

## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Anethum graveolens* E *Cominum cyminum* FRENTE À ECLODIBILIDADE DE OVOS DE *Ancylostoma* sp.**

VICTORIA DE MORAES GONÇALVES<sup>1</sup>; ROSARIA HELENA MACHADO AZAMBUJA; MARCO AURÉLIO ZIEMANN SANTOS; SUSLIN RAATZ THIEL; MARLETE BRUM CLEFF<sup>2</sup>; ROGÉRIO ANTONIO FREITAG<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção-UFPel-  
victoriahgoncalves@hotmail.com

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção-UFPel-rosariahmz@terra.com.br

<sup>2</sup>Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos-UFPel; Departamento de Clínicas Veterinárias-FAVET-UFPel

<sup>3</sup>Departamento de Química Orgânica-CCQFA-UFPel-rafreitag@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Os ancilostomídeos são helmintos nematódeos pertencentes à família Ancylostomatidae, sendo o *Ancylostoma caninum* e o *Ancylostoma braziliense*, agentes etiológicos da ancilostomíase canina e da Larva Migrans Cutânea -LMC no homem (URQUHART, 1998). Esses parasitas intestinais de cães e gatos, não são capazes de concluir o seu ciclo biológico na espécie humana, portanto suas larvas infectantes migram através do tecido subcutâneo causando uma dermatite serpiginosa denominada de Larva Migrans Cutânea, o que caracteriza uma zoonose de importância na saúde pública (NEVES *et al.*, 2011; LIMA, 2005).

No hospedeiro definitivo essas espécies levam a uma parasitose intestinal acometendo animais jovens até um ano de idade, e filhotes devido às infecções lactogênicas. A distribuição é universal em regiões tropicais e subtropicais, estando associado a áreas sem saneamento, áreas de recreação como praças e parques, cujas populações têm como hábito andar descalças (XAVIER, 2006; GALLINA *et al.*, 2011). Além da alta prevalência do nematódeo observamos o fenômeno adaptativo de resistência aos anti-helmínticos, dificultando o controle assim como o tratamento (ANDRADE, 2008; KOPP, 2008).

Diante dessa problemática, dos aspectos abordados e da vulnerabilidade de animais e humanos expostos ao parasita, medidas de controle são muito importantes na prevenção de infecções. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade *in vitro* de óleos essenciais sobre a eclodibilidade de ovos do gênero *Ancylostoma* sp., helminto gastrintestinal de cães, com foco na bioprospecção para o desenvolvimento de novos bioprodutos com ação antiparasitária, juntamente com a redução da contaminação ambiental e principalmente o risco de zoonoses para o homem (SANTOS 2013; HOFSTÄTTER, 2013).

### **2. METODOLOGIA**

#### **2.1 Extração do óleo essencial**

Para a extração do óleo essencial foram utilizadas 100 g de planta em 1500 mL de água destilada, assim o processo de extração se deu através da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger durante 4 horas.

## 2.2 Análise cromatográfica dos óleos essenciais

Submeteu-se o óleo essencial obtido anteriormente à análise cromatográfica em um equipamento GC/MS Schimadzu QP2010, equipado com injetor split/splitless com uma coluna capilar Rtx-5MS RESTEK (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), nas seguintes condições cromatográficas: gás carreador Hélio, fragmentos obtidos por impacto de elétrons na energia de 70 eV, vazão de 1,2 mL/min, split 1:10, volume injetado de amostra 1 µL. Temperatura programada do forno: a temperatura inicial foi de 40°C, com rampa de aquecimento em 5°C/min até 280°C ficando estável nessa temperatura por 10 minutos, com tempo total de 58 minutos, sendo a temperatura do injetor de 58°C e interface 200°C, os compostos foram analisados com base na biblioteca NIST08 do GC/MS. O preparo das amostras para análise qualitativa dos compostos bioativos presentes nos óleos envolve apenas a solubilização de aproximadamente 25 mg do óleo essencial em 5 mL de hexano (grau analítico, ultra puro).

## 2.3 Coleta e preparo das amostras

As amostras fecais foram obtidas através da coleta ambiental de fezes de cães adultos não vermifugados alojados no Canil do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFPel, sendo armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados e processadas no Laboratório de Helmintologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia-UFPel.

A positividade das amostras fecais para ovos de *Ancylostoma spp.* foi determinada através da técnica parasitológica de Willis Mollay, sendo as amostras positivas recuperadas através de maceração, diluição em água destilada e passagem através de quatro tamises, dispostos em ordem decrescente de abertura de malha (1 mm, 105µm, 55 µm, 25 µm), segundo Ueno e Gonçalves (1998). Os ovos foram recuperados do último tamis, diluídos em água destilada e quantificados três vezes a partir de uma alíquota de 50µl da suspensão.

## 2.4 Teste de eclodibilidade dos ovos de *Ancylostomas sp.*

O teste de eclodibilidade foi realizado em placas de microcultivo de 24 poços, onde foram distribuídas seis concentrações do óleo essencial variando de 0,07 a 2,5%, juntamente com a suspensão contendo aproximadamente 120 ovos do parasita. O ensaio foi acompanhado de um controle positivo contendo o anti-helmíntico tiabendazole na concentração de 0,025 mg/mL, e um controle negativo com água destilada.

Todas as concentrações foram testadas em quadruplicata e as placas foram fechadas com filme plástico e incubadas em estufa a 28°C com 80% de umidade relativa, durante 36h. A leitura das placas foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz invertida, sendo que a leitura iniciou pelo controle negativo, seguido pelo positivo e das placas com o óleo essencial.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Extração do óleo essencial

O rendimento obtido para extração do óleo essencial do endro e do cominho foi de 1,2 e 1,5 mL a cada 100 gramas de planta seca submetida à extração. Considerando que o rendimento de outros óleos essenciais expressos na literatura estão em torno de 0,8 mL/100 gr obteve-se rendimentos significativos, sendo favoráveis a se dar continuidade às pesquisas.

### 3.2 Análise cromatográfica dos óleos essenciais

Na tabela a seguir estão relacionados os compostos com potencial bioativo encontrado durante as análises cromatográficas, com base na biblioteca NIST08 do GC/MS, onde pode-se observar o pico 8 correspondente a carvona, como majoritário para a amostra de endro, e o pico 18 correspondente ao cumaldeído como pico majoritário para o óleo de cominho. Observa-se ainda que mesmo as plantas sendo da mesma família, apresentam uma composição química diferenciada entre elas. O fato pode ser explicado se levarmos em conta uma série de fatores que interferem na composição fitoquímica durante a produção dos metabólitos especializados produzidos pelas plantas, como, temperatura, luminosidade, sazonalidade, horário da colheita, fornecimento de água além da nutrição.

**Tabela 1:** Relação entre os tempos de retenção  $t_R$  e os compostos encontrados na análise dos óleos.

<i>Anethum graveolens</i> - endro				<i>Cominou cyminum</i> - cominho			
Pico	(%)	$t_R$ (min)	Composto	Pico	(%)	$t_R$ (min)	Composto
1	18,65	6,46	D-limoneno	4	14,38	5,65	$\beta$ -pineno
3	7,16	9,07	cis/trans	8	13,23	6,37	o-cimeno
4	16,67	9,20	dihidrocarvona	9	1,61	6,44	D-limoneno
8	34,39	9,78	carvona	11	18,77	6,91	$\gamma$ -terpineno
10	21,71	14,70	apiol	18	30,86	9,72	cumaldeído
				19	8,07	10,35	2-careen-10-al
				20	7,57	10,43	fenilbutanol

### 3.3 Teste de eclodibilidade dos ovos de *Ancylostoma* sp.

Os controles positivos do óleo de endro e cominho demonstraram 100% de inibição de eclodibilidade, enquanto os controles negativos dos óleos apresentaram um percentual médio de eclodibilidade de 94% e 94,52%, respectivamente demonstrando uma boa viabilidade dos ovos. Para o óleo essencial de endro as melhores concentrações foram 2,5% e 1,25% obtendo os percentuais de inibição da eclodibilidade de 70,19% e 62,52%, na devida ordem, já as concentrações de 0,62%, 0,31%, 0,15% e 0,07% ficaram abaixo de 50%. O óleo de cominho, no teste *in vitro*, obteve melhores percentuais de inibição da eclodibilidade, em relação ao endro, sendo a melhor concentração a 2,5% que alcançou 100% de inibição da eclodibilidade dos ovos do parasito, seguido pelas demais concentrações sempre com percentual superior a 90% de inibição.

## 4. CONCLUSÕES

O resultado do teste *in vitro* demonstrou que os óleos essenciais de *Anethum graveolens* e *Cominum cyminum* possuem ação na inibição da eclodibilidade dos ovos de *Ancylostoma* sp., sendo a ação do óleo de cominho superior ao de endro apresentando um resultado favorável em todas as concentrações testadas, sendo sempre superior a 90% de ação inibitória. Conclui-se ainda, que os óleos testados podem ser promissores para o controle ambiental desta parasitose, uma vez que o ambiente é a principal fonte de infecção, tanto para o homem que desenvolve a Larva Migrans Cutânea, quanto para o hospedeiro definitivo, o cão que desenvolve a ancilostomose e perpetua o ciclo do

parasito, desta forma são necessários novos estudos para a determinação da toxicidade.

## 5. AGRADECIMENTOS



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Silvia Franco. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008. 936p.

**Farmacopéia Brasileira**. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988. Parte 1, v.4.

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

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

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

LIMA, Walter dos Santos. Larva migrans. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.p.271-284.

NEVES, David Pereira; MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marcos; VITOR, Ricardo W. Almeida **Parasitologia Humana**. 12 ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 548p.

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

UENO, Hakaru. & GONÇALVES, Pedro Cabral **Manual para Diagnóstico das helmintoses de Ruminantes**, 4<sup>o</sup> Ed. Tokyo, Japão.

URQUHART, G.M. et al. **Parasitologia Veterinária**.2 ed. São Paulo: Guanabara, 1998.

XAVIER, Graciela Augusto. **PREVALÊNCIA DE ENDOPARASITOS EM CÃES DE COMPANHIA EM PELOTAS-RS E RISCO ZONÓTICO**. 2006. 73f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas, área de concentração em Meio Ambiente do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas –RS.