indicam maior atividade. Sendo assim, o OE de *P. graveolens* resultou em valores de CI_{50} e CI_{90} 16,20 e 28,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *C. flexuosus* resultou em valores de

CI₅₀ e CI₉₀ de 59,71 e 419,84 µg.mL⁻¹, respectivamente. O OE de *E. caryophyllus* resultou em valores de CI₅₀ e CI₉₀ 160,08 e 405,79 µg.mL⁻¹, respectivamente. O OE de *T. vulgaris* resultou em valores de CI₅₀ e CI₉₀ 125,34 e 8312,10 µg.mL⁻¹, respectivamente. O OE de *I. verum* resultou em valores de CI₅₀ e CI₉₀ 166,93 e 3741,19 µg.mL⁻¹, respectivamente. A representação gráfica das análises de probits podem ser verificadas na Figura 10.

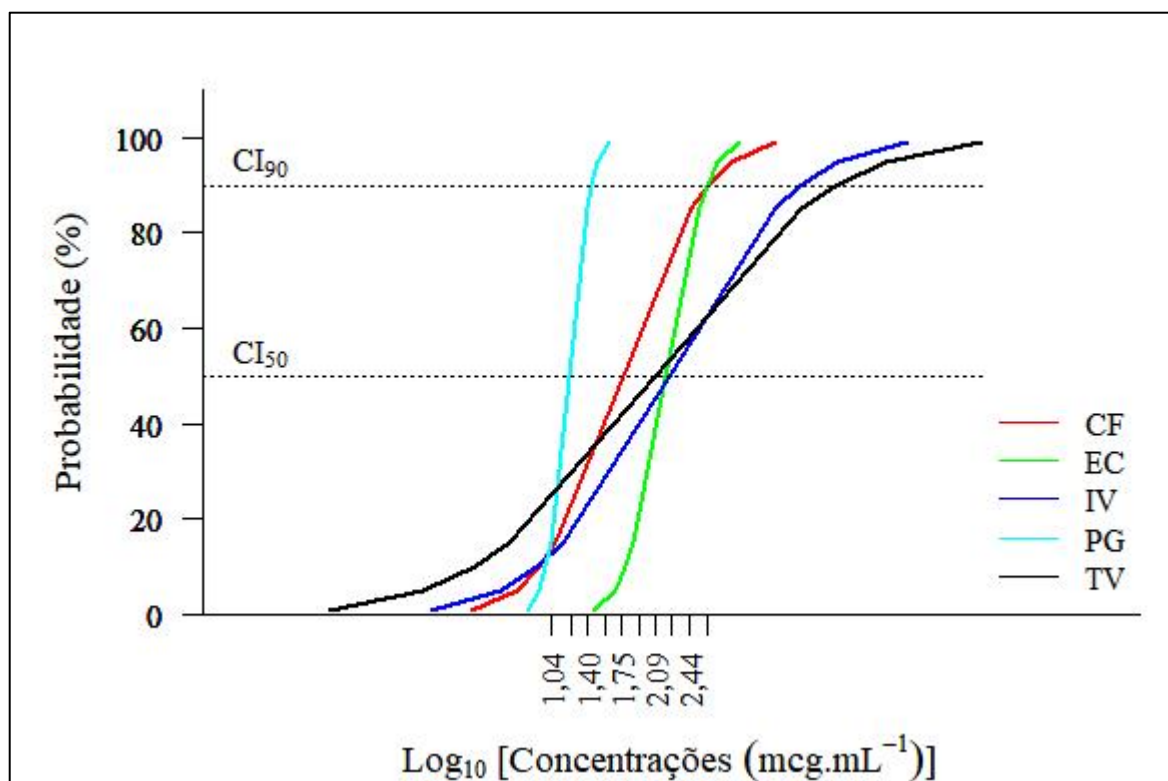


Figura 10. Curva de concentração - probabilidade de não-eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem no tempo 24h dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (CF), *Eugenia caryophyllus* (EC), *Illicium verum* (IV), *Pelargonium graveolens* (PG) e *Thymus vulgaris* (TV).

Em comparação com os resultados encontrados na análise da letalidade em adultos de cepa selvagem, quando submetidos a exposição pelo OEs de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* os ovos de *C. elegans* resultaram em menor susceptibilidade com diminuição nos valores de slope, aumentando, assim, os valores de CI₅₀ e CI₉₀. O mesmo ocorreu com o OE de *I. verum*, porém os valores de CI₉₀ diminuíram. Apesar do valor de slope resultar em diminuição, os valores de CI₅₀ e CI₉₀ de ovos de *C. elegans* em contato com o OE de *C. flexuosus* também diminuíram. Enquanto, na exposição destes ovos de *C. elegans* com OE de *P. graveolens*, a susceptibilidade foi maior, resultando, ainda, diminuições consideráveis nos valores de CI₅₀ e CI₉₀ em relação a toxicidade em adultos.

Na Figura 11 é mostrado um gráfico de comparação entre as CI₅₀. É possível observar que OE de *P. graveolens* resultou em menor valor de CI₅₀. O maior valor de CI₅₀ foi observado após o tratamento com os OEs de *I. verum*.

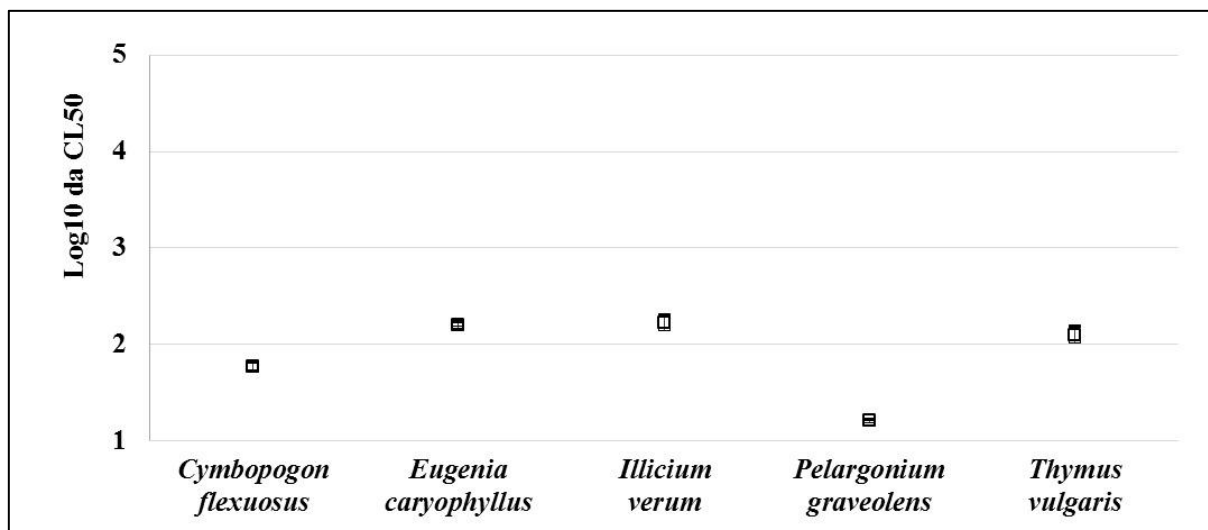


Figura 11. Comparação de CL_{50} em Log_{10} dos diferentes óleos essenciais frente a ovos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem após 24h de incubação. CL_{50} : concentração letal 50; CL_{90} : concentração letal 90.

4.3 Teste de Postura de Ovos de Cepa Selvagem

Os mesmos OEs do teste anterior foram utilizados neste teste. A toxicidade reprodutiva e a diminuição do número total de ovos pelo tratamento com OEs foi observada quando os indivíduos adultos foram cultivados na presença ou ausência de tratamento contínuo com diferentes OEs. Exceto para o OE de *P. graveolens* que não diferiu entre os indivíduos tratados e controle condições experimentais (Tabela 9).

Tabela 9. Análise do teste *in vitro* de postura de ovos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem tratados com óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*, *Eugenia caryophyllus*, *Illicium verum*, *Pelargonium graveolens* e *Thymus vulgaris* após 96h.

		Óleo Essencial					
		Controle	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	<i>Eugenia caryophyllus</i>	<i>Illicium verum</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
D1	Ovos/Indivíduos	152,6	66,4	88,1	63,3	200,4	85,1
	% de Inibição de Postura	0,0	56,5	42,3	58,5	-31,3	44,2
D2	Ovos/Indivíduos	142,8	78,3	83,3	66,1	128,2	91,5
	% de Inibição de Postura	0,0	45,2	41,7	53,7	10,2	36,0
D3	Ovos/Indivíduos	150,2	66,5	80,6	74,3	179,3	81,4
	% de Inibição de Postura	0,0	55,7	46,3	50,5	-19,3	45,8
Média	% de Inibição de Postura	0 ± 0,0	52,5 ± 6,3	43,4 ± 2,5	54,3 ± 4,0	-13,5 ± 21,4	42,0 ± 5,3

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio; **D3:** terceiro dia de bioensaio.

Em geral, os tratamentos com OEs diminuíram significativamente o número total de ovos postos por indivíduo após 96h de exposição. A atividade sob a ovoposição foi semelhante para os OEs de *C. flexuosus*, *E. caryophyllus*, *I. verum* e *T. graveolens*. O OE de *I. verum* resultou em 54,3% de atividade na inibição da postura de ovos em 11,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, O OE de *C. flexuosus* resultou em 52,5% de atividade na inibição da postura de ovos em 19,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, O OE de *E. caryophyllus* resultou em 43,4% de atividade na inibição da postura de ovos em 31,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, O OE de *T. vulgaris* resultou em 42,0% de atividade na inibição da

postura de ovos em $14,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O OE de *P. graveolens* não demonstrou atividade na inibição de postura em $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 12).

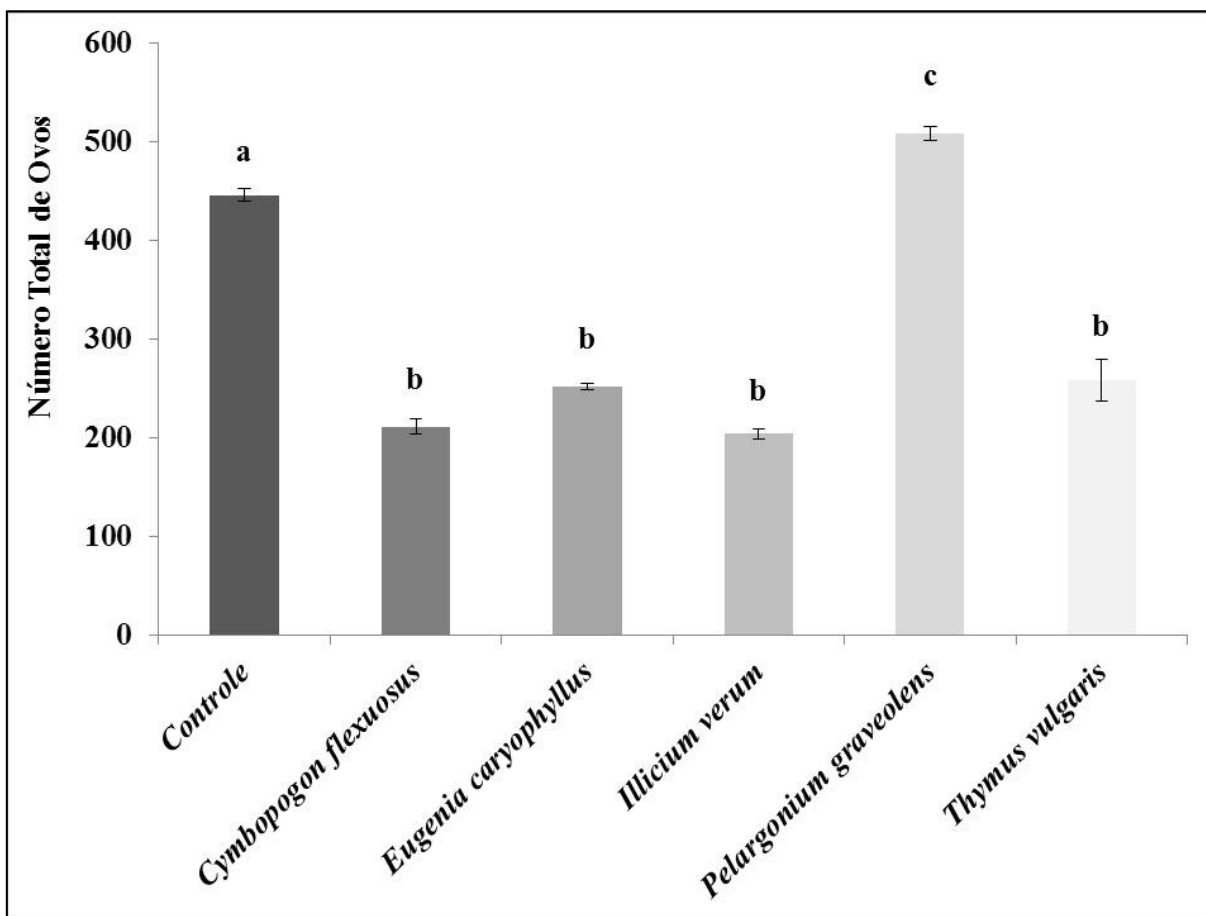


Figura 12. Comparação dos diferentes óleos essenciais frente a postura de ovos de *Caenorhabditis elegans* de cepa selvagem após 96h de incubação.

4.4 Teste *in vitro* de Letalidade de Adultos de Cepas Resistentes

Com base nos testes *in vitro* de letalidade em adultos de *C. elegans* de cepa selvagem, os três OEs que resultaram em menor CL_{50} foram utilizados neste estudo, sendo eles: OE de *I. verum*, *P. graveolens* e *T. vulgaris*.

4.4.1 Cepa Resistente à Ivermectina

O OE de *T. vulgaris* resultou em 100% de atividade em $369,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o OE de *I. verum* resultou em 98,6% de atividade em $406,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já o OE de *P. graveolens* resultou em 26,9% de atividade em $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na Tabela 10 são apresentados os resultados de mortalidade de adultos de *C. elegans* de cepa resistente à ivermectina para a faixa de concentração dos OEs.

Tabela 10. Mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente à ivermectina tratados com os óleos essenciais de *Illicium verum*, *Pelargonium graveolens* e *Thymus vulgaris* em diferentes concentrações após 48h.

Óleo Essencial	Concentração (µg.mL ⁻¹)	D1			D2			Média da % de Mortalidade
		Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	
<i>Illicium verum</i>	0	82	0	0,0	82	0	0,0	0,0 ± 0,0
	11,4	104	24	23,1	96	31	32,3	27,7 ± 6,5
	16,9	78	26	33,3	107	27	25,2	29,3 ± 5,7
	25,2	93	22	23,7	104	38	36,5	30,1 ± 9,1
	37,5	110	47	42,7	144	72	50,0	46,4 ± 5,1
	55,8	66	47	71,2	116	70	60,3	65,8 ± 7,7
	83,1	101	69	68,3	108	80	74,1	71,2 ± 4,1
	123,6	113	79	69,9	111	92	82,9	76,4 ± 9,2
	183,9	107	98	91,6	90	78	86,7	89,1 ± 3,5
	273,5	74	71	95,9	106	97	91,5	93,7 ± 3,1
406,9	67	67	100,0	76	74	97,4	98,7 ± 1,9	
<i>Pelargonium graveolens</i>	0	81	1	1,2	68	2	2,9	2,1 ± 1,2
	5	72	15	20,8	90	18	20,0	20,4 ± 0,6
	6,5	64	7	10,9	74	14	18,9	14,9 ± 5,6
	8	76	11	14,5	79	18	22,8	18,6 ± 5,9
	11	74	10	13,5	80	14	17,5	15,5 ± 2,8
	14	60	11	18,3	64	7	10,9	14,6 ± 5,2
	18	78	20	25,6	81	13	16,0	20,8 ± 6,8
	21	105	30	28,6	60	10	16,7	22,6 ± 8,4
	30	74	16	21,6	27	9	33,3	27,5 ± 8,3
	39	71	17	23,9	32	6	18,8	21,3 ± 3,7
50	59	14	23,7	20	6	30,0	26,9 ± 4,4	
<i>Thymus vulgaris</i>	0	82	0	0,0	82	0	0,0	0,0 ± 0,0
	14,4	77	10	13,0	42	9	21,4	17,2 ± 6,0
	20,7	91	19	20,9	59	14	23,7	22,3 ± 2,0
	29,7	57	11	19,3	77	22	28,6	23,9 ± 6,6
	42,6	85	20	23,5	61	21	34,4	29,0 ± 7,7
	61,1	102	29	28,4	77	25	32,5	30,4 ± 2,9
	87,5	75	37	49,3	91	43	47,3	48,3 ± 1,5
	125,5	81	53	65,4	90	66	73,3	69,4 ± 5,6
	179,8	71	59	83,1	82	73	89,0	86,1 ± 4,2
	257,7	72	69	95,8	84	82	97,6	96,7 ± 13
369,3	112	112	100,0	80	80	100,0	100,0 ± 0,0	

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio.

Os pontos aberrantes foram retirados e foi realizada a análise de probit utilizando a soma dos dados brutos nos dois dias estudados a fim de determinar a CL₅₀ e CL₉₀ dos diferentes OEs. Os dados obtidos a partir desta análise para os diferentes OEs frente a adultos de *C. elegans* resistentes à ivermectina após 48h de exposição são descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente à ivermectina após 48h de incubação.

Óleo Essencial	CL ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CL ₉₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intercepto	Slope	R ²	X ²
<i>Illicium verum</i>	37,9	33,62 - 41,74	220,57	185,87 - 270,64	2,3728	1,6678	0,8659	0,9987
<i>Pelargonium graveolens</i>	17100,49	N.I.	305128600,0	N.I.	3,7240	0,3014	0,6108	0,9606
<i>Thymus vulgaris</i>	66,45	60,52 - 72,75	253,51	219,73 - 300,29	0,9833	2,2039	0,9392	1

CL₅₀: concentração letal 50; **CL₉₀:** concentração letal 90; **IC95%:** intervalo de confiança a 95%; **Intercepto:** intercepto da curva; **Slope:** coeficiente angular; **R²:** coeficiente de determinação; **X²:** chi-quadrado; **N.I.:** não informado.

A atividade nematicida em cepas resistentes à ivermectina pode ser comparada através do valor de CL₅₀, menores valores indicam maior atividade. Sendo assim, o OE de *I. verum* resultou em valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 37,59 e 220,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *T. vulgaris* resultou em valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 66,45 e 253,51 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *P. graveolens* resultou em valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 17100,49 e 305128600,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A representação gráfica das análises de probits podem ser verificadas na Figura 13. Devido ao alto valor de CLs do OE de *P. graveolens*, não foi possível plotar o gráfico.

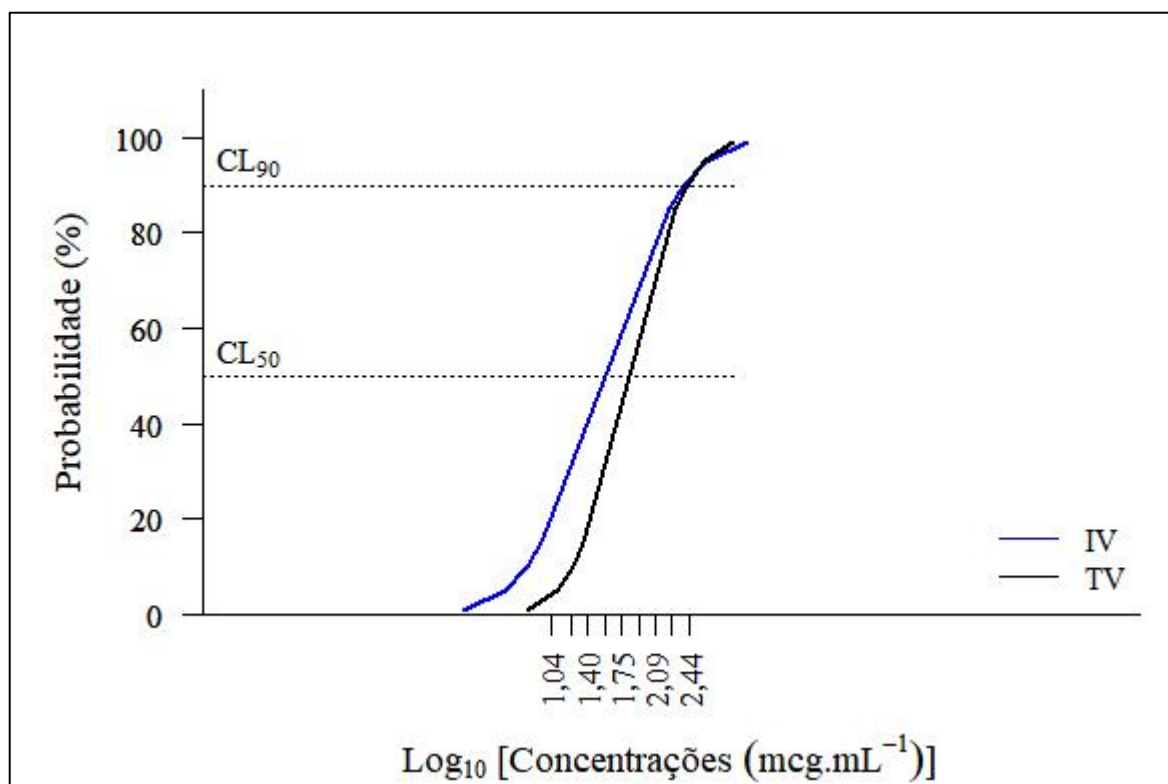


Figura 13. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente à ivermectina no tempo 48h dos óleos essenciais de *Illicium verum* (IV) e *Thymus vulgaris* (TV).

Na Figura 14 é mostrado um gráfico de comparação entre as CL₅₀. O menor valor de CL₅₀ foi observado após o tratamento com o OE de *I. verum*. Enquanto, o OE de *P. graveolens* resultou em maior valor de CL₅₀.

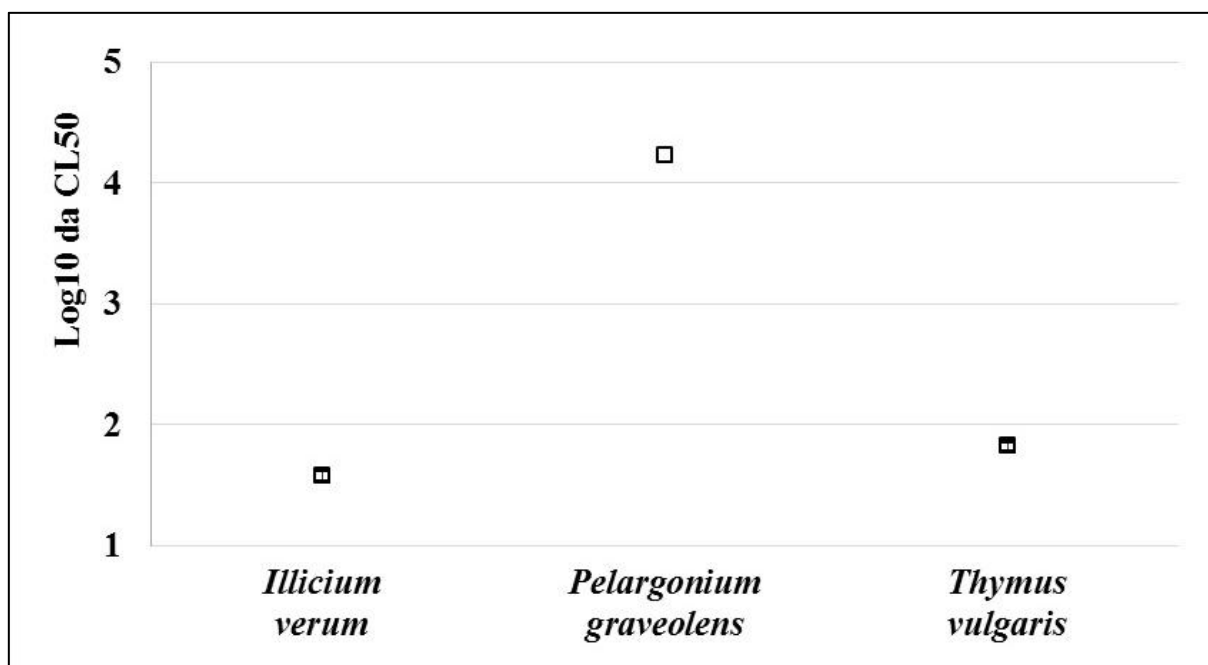


Figura 14. Comparação de CL₅₀ em Log₁₀ dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente à ivermectina após 48h de incubação. CL₅₀: concentração letal 50; CL₉₀: concentração letal 90.

4.4.2 Cepa Resistente ao Albendazol

O OE de *T. vulgaris* resultou em 99% de atividade em 369,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o OE de *I. verum* resultou em 95,1% de atividade em 406,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O OE de *P. graveolens* resultou em 47,9% de atividade em 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas Tabelas 12 e 13 são apresentados os resultados de mortalidade de adultos de *C. elegans* de cepa resistente ao albendazol para a faixa de concentração dos OEs

Tabela 12. Mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao albendazol tratados com o óleo essencial de *Illicium verum* em diferentes concentrações após 48h.

Óleo Essencial	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média da % de Mortalidade
		Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	
<i>Illicium verum</i>	0	105	3	2,9	129	5	3,9	3,4 \pm 0,7
	11,4	73	2	2,7	95	2	2,1	2,4 \pm 0,4
	16,9	62	5	8,1	95	9	9,5	8,8 \pm 1,0
	25,2	64	7	10,9	87	8	9,2	10,1 \pm 1,2
	37,5	76	5	6,6	103	5	4,9	5,7 \pm 1,2
	55,8	84	11	13,1	101	16	15,8	14,5 \pm 1,9
	83,1	58	9	15,5	82	21	25,6	20,6 \pm 7,1
	123,6	70	12	17,1	100	21	21,0	19,1 \pm 2,7
	183,9	70	13	18,6	112	50	44,6	31,6 \pm 18,4
	273,5	81	58	71,6	57	50	87,7	79,7 \pm 11,4
406,9	77	72	93,5	46	45	97,8	95,7 \pm 3,1	

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio.

Tabela 13. Mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao albendazol tratados com os óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* e *Thymus vulgaris* em diferentes concentrações após 48h.

Óleo Essencial	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média da % de Mortalidade
		Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	
<i>Pelargonium graveolens</i>	0	154	0	0,0	155	0	0,0	0,0 \pm 0,0
	5	165	10	6,1	200	25	12,5	9,3 \pm 4,6
	6,5	175	8	4,6	184	32	17,4	11,0 \pm 9,1
	8	198	7	3,5	200	44	22,0	12,8 \pm 13,1
	11	185	11	5,9	164	46	28,0	17,0 \pm 15,6
	14	129	14	10,9	191	45	23,6	17,2 \pm 9,0
	18	204	17	8,3	139	45	32,4	20,4 \pm 17,0
	21	208	30	14,4	166	67	40,4	27,4 \pm 18,3
	30	138	17	12,3	172	66	38,4	25,3 \pm 18,4
	39	182	42	23,1	138	84	60,9	42,0 \pm 26,7
50	189	75	39,7	155	87	56,1	47,9 \pm 11,6	
<i>Thymus vulgaris</i>	0	105	3	2,9	129	5	3,9	3,4 \pm 0,7
	14,4	132	33	25,0	91	15	16,5	20,7 \pm 6,0
	20,7	100	14	14,0	121	32	26,4	20,2 \pm 8,8
	29,7	95	19	20,0	125	34	27,2	23,6 \pm 5,1
	42,6	132	26	19,7	109	34	31,2	25,4 \pm 8,1
	61,1	104	17	16,3	90	43	47,8	32,1 \pm 22,2
	87,5	101	52	51,5	124	88	71,0	61,2 \pm 13,8
	125,5	113	95	84,1	107	106	99,1	91,6 \pm 10,6
	179,8	110	107	97,3	90	90	100,0	98,6 \pm 1,9
	257,7	112	109	97,3	117	116	99,1	98,2 \pm 0,3
369,3	93	92	98,9	117	116	99,1	99,0 \pm 0,2	

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio.

Os pontos aberrantes foram retirados e foi realizada a segunda etapa, a análise de probit a fim de determinar a CL_{50} e CL_{90} dos diferentes OEs. Os dados obtidos a partir desta análise para os diferentes OEs frente a adultos de *C. elegans* resistentes ao albendazol após 48h de exposição são descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Análise de probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao albendazol após 48h de incubação.

Óleo Essencial	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CL_{90} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intercepto	Slope	R ²	X ²
<i>Illicium verum</i>	189,84	172,19 - 211,36	611,78	508,25 - 770,64	-7.455	2,5217	0,9775	1
<i>Pelargonium graveolens</i>	73,76	59,71 - 97,35	864,73	514,85 - 1740,59	27.607	1,1988	0,9851	0,9558
<i>Thymus vulgaris</i>	58,98	55,21 - 62,96	168,64	152,59 - 189,05	2.631	2,8088	0,8657	1

CL_{50} : concentração letal 50; **CL_{90} :** concentração letal 90; **IC95%:** intervalo de confiança a 95%; **Intercepto:** intercepto da curva; **Slope:** coeficiente angular; **R²:** coeficiente de determinação; **X²:** chi-quadrado.

A atividade nematicida em cepas resistentes ao albendazol pode ser comparada através do valor de CL_{50} , menores valores indicam maior atividade. Sendo assim, o OE de *T. vulgaris* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} 58,98 e 168,64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *P. graveolens* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} 73,76 e 864,73 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *I. verum* resultou em valores de CL_{50} e CL_{90} de 189,84 e 611,79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A representação gráfica das análises de probits podem ser verificadas na Figura 15.

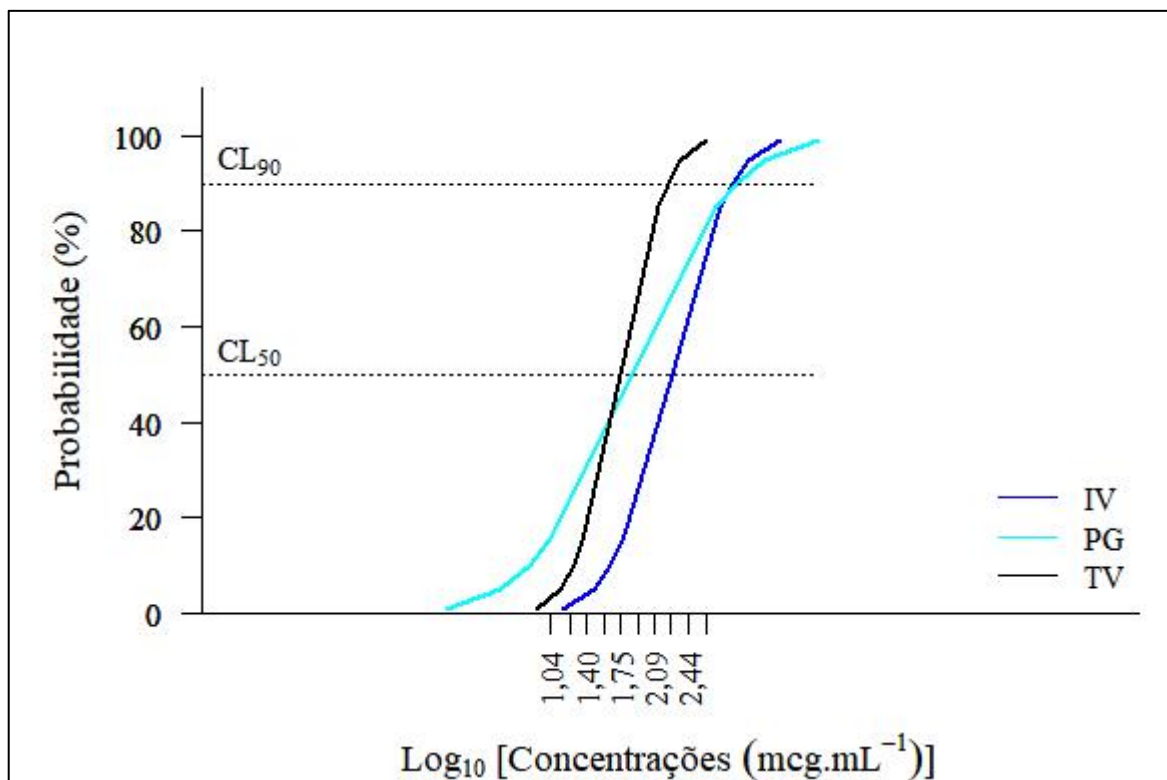


Figura 15. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao albendazol no tempo 48h dos óleos essenciais de *Illicium verum* (IV), *Pelargonium graveolens* (PG) e *Thymus vulgaris* (TV).

Na Figura 16 é mostrado um gráfico de comparação entre as CL₅₀. O menor valor de CL₅₀ foi observado após o tratamento com o OE de *T. vulgaris*. Enquanto, o OE de *I. verum* resultou em maior CL₅₀.

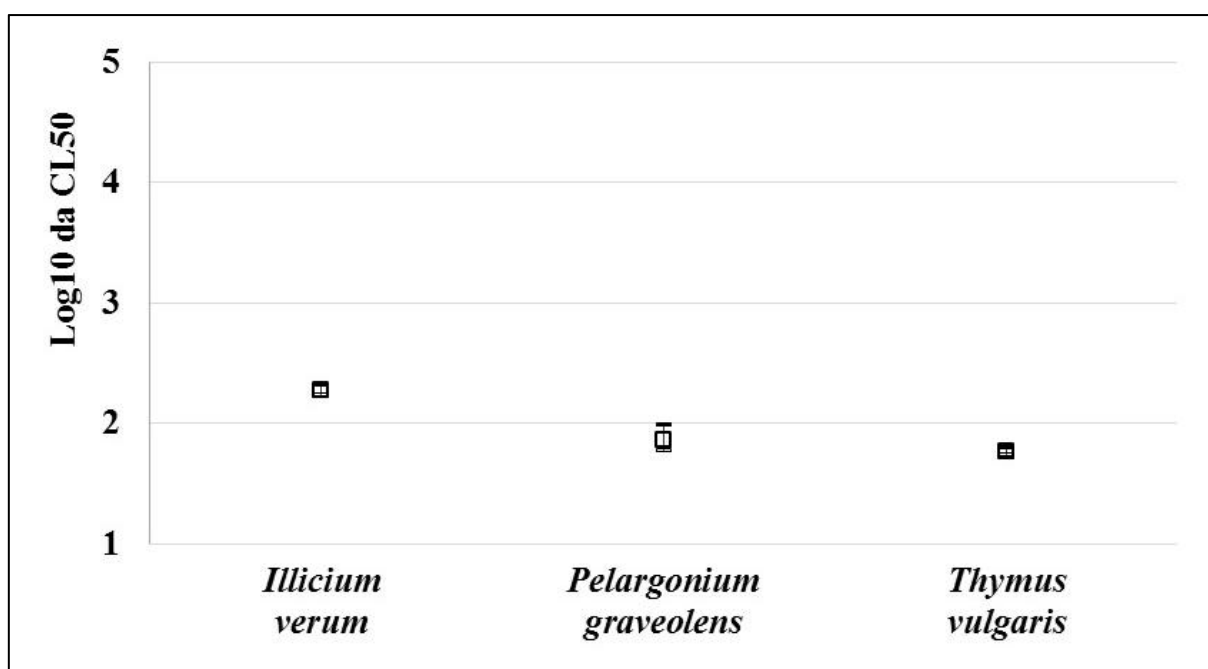


Figura 16. Comparação de CL₅₀ em Log₁₀ dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao albendazol após 48h de incubação. CL₅₀: concentração letal 50; CL₉₀: concentração letal 90.

4.4.3 Cepa Resistente ao Levamisol

O OE de *I. verum* resultou em 100% de atividade em 406,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O OE de *T. vulgaris* resultou em 44,1% de atividade em 369,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O OE de *P. graveolens* resultou em 34,8% de atividade em 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na Tabela 15 são apresentados os resultados de mortalidade de adultos de *C. elegans* de cepa resistente ao levamisol para a faixa de concentração dos OEs.

Tabela 15. Mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao levamisol tratados com o óleo essencial de *Illicium verum*, *Pelargonium graveolens* e *Thymus vulgaris* em diferentes concentrações após 48h.

Óleo Essencial	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média da % de Mortalidade
		Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número de Nematoides Utilizados	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	
<i>Illicium verum</i>	0	105	3	2,9	129	5	3,9	3,4 ± 0,7
	11,4	11	0	0,0	33	3	9,1	4,5 ± 6,4
	16,9	48	4	8,3	37	4	10,8	9,6 ± 1,8
	25,2	41	5	12,2	47	4	8,5	10,4 ± 2,6
	37,5	42	6	14,3	31	1	3,2	8,8 ± 7,8
	55,8	34	8	23,5	71	10	14,1	18,8 ± 6,7
	83,1	30	12	40,0	36	13	36,1	38,1 ± 2,7
	123,6	35	26	74,3	26	17	65,4	69,8 ± 6,3
	183,9	30	19	63,3	35	33	94,3	78,8 ± 21,9
	273,5	45	42	93,3	57	57	100,0	96,7 ± 4,7
406,9	32	32	100,0	34	34	100,0	100,0 ± 0,0	
<i>Pelargonium graveolens</i>	0	154	0	0,0	155	0	0,0	0,0 ± 0,0
	5	165	10	6,1	200	25	12,5	9,3 ± 4,6
	6,5	175	8	4,6	184	32	17,4	11,0 ± 9,1
	8	198	7	3,5	200	44	22,0	12,8 ± 13,1
	11	185	11	5,9	164	46	28,0	17,0 ± 15,6
	14	129	14	10,9	191	45	23,6	17,2 ± 9,0
	18	204	17	8,3	139	45	32,4	20,4 ± 17,0
	21	208	30	14,4	166	67	40,4	27,4 ± 18,3
	30	138	17	12,3	172	66	38,4	25,3 ± 18,4
	39	182	42	23,1	138	84	60,9	42,0 ± 26,7
50	189	75	39,7	155	87	56,1	47,9 ± 11,6	
<i>Thymus vulgaris</i>	0	105	3	2,9	129	5	3,9	3,4 ± 0,7
	14,4	132	33	25,0	91	15	16,5	20,7 ± 6,0
	20,7	100	14	14,0	121	32	26,4	20,2 ± 8,8
	29,7	95	19	20,0	125	34	27,2	23,6 ± 5,1
	42,6	132	26	19,7	109	34	31,2	25,4 ± 8,1
	61,1	104	17	16,3	90	43	47,8	32,1 ± 22,2
	87,5	101	52	51,5	124	88	71,0	61,2 ± 13,8
	125,5	113	95	84,1	107	106	99,1	91,6 ± 10,6
	179,8	110	107	97,3	90	90	100,0	98,6 ± 1,9
	257,7	112	109	97,3	117	116	99,1	98,2 ± 0,3
369,3	93	92	98,9	117	116	99,1	99,0 ± 0,2	

D1: primeiro dia de bioensaio; **D2:** segundo dia de bioensaio.

Os pontos aberrantes foram retirados e foi realizada a análise de probit utilizando a soma dos dados brutos nos dois dias estudados a fim de determinar a CL_{50} e CL_{90} dos diferentes OEs. Os dados obtidos a partir desta análise para os diferentes OEs frente a adultos de *C. elegans* resistentes ao levamisol após 48h de exposição são descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Análise de Probit dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao levamisol após 48h de incubação.

Óleo Essencial	CL ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CL ₉₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intercepto	Slope	R ²	X ²
<i>Illicium verum</i>	92,32	82,65 - 103,43	239,59	203,80 - 293,80	-1,0814	3,0943	0,9218	1
<i>Pelargonium graveolens</i>	249,63	119,35 - 1082,03	40105,39	5386,36 - 2351754,0	3,6072	0,5809	0,9017	0,2768
<i>Thymus vulgaris</i>	1601,79	195226,4 - 5725363,0	195226,4	32343,91 - 5725363,0	3,0311	0,6143	0,9120	0,9886

CL₅₀: concentração letal 50; CL₉₀: concentração letal 90; IC95: intervalo de confiança a 95%; Intercepto: intercepto da curva; Slope: coeficiente angular; R²: coeficiente de determinação; X²: chi-quadrado.

A atividade nematicida em cepas resistentes ao levamisol pode ser comparada através do valor de CL₅₀, menores valores indicam maior atividade. Sendo assim, o OE de *I. verum* resultou em valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 92,32 e 239,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *P. graveolens* resultou em valores de CL₅₀ e CL₉₀ 249,63 e 40105,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de *T. vulgaris* resultou em valores de CL₅₀ e CL₉₀ 1601,79 e 195226,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A representação gráfica das análises de probits podem ser verificadas na Figura 17.

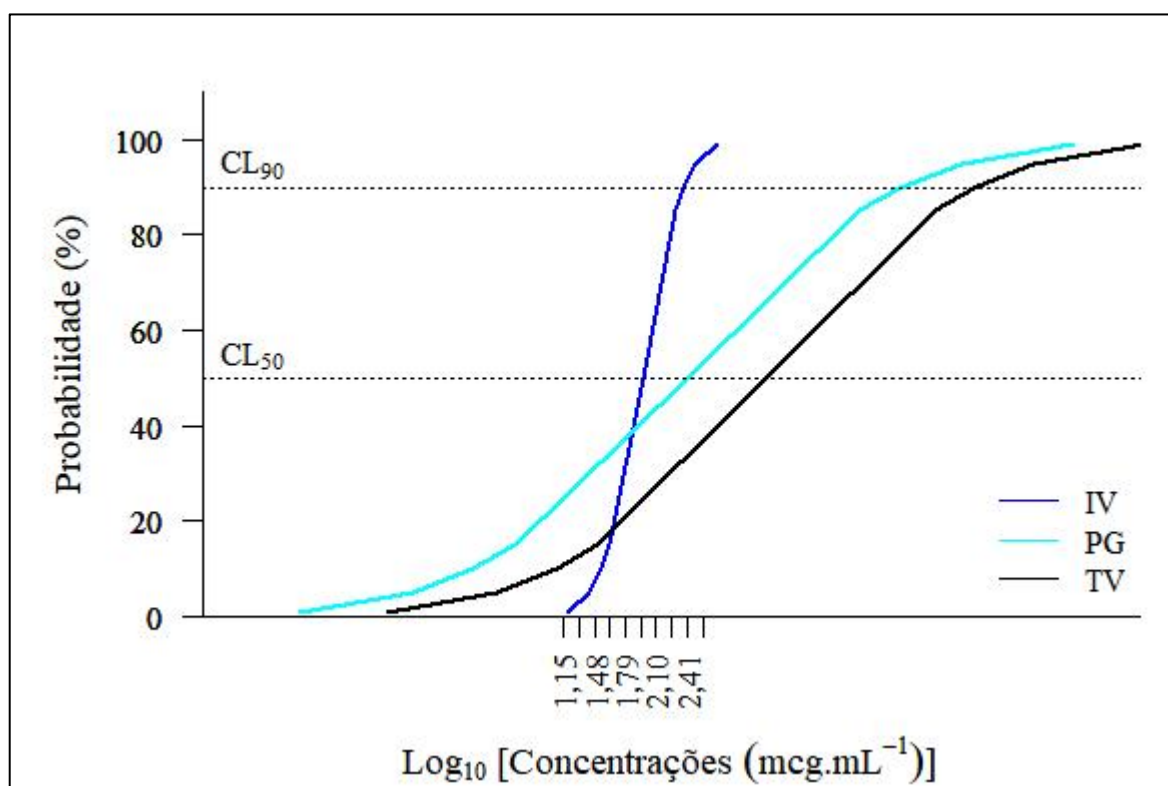


Figura 17. Curva de concentração - probabilidade de mortalidade de adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao levamisol no tempo 48h dos óleos essenciais de *Illicium verum* (IC), *Pelargonium graveolens* (PG) e *Thymus vulgaris* (TV).

Na Figura 18 é mostrado um gráfico de comparação entre as CL₅₀. O menor valor de CL₅₀ foi observado após o tratamento com o OE de *I. verum*. Enquanto, o OE de *T. vulgaris* resultou em maior valores de CL₅₀.

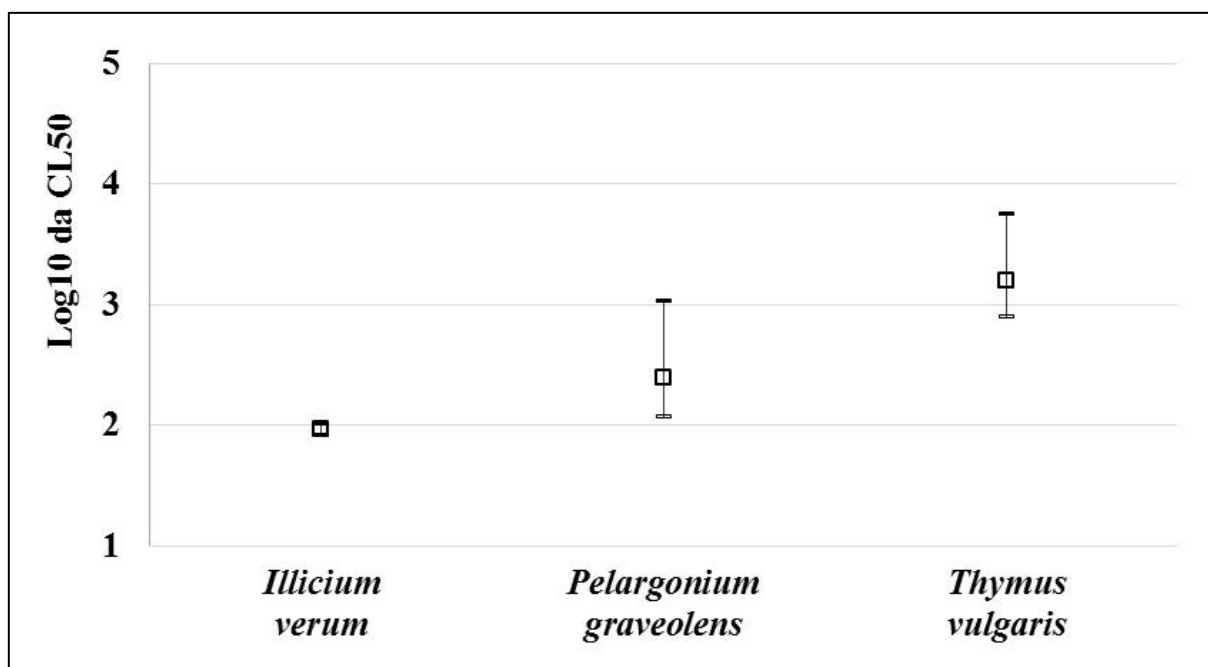


Figura 18. Comparação de CL₅₀ em Log₁₀ dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistente ao levamisol após 48h de incubação. CL₅₀: concentração letal 50; CL₉₀: concentração letal 90.

4.5 Comparação da Letalidade em Adultos dos Óleos Essenciais de Diferentes Cepas

A resistência ao OE de *I. verum* foi observada em cepas resistentes ao albendazol e levamisol. Enquanto, a resistência ao OE de *P. graveolens* foi observada em cepas resistentes à ivermectina e ao levamisol. Já a resistência ao OE de *T. vulgaris* apenas foi observada em cepa resistente ao levamisol (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação do fator de resistência e status de susceptibilidade dos bioensaios dos diferentes óleos essenciais frente a adultos de *Caenorhabditis elegans* de cepa resistentes e selvagem após 48h de incubação.

Óleo Essencial	IVM-Resistente		ABZ-Resistente		LEV-Resistente	
	FR	Status	FR	Status	FR	Status
<i>Illicium verum</i>	1,06	S	5,34	R	2,6	R
<i>Pelargonium graveolens</i>	313,37	R	1,35	S	4,57	R
<i>Thymus vulgaris</i>	0,77	S	0,69	S	18,66	R

FR: fator de resistência (CL₅₀ em cepa resistente ÷ CL₅₀ em cepa selvagem) ; **Status da resistência:** R = resistente; S = suscetível; n.a.: não aplicável.

4.6 Linha Analítica de Triagem

Os testes permitiram fazer inferências acerca da atividade anti-helmíntica dos OEs. Primeiramente, foram utilizados 7 OEs com base em uma faixa de concentração inicial, a fim de determinar uma faixa equidistante de concentrações com base nos valores de CL₁₀ e CL₉₀ através do teste nematocida em adultos de *C. elegans* de cepa selvagem.

Os 5 OEs que resultaram em menor faixa foram utilizados em um novo teste nematocida em adultos e teste de eclodibilidade de ovos de *C. elegans* de cepa selvagem com o propósito de determinar CL₅₀, CI₅₀, CL₉₀ e CI₉₀. Também foi realizado teste de postura de

ovos com estes OEs para avaliar a taxa de reprodutibilidade dos indivíduos adultos de *C. elegans* de cepa selvagem.

Por fim, em cepas resistentes às principais classes de antiparasitários do mercado veterinário, ivermectina, albendazol e levamisol, foram realizados novos testes nematicidas em adultos de *C. elegans* com os 3 OEs que resultaram em menor CL₅₀ em cepa selvagem. Desta forma, foi possível estimar o fator de resistência dos OEs em comparação com a atividade em cepa selvagem. De modo geral, o OE de *T. vulgaris* apresentou valores de susceptibilidade mais satisfatórios, sendo, portanto, considerado o melhor fitoativo deste estudo (Tabela 18).

Tabela 18. Linha analítica de triagem de óleos essenciais utilizando o *Caenorhabditis elegans*.

Óleo Essencial	Testes						
	Atividade Nematicida em Adultos N2	Atividade Nematicida em Adultos N2	Eclodibilidade de Ovos N2	Postura de Ovos de Adultos N2	Atividade Nematicida em Adultos DA1316	Atividade Nematicida em Adultos CB3474	Atividade Nematicida em Adultos CB211
	Faixa Inicial $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CL ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CI ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	% de Inibição de Postura	CL ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CL ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CL ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	19,8 - 861,6	107,51	59,71	52,5	-	-	-
<i>Eugenia caryophyllus</i>	31,4 - 764,2	135,87	160,08	43,4	-	-	-
<i>Illicium verum</i>	11,4 - 406,9	35,56	166,93	54,3	37,9	189,84	92,32
<i>Mentha piperita</i>	192,4 - 4091,9922	-	-	-	-	-	-
<i>Mentha spicata</i>	28,1 - 181175,7	-	-	-	-	-	-
<i>Pelargonium graveolens</i>	5 - 50	54,57	16,20	-13,5	17100,49	73,76	249,63
<i>Thymus vulgaris</i>	14,4 - 369,3	85,84	125,34	42,0	66,45	59,98	1601,79

CL₅₀: concentração letal 50; **N2:** cepa selvagem; **DA1316:** cepa resistente à ivermectina; **CB3474:** cepa resistente ao albendazol; **CB211:** cepa resistente ao levamisol.

5 DISCUSSÃO

A atividade anti-helmíntica dos OEs aqui estudados ainda é pouco conhecida. Porém, a pesquisa destes OEs é bem difundida em outros organismos e serão utilizados para fins de comparação com o presente trabalho.

Para efeitos de comparação, as concentrações empregadas em outros estudos foram transformadas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de forma que fosse possível realizar um paralelo com os resultados encontrados.

5.1 Atividade em Adultos e Ovos de *Caenorhabditis elegans*

5.1.1 Atividade do Óleo Essencial de *Cymbopogon flexuosus*

O OE de *C. flexuosus* resultou em valores de CL_{50} de $107,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em adultos de *C. elegans* de cepa selvagem; em CI_{50} de $59,71 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na eclosão de ovos de *C. elegans* de cepa selvagem e inibiu a reprodução de adultos de *C. elegans* de cepa selvagem em 52,5% na concentração $19,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, em ordem crescente de atividade estão: atividade na inibição da ovoposição > atividade ovicida > atividade adulticida, sendo estas atribuídas aos componentes majoritários geranaial, neral e geraniol.

A atividade inseticida do OE foi estudada por Vera et al. (2014), em larvas entre o terceiro e quarto ínstar de *Aedes aegypti*, mosquito vetor de arboviroses, com valor de CL_{50} de $14,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, após 48h de exposição, sendo geranial, neral e acetato de geraniol os componentes majoritários. Castillo et al. (2017) avaliou outros estádios do desenvolvimento de *A. aegypti*, a eficácia pupicida foi de 42% na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a eficácia adulticida foi de 96,3% na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a inibição na ovoposição foi de 95% na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo o neral, geranial, geraniol e acetato de geranial responsáveis por estas atividades. Ainda em adultos de *A. aegypti*, o OE de *C. flexuosus* também resultou em atividade com valores de CL_{50} de $12.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, após uma exposição de 60 min. Nos mesmos parâmetros, desta vez contra adultos de *Culex quinquefasciatus*, mosquito vetor da filariose, foram resultados valores de CL_{50} e CL_{95} de 5.000 e $9.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (MAKHAIK, et al., 2004).

Portanto, adultos de *C. elegans* de cepa selvagem foram mais susceptíveis ao tratamento com o OE de *C. flexuosus* que adultos e pupas de *A. aegypti* e adultos de *C. quinquefasciatus*, porém menos susceptíveis que larvas entre o terceiro e quarto ínstar *A. aegypti*. A taxa reprodutiva de indivíduos adultos e a ação ovicida em *C. elegans* também foram mais susceptíveis que em *A. Aegypti* sob a exposição do OE. A diferença encontrada pode ser explicada devido a diferença de espécies testadas, fases de desenvolvimento, metodologia e componentes majoritários, concentrações utilizadas e tempo de exposição.

5.1.2 Atividade do Óleo Essencial de *Eugenia caryophyllus*

O OE de *E. caryophyllus* resultou em valores de CL_{50} de $135,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em adultos de *C. elegans* de cepa selvagem; em CI_{50} de $160,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na eclosão de ovos de *C. elegans* de cepa selvagem e inibiu a reprodução de adultos de *C. elegans* de cepa selvagem em 42% na concentração $41,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, em ordem crescente de atividade estão: atividade na inibição da ovoposição > atividade adulticida > atividade ovicida, sendo estas atribuídas ao eugenol.

A atividade inseticida do OE de *E. caryophyllus* foi demonstrada contra larvas do quarto ínstar de *C. quinquefasciatus*, com valores de CL_{50} de $198,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$,

respectivamente, após 24h de exposição (PITASAWAT et al., 1998). Já a atividade acaricida foi avaliada contra *Psoroptes cuniculi*, um ectoparasita comum em coelhos, onde 100% dos indivíduos morreram após 24h de exposição do OE na concentração de $1.600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo esta atividade atribuída ao eugenol, β -cariofileno e acetato de eugenol. (FICHI et al., 2007). Esta atividade também foi avaliada contra *Bovicola (Werneckiella) ocellatus*, um piolho mastigador, e resultou em valor de CL_{50} de $12.300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 300 min de exposição (TALBERT; WALL, 2012).

Portanto, adultos de *C. elegans* de cepa selvagem foram mais susceptíveis ao tratamento com o OE de *E. caryophyllus* que adultos de *P. cuniculi* e *B. ocellatus*. Em relação a larvas de *C. quinquefasciatus*, o *C. elegans* também mostrou-se mais susceptível. Devido a baixa amplitude entre as CLs os achados com *C. quinquefasciatus* corroboram com o presente estudo, pois espera-se que em um maior tempo de exposição ao OE os valores de CLs diminuam até que alcance platô. A discrepância encontrada pode ocorrer devido aos mesmos fatores já explicitados.

5.1.3 Atividade do Óleo Essencial de *Illicium verum*

O OE de *I. verum* resultou em valores de CL_{50} de $35,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em adultos de *C. elegans* de cepa selvagem; em CI_{50} de $166,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na eclosão de ovos de *C. elegans* de cepa selvagem e inibiu a reprodução de adultos de *C. elegans* de cepa selvagem em 54,3% na concentração $31,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, em ordem crescente de atividade estão: atividade na inibição da ovoposição > atividade adulticida > atividade ovicida, sendo estas atribuídas ao trans-anetol. Tanto no teste de letalidade de adultos e teste de postura de ovos, os indivíduos de *C. elegans* da cepa selvagem, foram mais susceptíveis a este OE em relação aos outros avaliados.

Davuluri et al. (2019) avaliou a atividade adulticida e ovicida do extrato hidroalcoólico do OE de *I. verum* diluído inicialmente em DMSO e posteriormente em tampão fosfato nas soluções de trabalho. Contra adultos de *H. contortus* coletados do abomaso de ovelhas naturalmente infectadas o valor de CL_{50} encontrado após 12h de exposição ao OE foi de $61,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já a CI_{50} para inibição da eclosão de ovos foi de $3848 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24h. No presente estudo, a atividade adulticida mostrou-se menos susceptível, porém a avaliação da literatura foi em apenas 12h. É possível que ao avaliar em 48h, a susceptibilidade seja semelhante ou próxima, sendo praticável a extrapolação para helmintos gastrointestinais patogênicos. Apesar do aumento em relação às atividades ovicidas de ambos nematoides devido a muitos fatores de aspecto metodológico, houve eficácia, o que também pode ser um resultado extrapolável para nematoides patogênicos.

Também foi possível observar pequena disparidade na atividade inseticida contra larvas de *C. quinquefasciatus* com valor de CL_{50} de $54,11$ e $4,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em avaliação após 24h e adultos de *C. elegans* de cepa selvagem no presente estudo (PITASAWAT et al., 1998). Ovos de cepa selvagem de *C. elegans* mostraram-se mais susceptíveis ao OE de *I. verum* que ovos de *M. domestica*, com valores de CI_{50} de $68500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SINTHUSIRI; SOONWERA, 2014). Entretanto, *Drosophila suzukii*, a mosca da fruta, apresentou maior susceptibilidade que o presente estudo com indivíduos adultos de *C. elegans* de cepa selvagem, resultando em valores de CL_{50} $3,16$ e $4,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para machos e fêmeas, respectivamente, no teste de fumigação, sendo a atividade inseticida atribuída também ao trans-anetol (KIM et al., 2016).

5.1.4 Atividade do Óleo Essencial de *Mentha piperita*

O OE de *M. piperita* foi descartado na primeira etapa dos testes *in vitro* devido ao seu grande intervalo entre CL_{10} e CL_{90} , sua baixa atividade pode ser atribuída aos componentes

majoritários mentol, mentona e eucaliptol. Porém, em outras espécies essa atividade é acentuada.

A atividade nematicida do OE de *M. piperita* foi avaliada em diferentes hospedeiros. Em frangos alimentados com ração misturada com o OE de *M. piperita* na dose aproximada de 3kg/kg/peso vivo por um período de três dias consecutivos, foi possível observar uma atividade anti-helmíntica de 76,70% para *Ascaridia galli* e 62,90% *Railletina* sp. (GOLYNSKI, 2003). Em parasitos de peixes, o OE resultou em atividade *in vitro* a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ levando a morte de 100% das L3 de *Anisakis* tipo I após 4h, sendo esta atividade atribuída aos componentes acetato de mentil, mentona e mentol (ROMERO et al., 2014).

Em cultivos de fezes de caprinos houve redução estatisticamente significativa do número total de larvas infectantes quando comparados ao controle negativo, cujo percentual foi superior a 95% nas concentrações igual ou maior a 115.900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Haemonchus* e *Trichostrongylus*, enquanto para o gênero *Oesophagostomum* o efeito anti-helmíntico foi mantido até a concentração de 89.100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (DE ALMEIDA et al., 2007). Caboni et al. (2013) reportaram uma atividade nematicida sobre *Meloidogyne incognita*, esta significativa para extratos aquosos em relação a extratos metanólicos com valores de EC_{50} após 72h de 1005 e $>1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, sendo seus componentes majoritários mentol, mentona e D-limoneno. Em outro estudo, o OE resultou em atividade ao imobilizar 71,8% indivíduos jovens de *Meloidogyne javanica* após 48h e inibir a eclosão de ovos em 5,6% após sete dias, ambas concentrações testadas foram de 0,001 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (OKA et al., 2000). Resultados semelhantes foram encontrados em tricostrongilídeos, a inibição da eclodibilidade resultou em valores de CL_{50} e CL_{99} de 0,29 e 1,1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente, tendo o mentol e mentona como componentes majoritários (KATIKI et al., 2011).

Morey e Khandagle (2012) indicaram atividade contra larvas de *M. domestica*, desta vez com valores de CL_{50} e CL_{90} de 104 e 142 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Em larvas de terceiro e quarto instar de mosquitos da espécie *Aedes albopictus*, considerado transmissores de dengue, Chikungunya, entre outras doenças, os valores de CL_{50} e CL_{90} foram 60,3 e 81,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, atividade atribuída a mentona, mentol e isomentona (GIATROPOULOS et al., 2018). Outro estudo anterior corrobora esses dados, onde foram encontrados valores de CL_{50} e CL_{90} de 47,54 e 86,54 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra larvas de *A. aegypti*, respectivamente, após 48h (KALAIVANI et al., 2012). Kumar et al. (2011) também investigaram larvas de terceiro e quarto instar de *A. aegypti* após 24h, desta vez resultou em valores superiores de CL_{50} e CL_{90} , 111,9 e 295,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Porém, da Silva Ramos et al. (2017) demonstraram que 86,6% das larvas morriam após 48h em contato com 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OE de *M. piperita*, essa disparidade de atividade pode ser atribuída à diferença de componentes majoritários encontrados, limoneno, epoxicimeno e sesquifelandreno. Já em larvas de terceiro e quarto instar de *Anopheles stephensi*, mosquito vetor da malária, foram resultados em CL_{50} e CL_{90} de 44,66 e 351,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, após 48h (CHAUHAN et al., 2016).

A atividade contra *Rhipicephalus micropolus* foi avaliada a susceptibilidade de larvas em papel impregnado, obtendo valores de CL_{50} e CL_{90} de 14.810 e 24.990 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, após 24h, sendo esta atividade atribuída ao componentes mentol, acetato de mentil, pulegona e mentona (DE SOUZA CHAGAS et al., 2016). Contra *B. (W.) ocellatus*, um piolho, mastigador, o OE resultou em valor de CL_{50} de 12.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 3000 min de imersão (TALBERT; WALL, 2012).

Em sua maioria, os outros trabalhos identificaram a presença de mentol e mentona, que também foram observados na presente pesquisa. Espera-se que os valores de concentrações capazes de ter atividade significativa *in vivo* sejam superiores aos valores do teste *in vitro* devido à maior complexidade do organismo, portanto, pode-se considerar que os resultados encontrados por De Almeida et al. (2007) são factíveis. Apesar de não resultar em

boa atividade anti-helmíntica contra *C. elegans*, o OE de *M. piperita* exibiu atividade anti-helmíntica em nematoides patogênicos do solo (OKA et al., 2000) e nematoides gastrointestinais de animais (KATIKI et al., 2011); e atividade inseticida em larvas de *A. albopictus* (GIATROPOULOS et al., 2018), em larvas de *A. aegypti* (KALAIVANI et al., 2012) e em larvas de *A. stephensi* (CHAUHAN et al., 2016). Entretanto, quando o OE foi analisado em carrapatos por Talbert e Wall et al. (2012) foram encontrados valores incompatíveis.

5.1.5 Atividade do Óleo Essencial de *Mentha spicata*

Assim, como o OE de *M. piperita*, o OE de *M. spicata* nesta pesquisa não resultou em um dos melhores resultados, porém é inegável o seu potencial em outras espécies de organismos.

O OE de *M. spicata* induziu alta mortalidade de juvenis infecciosos (J2) de *M. javanica*, um nematoide formador de galha, com valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 510 e 950 µg.mL⁻¹, respectivamente, e seus componentes majoritários foram óxido de piperitenona, epóxido de piperitenona e piperitenona (KIMBARIS, et al., 2017). Resultado semelhante desta vez em juvenis (J2) de *M. incognita*, outro nematóide do solo, resultou em valores de EC₅₀ para extratos aquosos e metanólicos de 300 e >1000 µg.mL⁻¹, respectivamente, e seus componentes majoritários foram luteolin-7-O-rutinoside, ácido rosmarínico e ácido salvianólico B (CABONI et al., 2014). A disparidade nos valores pode ser justificada pela diferença na composição química dos OEs e a diferença de solventes entre os estudos. Entretanto, imobilizou 100% indivíduos jovens de *M. javanica* após 48h e inibiu a eclosão de ovos em 2,8% após 7 dias, ambas concentrações testadas foram de 0,001 µL.mL⁻¹ (OKA et al., 2000).

A atividade inseticida é relatada em larvas de terceiro ao quarto instar de *Culex pupiens*, com valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 52,85 e 79,06 µg.mL⁻¹, respectivamente, sendo seus componentes majoritários óxido de piperitenona, trans-calameno e espathulenol (KOLIOPOULOS et al., 2010). E também para larvas de *A. stephensis*, com valores CL₅₀ e CL₉₀ de 49,71 e 100,99 µg.mL⁻¹, respectivamente; larvas de *A. aegypti*, com valores CL₅₀ e CL₉₀ de 56,08 e 110,28 µg.mL⁻¹, respectivamente; e larvas de *C. quinquefasciatus*, com valores CL₅₀ e CL₉₀ de 62,62 e 118,70 µg.mL⁻¹, respectivamente, sendo seus componentes majoritários carvona, cis-carveol e limoneno (GOVINDARAJAN et al., 2012). Todos os estudos resultaram em maior suscetibilidade quando comparado com *C. elegans*.

Desta vez, outra espécie de *Mentha* sp. foi analisada e novamente foram observadas melhor susceptibilidade em nematoides patogênicos do solo (CABONI et al., 2014; KIMBARIS, et al., 2017), em larvas de *C. pupiens* (KOLIOPOULOS et al., 2010), assim como em, larvas de *A. stephensis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (GOVINDARAJAN et al., 2012).

5.1.6 Atividade do Óleo Essencial de *Pelargonium graveolens*

O OE de *P. graveolens* resultou em valores de CL₅₀ de 54,57 µg.mL⁻¹ em adultos de *C. elegans* de cepa selvagem; em CI₅₀ de 16,20 µg.mL⁻¹ na eclosão de ovos de *C. elegans* de cepa selvagem, porém não inibiu a reprodução de adultos de *C. elegans* de cepa selvagem na concentração 5 µg.mL⁻¹. Portanto, em ordem crescente de atividade estão: atividade ovicida > atividade adulticida > atividade na inibição da ovoposição, sendo estas atribuídas ao citronelol, geraniol e formiato de citronelila. A atividade ovicida encontrada com este OE foi a melhor dentre os OEs testados.

Este OE também mobilizou 31,6% indivíduos jovens de *M. javanica* após 48h e inibiu a eclosão de ovos em 11,2% após 7 dias, ambas concentrações testadas foram de 0,001 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (OKA et al., 2000).

A atividade contra larvas do terceiro instar de *C. quinquefasciatus* resultou em valores de CI_{50} e CI_{90} de 98,4 e 146,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, após 24h, sendo esta atividade atribuída ao componentes majoritários citronelol, 10-epi- γ -eudesmol, formiato de citronelila e isomentona (BENELLI et al., 2017). Também resultou em atividade na oviposição de *Rhipicephalus microplus*, mas não interferiu na eclodibilidade na concentração de 100.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (PAZINATO et al., 2016). Enquanto estudos recentes, resultaram em valores de CI_{50} de 333,390 e 396,232 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24h em *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, respectivamente (HEIKAL, 2015).

Em relação a composição química, os trabalhos expostos tiveram apenas um componente majoritário similar ao presente estudo, sendo eles ou formiato de citronelila ou citronelol. A atividade baixa nos estudos de Oka et al. (2000) pode estar relacionada com a menor concentração do OE testado, neste estudo com concentrações mais altas foi possível obter maiores atividade. Já a atividade inseticida em larvas de *C. quinquefasciatus* (BENELLI et al., 2017) resultou em maior susceptibilidade em menores concentrações que as utilizadas neste trabalho. Enquanto a atividade acaricida mostrou-se mais susceptível em espécies de *Dermatophagoides* que em *Rhipicephalus microplus*, porém ambos menos susceptíveis quando comparados com adultos de *C. elegans* (HEIKAL, 2015; PAZINATO et al., 2016) em relação ao presente estudo.

5.1.7 Atividade do Óleo Essencial de *Thymus vulgaris*

O OE de *P. graveolens* resultou em valores de CL_{50} de 54,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em adultos de *C. elegans* de cepa selvagem; em CI_{50} de 16,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ na eclosão de ovos de *C. elegans* de cepa selvagem, e inibiu a reprodução de adultos de *C. elegans* de cepa selvagem em 42% na concentração 14,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, em ordem crescente de atividade estão: atividade na inibição da oviposição > atividade ovicida > atividade adulticida, sendo estas atribuídas ao timol.

A atividade nematicida do OE de *T. vulgaris* sob *C. elegans* também foi avaliada por Albuquerque (2019), onde a concentração de 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi letal para cerca de 60% dos nematoides nas primeiras 6h e cerca de 80% em 48h. Somente as concentrações de 30.000 e 40.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no período de 6h, resultaram em uma redução de nematoides vivos significativamente superior ao grupo controle positivo. Entretanto, em outro estudo indivíduos jovens de *M. javanica* foram resultados valores de CL_{50} e CL_{90} de 202 e 277 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente; também inibiu a eclodibilidade de ovos numa taxa de 98,3% na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 28h; e seus componentes majoritários foram timol, linalol e carvacrol (ANDRÉS et al., 2017). O OE de *T. vulgaris* também imobilizou 67,5% indivíduos jovens de *M. javanica* após 48h e inibiu a eclosão de ovos em 15,6% após 7 dias, ambas concentrações testadas foram de 0,001 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (OKA et al., 2000). Em *H. contortus*, a inibição da eclosão dos ovos foi superior a 90% em concentrações variando de 781 a 50.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com valor de CI_{50} de 436 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; e reduziu a motilidade também superiores a 90% entre as concentrações de 1.562 e 50.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com valor de CL_{50} de 338 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo seus componentes majoritários timol, O-cimeno e γ -terpineno (FERREIRA et al., 2016). Contra o nematóide *Bursaphelenchus xylophilus*, o nemtoide-da-madeira-do-pinheiro, o óleo resultou em valor de CL_{50} de 1.640 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24h de exposição e seus componentes majoritários foram timol, p-cimeno e linalol (KONG et al., 2007). Em parasitos de peixes, foi obtida atividade nas concentrações 100.000 e 50.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com mortalidade de 100% dos

indivíduos de *Anisakis* tipo I após 7 e 14h, respectivamente, atividade atribuída aos componentes timol, linalol, e β -pineno (GIARRATANA et al., 2014).

A atividade contra larvas do terceiro instar ao quarto instar de *A. aegypti* resultou em valores de CL₅₀ de 4,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24h (DE LA TORRE RODRIGUEZ et al., 2013). Entretanto, um estudo mais recente de Pérez López (2015), resultaram em a atividade do OE em cepas locais de Nova Orleans e do México de *A. aegypti*, os valores superiores de CL₅₀ 2.104.000 g.mL^{-1} e 25.370.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24h de exposição. Já em *C. quinquefasciatus*, foram resultados valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 48 e 98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, após 24h, sendo esta atividade atribuída aos componentes majoritários citronelol, 10-epi- γ -eudesmol, formiato de citronelila e isomentona (PAVELA, 2008). Já a atividade inseticida em fêmeas de *A. gambiae* não alimentadas com sangue e alimentadas com açúcar foi de 87,9% na concentração de 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OE e 1,2% na concentração de 350 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OE após 24h, sendo seus componentes majoritários timol, p-cimeno e carvacrol (DELETRE et al., 2013, 2015). Enquanto para *A. stephensi*, os valores de CL₅₀ e CL₉₀ resultaram em 129,08 e 324,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, após 24h (KHANAVI et al., 2013).

Heikal (2015) encontrou valores de 425,296 e 508,846 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24h em *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, respectivamente. Outro estudo com *Tetranychus cinnabarinus* resultou em valor de CL₅₀ de 762,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24h de exposição, sendo os constituintes majoritários o timol, p-cimeno e terpineno (WU et al., 2017). E em *Varroa destructor*, foi obtida CL₅₀ de 3,02 $\mu\text{L/Placa}$ de Petri após 48h, também contendo timol e carvacrol como constituintes majoritários (DAMIANI et al., 2009).

De modo geral, os trabalhos aqui descritos resultaram em timol na sua composição majoritária, bem como o presente estudo. A atividade anti-helmíntica em indivíduos adultos de *C. elegans* no presente trabalho não necessitou de maiores concentrações assim como em Albuquerque (2019), sendo mais susceptível. Já Andrés et al. (2017), Oka et al. (2000) e Kong et al., (2007) avaliaram nematoides do solo e foi possível observar menor susceptibilidade que em *C. elegans*, demonstrando atividade quando extrapolado ainda que em maior concentração. O mesmo foi notado em *H. contortus* nos estudos de Ferreira et al. (2016). Estes trabalhos também resultaram em maior susceptibilidade em baixas concentrações na inibição de eclosão de ovos, mesmo que em taxas diferentes. Ou seja, o OE de *T. vulgaris* resultou em maior atividade em ovos que em adultos de diferentes espécies. Entretanto, em nematoides de peixes para atingir a taxa de 100% de toxicidade foram necessárias concentrações superiores às utilizadas no presente estudo, portanto, menos susceptível (GIARRATANA et al., 2014).

A atividade inseticida resultada nos estudos de De La Torres Rodriguez et al. (2013) e Pavela et al. (2008) em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* resultaram em menores valores de CLs quando comparados com o presente trabalho, sendo, portanto, mais susceptíveis. Já nos estudos Khanavi et al. (2013) em larvas de *A. stephensi* têm susceptibilidade ligeiramente inferior em comparação com o presente estudo, porém vale destacar que a análise foi realizada em 24h e os valores de CLs tendem a alcançar platô durante a exposição. Já outras cepas de *A. aegypti* (Pérez López, 2015) e na espécie *A. gambiae* (DELETRE et al., 2013, 2015) foram observados menor suscetibilidade em relação a atividade em *C. elegans*.

A atividade acaricida em espécies de *Dermatophagoides* demonstrou-se menos susceptível quando comparado ao *C. elegans*, havendo diferença na susceptibilidade também quando comparado a atividade com o OE de *P. graveolens*, que resultou em valores menores de CLs (HEIKAL, 2015). Assim como, quando avaliada a atividade em outra espécie de ácaro, *T. cinnabarinus*, também foi observada maior susceptibilidade em *C. elegans*.

5.2 Atividade em Adultos de Cepas Resistentes

A resistência à ivermectina em *C. elegans* consiste na mutação simultânea de três genes, *avr-14*, *avr-15* e *glc-1*, que codificam subunidades do tipo α do canal de cloro controlado por glutamato (GluCl) e à glicoproteína P, levando a um alto nível de resistência, ou na mutação de quaisquer genes de dois canais, que confere resistência modesta ou nenhuma resistência. (DENT et al., 2000). No presente estudo, a cepa resistente à ivermectina mostrou-se susceptível aos OEs de *T. vulgaris* e *I. verum*, com fator de resistência de 0,77 e 1,06, respectivamente, portanto, pode-se supor que ambos os OEs não atuam em receptores glutamato e GABA e, ainda, que os alvos moleculares do OE de *T. vulgaris* sejam mais sensíveis ao seu ligante ou que seja mais específico para esses alvos moleculares. Podendo ser considerado como uma alternativa a cepas com alto nível de resistência a este antiparasitário devido ao seu uso irracional ao longo de décadas. Enquanto, esta cepa mostrou-se resistente ao OE de *P. graveolens*, com fator de resistência de 3131,37, logo, pode-se supor a existência resistência cruzada e que este OE possui mecanismo de ação semelhante que a ivermectina

A cepa CB3474, resistente ao albendazol, é um mutante nocaute de *ben-1*. Este gene codifica a β -tubulina que representa o sítio de ligação do albendazol, inibindo a formação de microtúbulos (DRISCOLL et al., 1989; LUBEGA et al., 1994). No presente estudo, a cepa resistente ao albendazol mostrou-se susceptível aos OEs de *T. vulgaris* e *P. graveolens*, com fator de resistência de 0,69 e 1,35, respectivamente portanto, pode-se supor que ambos os OEs não atuam na formação dos microtúbulos e, ainda, que os alvos moleculares do OE de *T. vulgaris* sejam mais sensíveis ao seu ligante ou que seja mais específico para esses alvos moleculares. Enquanto, esta cepa mostrou-se resistente ao OE de *I. verum*, com fator de resistência de 5,34, logo, pode-se supor a existência de resistência cruzada e que este OE tem mecanismo de ação semelhante que o albendazol.

O mecanismo bioquímico subjacente à sensibilidade reduzida ao medicamento dos subtipos de nAChR ainda é desconhecido, mas pode envolver alterações nas estruturas das subunidades *unc-29* e *lev-1* de ligação do levamisol, mas modificações na estequiometria da subunidade ou variações na orientação das subunidades em direção ao seu canal adjacente componentes também podem contribuir para o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica nicotínica (KÖHLER, 2011). Em cepas resistentes ao levamisol foi observada resistência utilizando os três OEs, com níveis variando de 2,6 - 18,66, portanto, o mecanismo de ação dos OEs diferem do levamisol.

Os resultados desta pesquisa foram ainda comparados com a atividade de outros extratos de plantas em *C. elegans*. Estudos utilizando os ácidos provenientes da *Anogeissus leiocarpus*, uma árvore nativa da África Tropical (ácido gálico, gentísico e elágico) em cepas resistentes à ivermectina resultaram em valores de CL₅₀ de 20,33 10,62 e 0,098 mM, respectivamente, enquanto em cepa selvagem foram encontrados valores de CL₅₀ de 3,22, 6,12 e 0,64 mM, respectivamente. Em cepas resistentes à benzimidazol, os valores de CL₅₀ encontrados foram de 12,97, 7,81 e 0,96 mM para o ácido gálico, gentísico e elágico, respectivamente. Em cepas resistentes ao levamisol, os valores de CL₆₀ encontrados foram de 16,67, 13,40 e 0,166 mM para o ácido gálico, gentísico e elágico, respectivamente. Esses resultados indicam que a ligação do ácido elágico no nematóide difere daquela das cepas resistentes de *C. elegans* e o ácido gentísico resultou em moderada susceptibilidade às cepas resistentes enquanto o ácido gálico resultou em moderada susceptibilidade à cepa resistente ao albendazol e ligeira susceptibilidade ao levamisol (NDJONKA et al., 2014).

Posteriormente, Chaweeborisuttam et al. (2016) também investigaram os efeitos da plumbagina, um composto amarelado presente nas raízes das plantas espécies do gênero *Plumbago*, em cepas selvagem e resistentes à ivermectina, albendazol e levamisol. No ensaio de letalidade, todos os indivíduos adultos das cepas CB211, CB3474 e DA1316 sobreviveram

a uma incubação de 24h com levamisol, albendazol e ivermectina em concentrações de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto nenhum dos indivíduos da cepa N2 sobreviveu nessas concentrações. No entanto, quando os indivíduos resistentes ao N2 e aos medicamentos foram incubados com a plumbagina em concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por 24h, os indivíduos em cada grupo começaram a morrer a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e nenhum sobreviveu a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Não houve diferença significativa na susceptibilidade à plumbagina das cepas selvagem e resistentes aos medicamentos. Essas observações implicam em um mecanismo de ação da plumbagina diferente dos mecanismos de outras drogas conhecidas.

Ainda sobre a ação de extratos vegetais em cepas resistentes de *C. elegans*, Kalmobé et al. (2017) observaram que em comparação com o tipo selvagem, o mutante CB211 e CB3474 são susceptíveis na presença de folhas de *Lophira lanceolata*, uma planta utilizada no tratamento da oncocercose por curandeiros do Camarões. Esse resultado sugere que o modo de ação dos extratos de folhas de *L. lanceolata* difere do levamisol e albendazol. Entretanto, quando incubado com a casca do tronco ou raiz de *L. lanceolata* ambas as cepas continuam resultando em resistência, sugerindo que essas duas partes podem agir de forma semelhante ao levamisol e albendazol.

E, recentemente, Gagman et al. (2020) reportaram a atividade na concentração de 2.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 48h teve uma diferença razoável entre o tratamento com extratos metanólicos de *Cassia siamea*, uma árvore originária da Tailândia, com falta de motilidade de 86,7% e 84,9%, para cepa selvagem e resistente à ivermectina, respectivamente; e extratos aquosos com nível de atividade biológica de 30,6 e 38,9% para cepa selvagem e resistente à ivermectina, respectivamente. Além disso, baseado nos valores de CL_{50} , os extratos metanólicos mostraram-se mais eficientes que o extrato aquoso, com 726 e 906 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para cepa selvagem e resistente à ivermectina, respectivamente. Um estudo posterior do mesmo grupo também mostrou a maior susceptibilidade de extratos metanólicos de *Detarium microcarpum*, uma árvore leguminosa de origem Africana, contra cepa resistente à ivermectina com valor de CL_{50} de 516 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto o extrato aquoso demonstrou CL_{50} de 717 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em comparação com a cepa selvagem com valor de CL_{50} de 443 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e 652 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para extratos metanólicos e aquosos, respectivamente (GANGMAN et al., 2021).

Estes e o presente estudo demonstraram uma possibilidade real do uso de fitoativos no controle de nematoides de diferentes cepas.

5.2 Modelo de Árvore de Decisão

Testar um grande número de compostos para observar se eles produzem um efeito bioquímico ou celular apropriado é geralmente um dos primeiros passos no caminho da descoberta de drogas. Um *screening* de avaliação de atividade anti-helmíntica de OEs pode ser considerado o ponto de partida laboratorial para prospecção de fitoingredientes com perfil de bioatividade, proporcionando direcionamento da pesquisa, reduzindo tempo e insumos empregados (SMITH, 2002).

A árvore de decisão permitiu a comparação de possíveis ações com base nas probabilidades dos resultados, partindo de 7 OEs até chegar em 1 OE de maior atividade anti-helmíntica, sendo este, o OE de *T. vulgaris*.

6 CONCLUSÃO

O fitoinsumo com maior potencial contra indivíduos adultos de *C. elegans* de cepa selvagem foi o OE de *I. verum*. Enquanto, o fitoinsumo com maior potencial inibitório de eclosão de ovos de cepa selvagem foi o OE de *P. graveolens*. Os OEs de *C. flexuosus*, *E. caryophyllus* e *I. verum* afetaram a reprodutibilidade dos indivíduos adultos de *C. elegans* de cepa selvagem com taxa de inibição semelhante estatisticamente.

Com os resultados demonstrados foi possível investigar os efeitos dos diferentes fitoinsumos no desenvolvimento do ciclo de vida, de diferentes cepas de *C. elegans*; determinar a CL₅₀ ou CI₅₀ e CL₉₀ ou CI₉₀ e inferir sobre possíveis mecanismos dos OEs testados.

Os indivíduos adultos de *C. elegans* resistentes à ivermectina mostraram-se susceptíveis aos OEs de *I. verum* e *T. vulgaris*, entretanto demonstraram resistência cruzada ao OE de *P. graveolens*. Os indivíduos adultos de *C. elegans* resistentes ao albendazol mostraram-se susceptíveis aos OEs de *P. graveolens* e *T. vulgaris*, entretanto demonstraram resistência cruzada ao OE de *I. verum*. Já os indivíduos adultos de *C. elegans* resistentes ao levamisol demonstraram resistência cruzada a todos os OEs testados.

O OE de *T. vulgaris* foi o fitoinsumo final da análise da linha analítica através da árvore de decisão, que originou com a utilização de 7 OEs.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora, apenas a triagem de moléculas baseadas no uso de *Caenorhabditis elegans* não aponte o mecanismo de ação dos compostos, isto pode ser elucidado em estudos secundários, como, testes *in vitro* em outras cepas manipuladas geneticamente, uso de análise genômica e transcriptômica. Além disso, também poderá ser utilizada a linha analítica de triagem desenvolvida neste estudo para a prospecção de fitoinsumos futuros.

A partir dos resultados deste estudo, também são necessários mais testes *in vitro* para avaliação do efeito sinérgico entre os OEs de *I. verum* e *P. graveolens*, pois apresentam susceptibilidade em diferentes cepas resistentes; e avaliação do efeito aditivo destes OEs isoladamente com o OE de *T. vulgaris*, pois apresentam similaridade de susceptibilidade em uma das cepas resistentes aos antiparasitários. Também é possível elucidar o possível efeito sinérgico entre os componentes majoritários ou diferentes fitoinsumos dos OEs aqui estudados.

Estudos *in vitro* com nematoide alvo e testes *in vivo* a fim de avaliar segurança, eficácia e toxicidade. Havendo, portanto, a possibilidade de desenvolvimento de um produto acabado a partir desta pesquisa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLATIEF, S. A.; BEHEIRY, R. R.; EL-MANDRAWY, S. A. M. Peppermint Essential Oil Alleviates Hyperglycemia Caused Bby Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Type 2 Diabetes in Rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 990-999, 2017.
- ABIDU-FIGUEIREDO, M.; CARVALHO-DE-SOUZA, B.; MAIO, F. G.; BARBOSA, C. G.; REINECKE, R. K. Comparação entre Técnicas Coproparasitológicas para a Contagem de Ovos de Namatóides Gastrointestinais de Búfalos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 5, 2005.
- ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório Anual 2021**. Disponível em: <abiec.com.br>. Acesso em: 04 dez. 2021.
- ABINPET - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Mercado Pet Brasil 2021**. Disponível em <<http://www.abinpet.org.br/>> Acesso em 04 dez. 2021.
- ADDAI, Z. R. Phytochemicals Screening and Evaluation of Antioxidants and Antibacterial Activities of Five Medicinal Plants. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 8, n. 3, p. 393-397, 2016.
- AHMAD, A.; VILJOENA, A. The In Vitro Antimicrobial Activity of Cymbopogon Essential Oil (Lemon Grass) and its Interaction With Silver Íons. **Phytomedicine**, v. 22, p. 657-665, 2015.
- ALAMGIR A. N. M. Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts. *In: Progress in Drug Research*. Rainsford KD (Ed.). Springer Nature, 2017.
- ALBUQUERQUE, Y. R. **Atividade Anti-nematoides dos Óleos Essenciais de *Petroselinum crispum*, *Ruta graveolens* e *Thymus vulgaris* no Modelo Nematóide de *Caenorhabditis elegans***. 2019. 74 p. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- ALTUN, Z. F. & HALL, D. H. Introduction. *In: WormAtlas*, 2009.
- ANDRÉS, M. F.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; MUÑOZ, R.; DE LA PEÑA, F.; JULIO, L. F.; BURILLO, J. Nematicidal Potential of Hydrolates from the Semi Industrial Vapor-Pressure Extraction of Spanish Aromatic Plants. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 30, p. 29834-29840, 2018.
- ARAÚJO-FILHO, J. V.; RIBEIRO, W. L. C.; ANDRÉ, W. P. P.; CAVALCANTE, G. S.; RIOS, T. T.; SCHWINDEN, G. M.; ROCHA, L. O.D.; MACEDO, I. T. F.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B. Anthelmintic Activity of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil and its Major Component, Citronellal, on Sheep Gastrointestinal Nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 644-651, 2019.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S. AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological Effects of Essential Oils – A Review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BANETH G., THAMSBORG, S. M.; OTRANTO, D.; GUILLOTX, J.; BLAGAX, R.; DEPLAZESK, P.; SOLANO-GALLEGO, L. Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe, **Journal of Comparative Pathology**, p. 1-21, 2015.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; CIANFAGLIONE, K.; CIASCHETTI, G.; CONTI, F.; NICOLETTI, M.; SENTHIL-NATHAN, S.; MEHLHORN, H.; MAGGI, F. Acute Larvicidal Toxicity of Five Essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) Against the Filariasis Vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and Antagonistic Effects. **Parasitology International**, v. 66, n. 2, p. 166-171, 2017.

BENENATI, G.; PENKOV, S.; MULLER-REICHERT, T.; ENTCHEV, E. V.; KURZCHALIA, T. V. Two Cytochrome P450s in *Caenorhabditis elegans* are Essential for the Organization of Eggshell, Correct Execution of Meiosis and the Polarization of Embryo. **Mechanisms of Development**, v. 126, p. 382-393, 2009.

BHATTACHARYA, S. Cultivation of Essential Oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. *In*: PREEDY, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Academic Press, 2016, p. 19-29.

BIOESSÊNCIA. **Laudo Cromatográfico: OE Hortelã Pimenta**. Disponível em: <https://www.bioessencia.com.br/media/wysiwyg/bioessencia/cromatografia/BIO_LAUDO_CROM_HORTELA_210802.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2022.

BIZIMENYERA, E. S.; GITHIORI, J. B.; ELOFF, J. N.; SWAN, G. E. In Vitro Activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) Extracts on the Egg Hatching and Larval Development of the Parasitic Nematode *Trichostrongylus Colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 336-343, 2006.

BOGAN, J.; ARMOUR, J. Anthelmintics for Ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 483-491, 1987.

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

BURNS, A. R.; LUCIANI, G. M.; MUSSO, G.; BAGG, R.; YEO, M.; ZHANG, Y.; RAJENDRAN, L.; GLAVIN, J.; HUNTER R.; REDMAN, E.; STASIUK, S.; SCHERTZBERG, M.; MCQUIBBAN, G. A.; CAFFREY, C. R.; CUTLER, S. R.; TYERS, M.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; FRASER, A. G.; MACRAE, C. A.; GILLEARD, J.; ROY, P. J. *Caenorhabditis elegans* is a Useful Model for Anthelmintic Discovery. **Nature Communications**, v. 6, n. 7485, p. 1-33, 2015.

BÚSSOLA. **Por que a Crise não Atinge o Mercado Pet, com Alta de 13,5% Durante a Pandemia?** Revista Exame, 2021. Disponível em <<https://exame.com/bussola/bussola-live-economia-animal-o-crescimento-do-mercado-pet-no-brasil/>>. Acesso em 04 dez. 2021.

BYERLY, L.; CASSADA, R. C.; RUSSEL, R. L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 51, n. 1, p. 23-33, 1976.

CABONI, P.; SABA, M.; TOCCO, G.; CASU, L.; MURGIA, A.; MAXIA, A.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; NTALLI, N. Nematicidal Activity of Mint Aqueous Extracts against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 41, p. 9784-9788, 2013.

CANÇADO, P. H. D.; CATTO, J. B.; SOARES, C. O.; MIRANDA, P. A. B.; SOUZA, T. F.; PIRANDA, E. M. Controle Parasitário de Bovinos de Corte em Sistemas de Integração. *In*: BUNGENSTAB, D. J. **Sistemas de Integração Lavoura-pecuária-floresta: a Produção Sustentável**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2012, p. 177-188.

CARVALHO, J. R.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U. R.; HOLTZ, A. M. **Análise de Probit Aplicada a Bioensaios com Insetos**. Colatina: IFES, 2017. 102 p.

CASSADA, R. C.; RUSSEL, R. L. The *dauer* Larva, a Post-embryonic Developmental Variant of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 46, ed. 2, p. 326-342, 1975.

CASTILLO, R. M.; STASHENKO, E.; DUQUE, J. E. Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 1, p. 25-35, 2017.

CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **PIB do Agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br>. Acesso em: 04 dez. 2021.

CHAWEEBORISUIT, P.; SURIYONPLENGSAENG, C.; SUPHAMUNGMEE, W.; SOBHON, P.; MEEMON, K. Nematicidal Effect of Plumbagin on *Caenorhabditis elegans*: a

Model for Testing a Nematicidal Drug. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 71, n. 5-6, p. 121-131, 2016.

CHOUKSEY, D.; SHARMA, P.; PAWAR, R.S.; Biological Activities and Chemical Constituents of *Illicium verum* Hook Fruits (Chinese Star Anise). **Der Pharmacia Sinica**, v. 1, n. 3, p. 1-10, 2010.

CNA - CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Comunicado Técnico: PIB Brasil 2020 - Edição 06/2021**. Disponível em <www.cnabrazil.org.br>. Acesso em 04 dez. 2021.

DA SILVA RAMOS, R.; RODRIGUES, A. B. L.; FARIAS, A. L. F.; SIMÕES, R. C.; PINHEIRO, M. T.; FERREIRA, R. M. A.; COSTA BARBOSA, L. M.; PICAÑO SOUTO, R. N.; FERNANDES, J. B.; SANTOS, L. S.; DE ALMEIDA, S. S. M. S. Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

DAMIANI, N.; GENDE, L. B.; BAILAC, P., MARCANGELI, J. A.; EGUARAS, M. J. Acaricidal and Insecticidal Activity of Essential Oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Parasitology research**, v. 106, n. 1, p. 145-152, 2009.

DANTAS-TORRES, F. & OTRANTO, D. Dogs, Cats, Parasites, and Humans in Brazil: Opening the Black Box. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 22, p. 1-25, 2014.

DAVISON, E. K. & BRIMBLE, M. A. Natural Product Derived Privileged Scaffolds in Drug Discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 1-8, 2019.

DAVULURI, T.; CHENNURU, S.; PATHIPATI, M.; KROVVIDI, S.; RAO, G. S. In Vitro Anthelmintic Activity of Three Tropical Plant Extracts on *Haemonchus contortus*. **Acta Parasitologica**, v. 65, p. 11-18, 2019.

DE ALMEIDA, M. A.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N.; SIMAS, M. M.; BOTURA, M. B.; DA CRUZ, A. C.; DA SILVA, A. V.; MENEZES, T. P.; BATATINHA, M. J. Efeitos dos Extratos Aquosos de Folhas de *Mentha piperita* L. e de *Chenopodium ambrosioides* L. Sobre Cultivos de Larvas Infectantes de nematoides Gastrointestinais de Caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 57-59, 2007.

DE LA TORRE RODRIGUEZ, Y. C.; MARTÍNEZ ESTRADA, F. R.; FLORES SUAREZ, A. E.; WAKSMAN DE TORRES, N.; SALAZAR ARANDA, R. Larvicidal and Cytotoxic Activities of Extracts from 11 Native Plants from Northeastern Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 310-313, 2013.

DE MENDONÇA, F. A. C.; DA SILVA, K. F. S.; DOS SANTOS, K. K.; RIBEIRO JÚNIO, K. A. L.; SANT'ANA, A. E. G. Activities of some Brazilian Plants Against Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 629-636, 2005.

DE SOUZA CHAGAS, A. C.; DE SENA OLIVEIRA, M. C.; GIGLIOTTI, R.; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian Essential Oils on Lethality of the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.

DE, M.; DE, A. K.; SEN, P.; BANERJEE, A. B. Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* hook f). **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 94-95, 2002.

DELETRE, E.; CHANDRE, F.; WILLIAMS, L.; DUMÉNIL, C.; MENUT, C.; MARTIN, T. Electrophysiological and Behavioral Characterization of Bioactive Compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* Essential Oils Against *Anopheles gambiae* and Prospects for their Use as Bednet Treatments. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 316, 2015.

DELETRE, E.; MARTIN, T.; CAMPAGNE, P.; BOURGUET, D.; CADIN, A.; MENUT, C.; BONAFOS, R.; CHANDRE, F.; LAZZARI, CLAUDIO R. Repellent, Irritant and Toxic

Effects of 20 Plant Extracts on Adults of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Mosquito. **PLOS ONE**, 8(12), e82103, 2013.

DENT, J. A.; SMITH, M. M.; VASSILATIS, D. K.; AVERY, L. The Genetics of Ivermectin Resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 6, p. 2674-2679, 2000.

DESAM, N. R.; AL-RAJAB, A. J.; SHARMA, M.; MARY MOSES, M.; REDDY, G. R.; ALBRATTY, M. Chemical Constituents, In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of *Mentha piperita* L. (Peppermint) Essential Oils. **Journal of King Saud University – Science**, v. 31, p. 528-533, 2017.

DOBRE, A. A.; GAGIU, V.; PETRU, N. Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Food-borne Bacteria Evaluated by two Preliminary Methods. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, p. 119-125, 2011a.

DOBRE, A. A.; GAGIU, V.; PETRU, N. Preliminary Studies on the Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Food-borne Bacteria and Toxigenic Fungi. **Food Technology**, v. 35, n. 2, p. 16-26, 2011b.

DOS SANTOS, J.; DE ALMEIDA CHAVES, D. S.; DE SOUZA, M.; RIGER, C. J.; LAMBERT, M. M.; CAMPOS, D. R.; MOREIRA, L. O.; DOS SANTOS SIQUEIRA, R. C.; DE PAULO OSORIO, R.; BOYLAN, F.; CORREIA, T. R.; COUMENDOUROS, K.; CID, Y. P. In Vitro Activity of Essential Oils Against Adult and Immature Stages of *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 340-347, 2020.

DRISCOLL, M.; DEAN, E.; REILLY, E.; BERGHOLZ, E.; CHALFIE, M. Genetic and Molecular Analysis of a *Caenorhabditis elegans* Beta-tubulin that Conveys Benzimidazole Sensitivity. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 6, p. 2993-3003, 1989.

EL AMRANI, S.; EL OUALI LALAMI, A.; EZ ZOUBI, Y.; EL MOUKHAFI, K.; BOUSLMATI, R.; LAIRINI, S. Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Effects of Cinnamon and Clove Essential Oils from Madagascar. **Materials Today: Proceedings**, v. 13, p. 762-770, 2019.

ELLSE, L. & WALL, R. The Use of Essential Oils in Veterinary Ectoparasite Control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, n. 3, p. 233-243, 2014.

ENG, J. K. L.; PRICHARD, R. K. A Comparison of Genetic Polymorphism in Populations of *Onchocerca volvulus* from Untreated- and Ivermectin-treated Patients. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 142, n. 2, p. 193-202, 2005.

ENNAIFER, M.; BOUZAIENE, T.; MESSAOUD, C.; HAMDY M. Phytochemicals, Antioxidant, Anti-acetyl-cholinesterase, and Antimicrobial Activities of Decoction and Infusion of *Pelargonium graveolens*. **Natural Product Research**, v. 34, n. 18, p. 2634-2638, 2020.

EPE, C. & KAMINSKY, R. New Advancement in Anthelmintic Drugs in Veterinary Medicine. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 129-134, 2013.

FAIRWEATHER, I.; BORAY, J. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. **The Veterinary Journal**, v. 158, n. 2, p. 81-112, 1999.

FERREIRA, L. E.; BENINCASA, B. I.; FACHIN, A. L.; FRANÇA, S. C.; CONTINI, S.; CHAGAS, A.; BELEBONI, R. O. *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.

FICHI, G.; FLAMINI, G.; GIOVANELLI, F.; OTRANTO, D.; PERRUCCI, S. Efficacy of an Essential oil of *Eugenia caryophyllata* Against *Psoroptes cuniculi*. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 168-172, 2007.

FITZPATRICK, J. L. Global Food Security: The Impact of Veterinary Parasites and Parasitologists. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 3-4, p. 233-248, 2013.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.;

OLIVEIRA, A. J. B. Production of Secondary Metabolites in Plant Cell and Tissue Culture: the Example of the Genera Tabernaemontana and Aspidosperma. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 627–641, 2008.

GAGMAN, H. A.; HIM, N.; AHMAD, H.; SULAIMAN, S. F.; ZAKARIA, R.; TERMIZI, F. In Vitro Efficacy of Aqueous and Methanol Extract of *Cassia siamea* Against the Motility of *Caenorhabditis elegans*. **Tropical Life Sciences Research**, v. 31, n. 3, p. 145-159, 2020.

GAGMAN, H.; HIM, N.; ABUBAKAR, B.; AHMAD, H. Efficacy of *Detarium Microcarpum* Extracts and Synergistic Effect of Combine Extract and Ivermectin Against *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Biological Research**, v. 11, p. 189-202, 2021.

GARCIA, S. N.; OSBUM, B. I.; CULLOR J. S. A One Health Perspective on Dairy Production and Dairy Food Safety. **One Health**, v. 7, 2019.

GEARY, T. G. Ivermectin 20 Years on: Maturation of a Wonder Drug. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 530-532, 2005.

GEARY, T. G.; SANGSTER, N. C.; THOMPSON, D. P. Frontiers in Anthelmintic Pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 275-295, 1999.

GIARRATANA, F.; MUSCOLINO, D.; BENINATI, C.; GIUFFRIDA, A.; PANEBIANCO, A. Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against *Anisakis* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 142, p. 7-10, 2014.

GIATROPOULOS, A.; KIMBARIS, A.; MICHAELAKIS, A.; PAPACHRISTOS, D. P.; POLISSIOU, M. G.; EMMANOUEL, N. Chemical Composition and Assessment of Larvicidal and Repellent Capacity of 14 Lamiaceae Essential Oils Against *Aedes albopictus*. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1953-1964, 2018.

GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a Paradigm and Model to Study Anthelmintic Drug Resistance. **Parasitology**, v. 140, n. 12, p. 1506-1522, 2013.

GILLEARD, J. S. Understanding Anthelmintic Resistance: The Need for Genomics and Genetics. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 12, p. 1227-1239, 2006.

GOLYNSKI, A. A. **Controle de Helmintos de Frangos de Corte Utilizando as Plantas *Mentha piperita*, *Carapa guianensis*, *Artemisia absinthium* e *Chenopodium ambrosioides***. 2003. 54 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Veterinária.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.; RAJESWARI, M.; YOGALAKSHMI, K. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oil from *Mentha spicata* (Linn.) Against Three Mosquito Species. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2012.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LÉON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the Potential Economic Impact of Cattle Parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUCWA K.; MILEWSKI S.; DYMERSKI T.; SZWEDA P. Investigation of the Antifungal Activity and Mode of Action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* Essential Oils. **Molecules**, v. 8, n. 23, p.1-18, 2018.

HAN, X. & PARKER, T. L. Anti-inflammatory Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) Essential Oil in Human Dermal Fibroblasts. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1619-1622, 2017.

HEIKAL H. M. Studies on the Occurrence, Identification and Control of House Dust Mites at Rural Houses of Shebin El-Kom Locality, Egypt. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 179-184, 2015.

HELAL, M. A.; ABDEL-GAWAD, A. M.; KANDIL, O. M. KHALIFA, M. M. E.; CAVE, G. W. V.; MORRISON, A. A.; BARTLEY, D. J.; ELSHEIKHA, H. M. Nematicidal Effects of a Coriander Essential Oil and Five Pure Principles on the Infective Larvae of Major Ovine

Gastrointestinal Nematodes In Vitro. **Pathogens**, v. 9, n. 9, 2020.

HODGKIN, J. *Caenorhabditis elegans*. In: BRENNER, S.; MILLER, J. H. **Encyclopedia of Genetics**. Academic Press, 2001. p. 251-256.

HOLDEN-DYE, L. & WALKER, R. J. Anthelmintic Drugs and Nematicides: Studies in *Caenorhabditis elegans*. In: **WormBook**, 2014.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **PIB Varia -0,1% no 3º Trimestre de 2021**. Disponível em <www.ibge.gov.br>. Acesso em 04 dez. 2021.

INSTITUTO PET BRASIL. **Anuário Pet 2020**. Disponível em: <http://institutopetbrasil.com/>. Acesso em 04 dez. 2021.

IRWING, P. J. Companion Animal Parasitology: a Clinical Perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 581-593, 2002.

KALAIVANI, K.; SENTHIL-NATHAN, S.; MURUGESAN, A. G. Biological Activity of Selected Lamiaceae and Zingiberaceae Plant Essential Oils Against the Dengue Vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1261-1268, 2012.

KALMOBÉ, J.; NDJONKA, D.; BOURSOU, D.; VILDINA, J. D.; LIEBAU, E. Phytochemical Analysis and In Vitro Anthelmintic Activity of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae) on the Bovine Parasite *Onchocerca ochengi* and on Drug Resistant Strains of the Free-living Nematode *Caenorhabditis elegans*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 404, 2017.

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C. S.; BIZZOC, H. R., FERREIRA, J. F. S.; AMARANTEE, A. F. T. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* Essential Oils Evaluated in Four Different In vitro Tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 103-108, 2011.

KEISER, J.; PANIC, G.; ADELFO, R.; COWAN, N.; VARGAS, M.; SCANDALE, I. Evaluation of an FDA Approved Library Against Laboratory Models of Human Intestinal Nematode Infections. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.

KHANA VI, M.; VATANDOOST, H.; KHOSRAVI DEHAGHI, N.; SANEI DEHKORDI, A.; SEDAGHAT, M. M.; HADJIAKHOONDI, A.; HADJIAKHOONDI, F. Larvicidal Activities of Some Iranian Native Plants Against the Main Malaria Vector, *Anopheles stephensi*. **Acta medica Iranica**, v. 51, n. 3, p. 141-147, 2013.

KIM, J.; JANG, M.; SHIN, E.; KIM, J.; LEE, SI H.; PARK, C. G. Fumigant and Contact Toxicity of 22 Wooden Essential Oils and Their Major Components Against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 35-43, 2016.

KIMBARIS, A. C.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; ANDRÉS, M. F.; VIDALI, V. P.; POLISSIOU, M. G.; SANTANA-MÉRIDAS, O. Biocidal Compounds from *Mentha* sp Essential Oils and their Structure-activity Relationships. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 3, 2017.

KÖHLER P. The Biochemical Basis of Anthelmintic Action and Resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 336-345, 2001.

KOLIOPOULOS, G.; PITAROKILI, D.; KIOULOS, E.; MICHAELAKIS, A.; TZAKOU, O. Chemical Composition and Larvicidal Evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* Essential Oils Against the West Nile Virus Mosquito *Culex pipiens*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 327-335, 2010.

KONG, J. O.; PARK, I. K.; CHOI, K. S.; SHIN, S. C.; AHN, Y. J. Nematicidal and Propagation Activities of Thyme Red and White Oil Compounds Toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). **Journal of Nematology**, v. 39, n. 3, p. 237-242, 2007.

KOTZE, A. C. & PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. In: GASSER, R. B. & VON SAMSON-

- HIMMELSTJERNA, G. **Advances in Parasitology**. Academic Press, v. 93, 2016, p. 397-428.
- KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Repellent, Larvicidal and Pupicidal Properties of Essential Oils and their Formulations Against the Housefly, *Musca domestica*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 3, p. 302-310, 2011.
- KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* Essential Oil Against Dengue Fever Mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 85-88, 2011.
- KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus* is Correlated with a Conserved Mutation at Aminoacid 200 in β -tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 299-303, 1994.
- LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. A.; SALLOVITZ, J. M.; MOTTIER, M. L.; BRUNI, S. F. S. Antinematodal Drugs. In: RIVIERE, J. M.; PAPICH, M. G. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 9. ed: Wiley-Blackwell, 2003, p. 1053-1094.
- LAWLESS, J. **The Encyclopedia of Essential Oils: The Complete Guide to the Use of Aromatic Oils in Aromatherapy, Herbalism, Health and Well-Being**. HarperCollins Publishers, 2014, 256 p.
- LEE, S. Y., & KANG, K. Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 128, n. 56437, 2017.
- LEELA, N. K.; KHAN, R. M.; REDDY, P. P.; NIDIRY, E. S. J. Nematicidal Activity of Essential oil of *Pelargonium graveolens* At the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, v. 20, n. 1, p. 57-58, 1992.
- LERNER, H. & BERG, C. The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health? **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, p. 25300, 2015.
- LEWIS, J. A. & FLEMING, J. T. Basic Culture Methods. **Methods in Cell Biology**, [s. l.], v. 48, p. 3-29, 1995.
- LIMMA-NETTO, J. D.; SENA, A. C.; COPATTI, C. E. Essential Oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the Sedation, Anesthesia and Recovery of Tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Male x *Colossoma macropomum* Female). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, p.727-733, 2016.
- LÓPEZ, H. S. S. & CAMBEROS, L. O. **Farmacología Veterinaria**. 3. ed.: McGraw-Hill, 2006. 1082 p.
- LUBEGA, G. W.; KLEIN, R. D.; GEARY, T. G.; PRICHARD, R. K. *Haemonchus contortus*: the Role of Two Beta-tubulin Gene Subfamilies in the Resistance to Benzimidazole Anthelmintics. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 9, p. 1705-1715, 1994.
- LUBEGA, G. W.; PRICHARD, R. K. Interaction of Benzimidazole Anthelmintics With *Haemonchus contortus* Tubulin: Binding Affinity and Anthelmintic Efficacy. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 73, n. 3, p. 203-213, 1991.
- MAKHAIK, M.; NAIK, S. N.; TEWARY, D. K. Evaluation of Anti-mosquito Properties of Essential Oils. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 129-133, 2005.
- MATOS, L. F.; BARBOSA, D. R. S.; LIMA, E. C.; DUTRA, K. A.; NAVARRO, D. M. A. F.; ALVES, J. L. R. A.; SILVA, G. N. Chemical Composition and Insecticidal Effect of Essential Oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in Cowpea. **Industrial Crops and Products**, v. 145, n. 112088, 2020.
- MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First Report of Monepantel *Haemonchus contortus* Resistance on Sheep Farms in Uruguay. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 98, 2014.
- MIRANDA, R. A. de. Breve História da Agropecuária Brasileira. In: LANDAU, E. C.;

SILVA, G. A. da; MOURA, L.; HIRSCH, A.; GUIMARAES, D. P. (Ed.). **Dinâmica da Produção Agropecuária e da Paisagem Natural no Brasil nas Últimas Décadas: Cenário Histórico, Divisão Política, Características Demográficas, Socioeconômicas e Ambientais**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. v. 1, p. 31-57.

MOREY, R. A. & KHANDAGLE, A. J. Bioefficacy of Essential Oils of Medicinal Plants Against Housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1799-1805, 2012.

OKA, Y.; NACAR, S.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; YANIV, Z.; SPIEGEL, Y. Nematicidal Activity of Essential Oils and their Components Against the Root-knot Nematode. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 710-715, 2000

OLSON, S. K.; GREENAN, G.; DESAI, A.; MULLER-REICHERT, T.; OEGEMA, K. Hierarchical Assembly of the Eggshell and Permeability Barrier in *C. elegans*. **Journal of Cell Biology**, v. 198, 731-748, 2012.

O'REILLY, L. P.; LUKE, C. J.; PERLMUTTER, D. H.; SILVERMAN, G. A.; PAK, S. C. C. *elegans* in High-Throughput Drug Discovery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 69-70, p. 247-253, 2013.

OZGUVEN, M. & TANSI, S. Drug Yield and Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. as in Influenced by Ecological and Ontogenetical Variation. **Turkian Journal of Agricultural and Forest**, v. 22, p. 537-542, 1998.

PAVELA, R. Larvicidal Effects of Various Euro-Asiatic Plants Against *Culex quinquefasciatus* Say Larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 102, n. 3, p. 555-559, 2008.

PAZINATO, R.; VOLPATO, A.; BALDISSERA, M. D.; SANTOS, R. C. V.; BARETTA, D.; VAUCHER, R. A.; GIONGO, J. L.; BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; SILVA, A. S. In vitro Effect of Seven Essential Oils on the Reproduction of the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 6, p. 1029-1034, 2016.

PÉREZ LÓPEZ, L. A.; DE LA TORRE, Y. C.; CIRIO, A. T.; DE TORRES, N. W.; FLORES SUÁREZ, A. E.; ARANDA, R. S. Essential Oils from *Zanthoxylum fagara* Wild Lime, *Ruta chalepensis* L. and *Thymus vulgaris* L.: Composition and Activity Against *Aedes aegypti* Larvae. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 5, p. 1911-1915, 2015.

PIÑA-VÁZQUEZ, D. M.; MAYORAL-PEÑA, Z.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.; SALAZAR_x005f OLIVO, L. A.; ARELLANO-CARBAJAL, F. Anthelmintic Effect of *Psidium guajava* and *Tagetes erecta* on Wild-type and Levamisole-resistant *Caenorhabditis elegans* strains. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 202, p. 92-96, 2017.

PITASAWAT, B.; CHOOCHOTE, W.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; JITPAKDI, A.; CHAITONG, U. Screening for Larvicidal Activity of Ten Carminative Plants. **Southwest Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 29, n. 3, p. 660-662, 1998.

PRICHARD, R. How do Anthelmintic Drugs Work? **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 1, p. 5-7, 1997.

PRICHARD, R. K. Genetic Variability Following Selection of *Haemonchus contortus* with Anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 11, n. 9, p. 445-453, 2001.

QUINARÍ. **Óleo Essencial de Cravo**. Disponível em: <<https://www.quinari.com.br/loja/oleo-essencial-de-cravo/>>. Acesso em: 06 jan. 2022.

QUINARÍ. **Óleo Essencial de Tomilho**. Disponível em: <<https://www.quinari.com.br/loja/oleo-essencial-de-tomilho/>>. Acesso em: 06 jan. 2022.

RAMADAN, K. M. A.; ASHOUSH, I. S.; EL-BATAWY, O. I. Comparative Evaluation of Three Essential Oils as Functional Antioxidants and Natural Flavoring Agents in Ice Cream. **World Applied Sciences Journal**, v. 23, p. 159-166, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed.: Elsevier,

2003. 904 p.

RAPPLEYE, C. A.; PAREDEZ, A. R.; SMITH, C. W.; MCDONALD, K. L.; AROIAN, R. V. The Coronin-like Protein POD-1 is Required for Anterior-posterior Axis Formation and Cellular Architecture in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genes Development**, v. 13, p. 2838-2851, 1999.

ROBERTSON, A. P.; BJORN, H. E.; MARTIN, R. J. Resistance to Levamisole Resolved at the Single-channel Level. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 6, p. 749-760, 1999.

ROBERTSON, J. L.; RUSSELL, R. M.; PREISLER, H. K.; SAVIN, N. E. **Bioassays with Arthropods**. CRC Press, Boca Raton, 2007, 199 p.

ROMERO, M. C.; NAVARRO, M. C.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; VALERO, A. Peppermint (*Mentha piperita*) and Albendazole Against Anisakiasis in an Animal Model. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 12, p. 1430-1436, 2014.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. RStudio Inc., Boston, MA. Disponível em: <<http://www.rstudio.com>, 2015>. Acesso em: 05 jan. 2022.

RUVKUN, G. & HOBERT, O. The Taxonomy of Developmental Control in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2033-2041, 1998.

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.

SANGWAN, N. S.; FAROOQUI, A. H. A.; SHABIH, F. SANGWAN, R. S. Regulation of Essential Oil Production in Plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

SCHIERENBERG, E. & JUNKERSDORF B. The Role of Eggshell and Underlying Vitelline Membrane for Normal Pattern Formation in the Early *C. elegans* Embryo. **Roux Archives of Development Biology**, v. 202, n. 1, p. 10-16, 1992.

SEPÚLVEDA-CRESPO, D.; REGUERA, R. M.; ROJO-VÁZQUEZ, F.; BALAÑA-FOUCE, R.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Drug Discovery Technologies: *Caenorhabditis elegans* as a Model for Anthelmintic Therapeutics. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 5, p. 1715-1753, 2020.

SHEN, B. A new Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.

SHOOP, W & SOLL, M. **Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy**. Cabi, 2002. 448p.

SHOOP, W.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and Activity of Avermectins and Milbemycins in Animal Health. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 139-156, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. MENTZ, L. A. **Pharmacognosy: From Plant to Medicine**. Porto Alegre/Florianópolis, ed. University/UFRGS/Ed.UFSC, 2001, 833 p.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Coletiva de Imprensa - Radar Pet 2021 - Mercado Pet na Pandemia**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br>>. Acesso em: 10 dez. 2021a.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Mercado de Saúde Animal 2020**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br>>. Acesso em: 10 dez. 2021b.

SINGH, G.; MAURYA, S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. Chemical Constituents, Antimicrobial Investigations and Antioxidative Potential of Volatile Oil and Acetone Extract of Star Anise Fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 111-121, 2006.

SINGH, N. K.; JYOTI, ; VEMU, B.; NANDI, A.; SINGH, H.; KUMAR, R.; DUMKA, V. K. Acaricidal Activity of *Cymbopogon winterianus*, *Vitex negundo* and *Withania somnifera* Against Synthetic Pyrethroid Resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 341-350, 2014a.

- SINGH, N. K.; JYOTI, ; VEMU, B.; NANDI, A.; SINGH, H.; KUMAR, R.; DUMKA, V. K. Laboratory Assessment of Acaricidal Activity of *Cymbopogon winterianus*, *Vitex negundo* and *Withania somnifera* Extracts Against Deltamethrin Resistant *Hyalomma anatolicum*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, n. 3, p. 423-430, 2014b.
- SINTHUSIRI, J. & SOONWERA, M. Oviposition Deterrent and Ovicidal Activities of Seven Herbal Essential Oils Against Female Adults of Housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 3015-3022, 2014.
- SMITH, A. Screening for drug discovery: The leading question. **Nature**, v. 418, p. 453-455, 2002.
- STEIN, K. K. & GOLDEN, A. The *C. elegans* Eggshell. In: **Wormbook**, 2018.
- STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. In: **Wormbook**, 2006.
- STRATTON, C. F.; NEWMAN, D. J.; TAN, D. S. Cheminformatic Comparison of Approved Drugs from Natural Product versus Synthetic Origins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 21, p. 4802-4807, 2015.
- SULSTON, J. E.; SCHIERENBERG, E.; WHITE, J. G.; THOMSON, J. N. The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 100, n. 1, p. 64-119, 1983.
- TALBERT, R. & WALL, R. Toxicity of Essential and Non-essential Oils Against the Chewing louse, *Bovicola (Werneckiella) ocellatus*. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 831-835, 2012.
- THOMFORD, N. E; SENTHEBANE, D. A; ROWE A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYL, A.; DZOBO, K.. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1, n. 96, 2018.
- VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* Resistance to Monepantel in Sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 3-4, p. 278-280, 2015.
- VERA, S. S.; ZAMBRANO, D. F.; MÉNDEZ-SANCHEZ, S. C.; RODRÍGUEZ-SANABRIA, F.; STASHENKO, E. E.; DUQUE L., JONNY E. Essential Oils with Insecticidal Activity Against Larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, 2647-2654, 2014.
- VERCRUYSSE, J. & CLAEREBOUT, E. Treatment vs Non-treatment of Helminth Infections in Cattle: Defining the Threshold. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 195-214, 2001.
- VIA AROMA. **Laudo Cromatográfico: OE Anis Estrelado**. Disponível em: <<http://www.viaaroma.com.br/wp-content/uploads/2019/11/OE-ANIS-ESTRELADO-VIA-AROMA.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2022.
- VIA AROMA. **Laudo Cromatográfico: OE Citronela**. Disponível em: <<http://www.viaaroma.com.br/wp-content/uploads/2019/11/OE-CITRONELA-VIA-AROMA.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2022.
- VIA AROMA. **Laudo Cromatográfico: OE Gerânio**. Disponível em: <<http://www.viaaroma.com.br/wp-content/uploads/2019/11/OE-GERANIO-VIA-AROMA.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2022.
- VIA AROMA. **Laudo Cromatográfico: OE Lemongrass**. Disponível em: <<http://www.viaaroma.com.br/wp-content/uploads/2019/11/OE-LEMONGRASS-VIA-AROMA.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2022.
- VIANA, F. A. B. **Fundamentos da Terapêutica Veterinária**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 222 p.
- VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VIVEIROS, C. T. **Parasitoses Gastrointestinais em Bovinos na Ilha de S. Miguel, Açores –**

Inquéritos de Exploração, Resultados Laboratoriais e Métodos de Controle. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária.

WU, L.; HUO, X.; ZHOU, X.; ZHAO, D.; HE, W.; LIU, S.; LIU, H.; FENG, T.; WANG, C. Acaricidal Activity and Synergistic Effect of Thyme Oil Constituents against Carmine Spider Mite (*Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval)). **Molecules**, v. 22, n. 11, 2017.

ZUANAZZI, J. A. S. & MAYORGA, P. Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.