

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia



Dissertação

Atividade antiparasitária de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens*, *Citrus aurantium* e *Cuminum cyminum* em *Fasciola hepatica*

Alexia Brauner de Mello

Pelotas, 2022

Alexia Brauner de Mello

Atividade antiparasitária de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens*, *Citrus aurantium* e *Cuminum cyminum* em *Fasciola hepatica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas com concentração de conhecimentos em Parasitologia.

Orientadora: Nara Amélia Farias
Co-orientadora: Camila Belmonte Oliveira

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M527a Mello, Alexia Brauner de

Atividade antiparasitária de óleos essenciais de
Pelargonium graveolens, *Citrus aurantium* e *Cuminum*
cyminum em *Fasciola hepatica* / Alexia Brauner de Mello ;
Nara Amélia Farias , Camila Belmonte Oliveira ,
orientadoras. — Pelotas, 2022.

74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia,
Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Fitoterapia. 2. Parasitoses. 3. Ruminantes. 4.
Trematódeos. 5. Histologia. I. , Nara Amélia Farias, orient.
II. , Camila Belmonte Oliveira, orient. III. Título.

CDD : 616.96

Alexia Brauner de Mello

Atividade antiparasitária de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens*, *Citrus aurantium* e *Cuminum cyminum* em *Fasciola hepatica*

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 03 de junho de 2022

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Nara Amélia Farias (Orientador)

Doutora em Biologia Parasitária, Instituto Oswald Cruz, Rio de Janeiro (IOC/FIOCRUZ)

.....
Dr. Maria Elisabeth Aires Berne

Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

.....
Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)

.....
Dr. Lucas Trevisan Gressler

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Agradecimentos

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

Resumo

DE MELLO, Alexia Brauner. **Atividade antiparasitária de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens*, *Citrus aurantium* e *Cuminum cyminum* em *Fasciola hepatica***. Orientadora: Nara Amélia Farias. 2022. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) é um parasito que acomete o fígado e ductos biliares de diversas espécies, comumente diagnosticada em ruminantes. A fasciolose consiste entre uma das mais importantes doenças parasitárias na saúde animal, causando grandes perdas econômicas no Brasil e no mundo. Os relatos de resistência do trematódeo diante aos fármacos utilizados, enfatizam a necessidade pela busca de produtos alternativos para tratamento desta enfermidade. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* ovicida e adulticida dos óleos essenciais (OEs) de *Citrus aurantium*, *Pelargonium graveolens* e *Cuminum cyminum* em *Fasciola hepatica*. Para a realização do experimento, os trematódeos adultos foram coletados diretamente do fígado de bovinos positivos no exame *post mortem*. No teste ovicida, os ovos foram obtidos através da imersão de adultos em solução salina e posteriormente foram incubados juntamente com os óleos testados e os grupos controles: albendazole, nitroxinil, controle água destilada e Tween® 80. As concentrações dos óleos essenciais para teste em ovos variaram entre 4,5 e 0,03125 mg/ml. Para o teste adulticida, as formas adultas de *F. hepatica*, foram incubadas com o meio RPMI e óleos essenciais sob diferentes concentrações, variando entre 0,0675 e 0,031125 mg/mL e então observadas durante 24h pós-tratamento, bem como os grupos controle: albendazole, nitroxinil, meio RPMI e Tween® 80. Posteriormente os espécimes adultos foram fixados por imersão em solução de formalina a 10% tamponada durante 24 horas para serem processadas para histologia. Nos resultados foi observado a eficácia de 100% dos óleos essenciais sobre ovos do trematódeo, em todas as concentrações testadas no teste de eclosão. Para adultos, os OEs de *P. graveolens* e *C. cyminum* mostraram eficácia total (100%) em menor tempo, se comparado ao óleo de *C. aurantium*. Nas análises histológicas observou-se diferentes alterações nas camadas do tegumento de adultos tratados com OEs, como a modificação e destruição dos espinhos. Pelos resultados obtidos neste estudo, os óleos essenciais de *P. graveolens*, *C. aurantium* e *C. cyminum* apresentam um potencial fasciolicida.

Palavras-chave: Fitoterapia. Parasitoses. Ruminantes. Trematódeos. Histologia.

Abstract

DE MELLO, Alexia Brauner. **Antiparasitic activity of essential oils from *Cuminum cyminum*, *Citrus aurantium* and *Pelargonium graveolens* on *Fasciola hepatica*.** Advisor: Nara Amélia Farias. 2022. 74 f. Dissertation (Masters in Biological Sciences) - Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) is a parasite that affects the liver and bile ducts of several species, commonly diagnosed in ruminants. Fasciolosis is one of the most important parasitic diseases in animal health, causing great economic losses in Brazil and worldwide. The reports of trematode resistance to the drugs used emphasize the need to search for alternative products for the treatment of this disease. Therefore, the present study aimed to evaluate the in vitro ovicidal and adulticidal activity of essential oils (EOs) from *Citrus aurantium*, *Pelargonium graveolens* and *Cuminum cyminum* in *Fasciola hepatica*. To carry out the experiment, adult trematodes were collected directly from the liver of positive bovines in the post-mortem examination. In the ovicidal test, eggs were obtained by immersing adults in saline solution and subsequently incubated together with the tested oils and the control groups: albendazole, nitroxinil, distilled water control and Tween® 80. The concentrations of essential oils for testing in eggs ranged from 4.5 to 0.03125 mg/ml. For the adulticidal test, the adult forms of *F. hepatica* were incubated with RPMI medium and essential oils under different concentrations, ranging from 0.0675 to 0.031125 mg/mL and then observed for 24h post-treatment, as well as the control groups: albendazole, nitroxinil, RPMI medium and Tween® 80. Subsequently, the adult specimens were fixed by immersion in a 10% buffered formalin solution for 24 hours to be processed for histology. The results showed the effectiveness of 100% of the essential oils on trematode eggs, at all concentrations tested in the hatching test. For adults, the EOs from *P. graveolens* and *C. cyminum* showed total efficacy (100%) in a shorter time compared to *C. aurantium* oil. In the histological analysis, different alterations were observed in the integument layers of adults treated with OEs, such as the modification and destruction of the spines. Based on the results obtained in this study, the essential oils of *P. graveolens*, *C. aurantium* and *C. cyminum* have a fasciocidal potential.

Keywords: Phytotherapy. Parasitosis. Ruminants. Trematode. Histology.

Lista de figuras

- Figura 1 Ciclo biológico *Fasciola hepatica*..... 15
- Figura 2 (I) Graph of adulticidal survival measured over time on *Pelargonium graveolens* essential oil treatment compared to controls. lozenge icon: *P. graveolens* 0.0675 mg/ml; Filled square icon: *P. graveolens* 0.03375 mg/ml; Hollow square icon: negative control; triangle icon: Albendazole; Circle icon: nitroxinil. (II) Graph of adulticidal survival measured over time on Citrus aurantium essential oil treatment compared to controls. Hexagon icon: *C. aurantium* 0.06375 mg/ml; asterisk icon: *C. aurantium* 0.031875 mg/ml; Hollow square icon: negative control; triangle icon: Albendazole; Circle icon: nitroxinil..... 34
- Figura 3 Histopathology *Fasciola hepatica*. (I) Negative Control – Tegument syncytium presenting a homogeneous appearance and internalized spines (arrow) and externalized spines (arrowhead). HE. 200 X. (II) Negative Control – Syncytium of the tegument presenting a homogeneous aspect with internalized spines (arrow) and externalized spines (arrowhead). Integument (T). Basal lamina (white arrow). Muscle layer (M). HE. 200 X. (III) *C. aurantium* 0.031875 mg/mL – Accumulation of fluid in the tegumental syncytium region, forming vacuoles (arrowhead). Enlarged internalized spines (arrow). HE. 200 X. (IV) *C. aurantium* 0.06375 mg/mL – Marked accumulation of fluid in the tegumental syncytium giving this region a spongy appearance. Note the formation of a large vesicle (arrow). The epithelial lining cells of the cecum and testis are dissolved, leaving only the supporting basal lamina (*). HE. 200 X. (V) *P. graveolens* 0.03375 mg/mL – Marked vacuolization in the tegumental syncytium with extensive clear areas, often forming vacuoles around the spines (arrowhead). Only the basal lamina supporting the cecum and testis remains (*). HE. 200 X. (VI) *P. graveolens* 0.0675 mg/mL – Spines increased in size (arrow) and covered by a bubble (arrowhead). HE. 200 X (VII) Albendazole – Marked accumulation of

fluid in the basal lamina (arrowhead) and muscular layer (arrow). Discrete vacuolization in the tegumental syncytium. From the cecum and testis, only the basal lamina cell support (*) remained. HE. 200 X. (VIII) Albendazole – Basal lamina very evident due to marked accumulation of fluid (arrowhead). Muscle fibers with the appearance of dissolved by the accumulation of fluid in the muscle layer (arrow). HE. 200 X. (IX) Nitroxinil – Vacuolization in the inner layer of the tegumental syncytium immediately above the basal lamina (arrow). Superficial and deep muscular layer with a large number of vesicles (arrowhead). HE. 200 X. (X) Nitroxinil – Vacuolation around the spines (arrow). Vacuolation in the muscular layer (arrowhead). HE. 200 X..... 35

Figura 4 Histopatologia *Fasciola hepatica*. (I) Controle Negativo – Sincício do tegumento apresentando aspecto homogêneo e espinhos externalizados (cabeça de seta). Sincício do tegumento apresentando aspecto homogêneo com poucos espinhos internalizados (seta). 200 X. (II) Nitroxinil – Vacuolização na camada interna do sincício tegumental imediatamente acima da lâmina basal e ao redor dos espinhos (seta). Camada muscular superficial e profunda apresentando vesículas (cabeça de seta. HE. 200 X. (III) *C. cyminum* 0,031125 mg/mL – Marcada vacuolização próximo à lâmina basal do sincicio tegumental formando grandes vesículas (cabeça da seta). Espinhos internalizados aparentemente normais rodeados por microvesículas (seta). Células do ceco e testis desapareceram restando apenas a lâmina basal (*). HE. 200X. (IV) *C. cyminum* 0,06225 mg/mL – Espinho internalizado (cabeça da seta) rodeado por microvesículas. Grande vesícula se estendendo desde a lâmina basal até próximo à membrana externa do sincício tegumental (seta). HE. 200X..... 52

Lista de Tabelas

Tabela 1	The percentage of eggs hatched after the incubation of the essential oil of <i>Pelargonium graveolens</i> from <i>F. hepatica</i> eggs and the percentage of ovicidal action at the different concentrations tested. All tested groups had significant differences ($p<0.05$) in relation to the control group.....	33
Tabela 2	The percentage of eggs hatched after the incubation of <i>Citrus aurantium</i> essential oil from <i>F. hepatica</i> eggs and the percentage of ovicidal action at the different concentrations tested. All tested groups had significant differences ($p<0.05$) in relation to the control group.....	33
Tabela 3	Percentage of viability of MDBK cells (Madin-Darby-Bovine-Kidney) against different concentrations of EOs of PEG and CAM.....	36
Tabela 4	Cromatografia do Óleo essencial de <i>C. cuminum</i>	50
Tabela 5	A porcentagem de ovos eclodidos após a incubação do óleo essencial de <i>Cuminum cyminum</i> em ovos de <i>Fasciola hepatica</i> e a porcentagem da ação ovicida nas diferentes concentrações testadas. Todos os grupos testados tiveram diferenças significativas ($p<0,05$) em relação ao grupo controle.....	51
Tabela 6	A porcentagem de ovos eclodidos após a incubação do controle negativo, controle positivo (Nitroxinil) e Tween® 80 de ovos de <i>Fasciola hepatica</i> . O controle positivo testado apresentou diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo controle.....	51

Lista de abreviaturas e siglas

AL	Albendazole
CAM	<i>Citrus aurantium</i>
CN	Controle Negativo
CYM	<i>Cuminum cyminum</i>
EO	Essential Oil
Eos	Essential Oils
HD	Hospedeiro Definitivo
HE	Hematoxilina-eosina
HI	Hospedeiro Intermediário
MDBK	Madin-Darby-Bovine-Kidney
NC	Negative Control
NIT	Nitroxinil
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
PEG	<i>Pelargonium graveolens</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
T	Tween® 80 1%
TCBZ	Triclabendazole

Sumário

1. Introdução.....	11
1.1 Objetivos.....	12
1.1.1 Objetivos gerais	12
1.1.2 Objetivos específicos	12
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 Taxonomia e morfologia de <i>Fasciola hepatica</i>	14
2.2 Ciclo biológico	15
2.3 Histórico e distribuição da fasciolose no Brasil	17
2.4 Patologia e sinais clínicos	18
2.5 Diagnóstico	19
2.6 Tratamento.....	20
2.7 Resistência	21
2.8 Controle	22
2.9 Óleos essenciais.....	23
2.9.1 Óleo essencial de <i>Pelargonium graveolens</i>	24
2.9.2 Óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i>	25
2.9.3 Óleo essencial de <i>Cuminum cyminum</i>	26
3. Manuscrito	28
4. Manuscrito	45
5. Considerações finais	59
Referências.....	60

1. Introdução

O trematoda *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), é um parasito do fígado e ductos biliares de diferentes espécies de animais, sendo mais comum em bovinos, ovinos, equinos, coelhos, roedores e ocasionalmente no ser humano (QUEIROZ *et al.* 2002; TRIVILIN *et al.* 2013; GUIMARÃES, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde a fasciolose faz parte da lista de doenças tropicais negligenciadas em humanos (OMS, 2010).

O parasito é conhecido principalmente pelo seu impacto na produtividade de ruminantes (MAS-COMA *et al.* 2018). Estima-se que 250 milhões de ovinos e 350 milhões de bovinos estão em ameaça em todo o mundo (BEESLEY *et al.* 2017). Sua grande importância veterinária ocorre principalmente por causar perdas econômicas consideráveis, devido ao quadro sistêmico que acaba por levar a quedas na produção leiteira, menor rendimento de carcaça e também a condenação de fígados durante o abate (MAS-COMA *et al.* 1999; JACOBS *et al.* 2015). A fasciolose provoca grandes perdas econômicas na pecuária, além de impactar severamente na saúde pública (PILE, *et al.* 2001; MEHMOOD *et al.* 2017).

No Brasil, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste, verifica-se a alta prevalência dessa parasitose nos rebanhos bovinos e ovinos, devido às condições climáticas que favorecem a reprodução do hospedeiro intermediário e, consequentemente, a manutenção do trematódeo nessas regiões (MATTOS *et al.* 1997; OLIVEIRA *et al.* 2007). A prevalência da fasciolose bovina no Brasil pode alcançar até 91%, com destaque para os estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Ainda, no Rio Grande do Sul pode levar a uma redução de até 6% no peso de carcaça, representando valor significativo nas perdas econômicas (MOLENTO; PRITSCH, 2018).

O controle da fasciolose é realizado com a utilização de medicamentos anti-helmínticos (GIL *et al.* 2014; NOVA *et al.* 2014; KELLEY *et al.* 2016). No entanto, o uso intensivo destes fármacos em ruminantes resultou no desenvolvimento de resistência do parasito. Diversos episódios de ineficácia terapêutica são relatados frente a *F. hepatica* em todo o mundo (BOWMAN, 2010; FAIRWEATHER, 2011; KEELEY *et al.* 2016). Visto isso, a prospecção por compostos naturais em substituição aos tratamentos sintéticos, justificam a busca da fitoterapia como alternativa para controle de diversas helmintoses (ALMEIDA *et al.* 2012).

Diante desta problemática, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade *in vitro* de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* (Gerânio), *Citrus aurantium* (Laranja-Azeda) e *Cuminum cyminum* (Cominho) em ovos e adultos de *Fasciola hepatica*, através do nível de desenvolvimento dos ovos e da análise da morfologia, bem como a motilidade e alterações tegumentares dos helmintos adultos do trematódeo, em busca de um medicamento específico e seguro.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

Avaliar a eficácia *in vitro* e alterações tegumentares ocasionadas pelos óleos essenciais de *Citrus aurantium* (Laranja-Azeda), *Pelargonium graveolens* (Gerânio) e *Cuminum cyminum* (Cominho) em ovos e adultos de *Fasciola hepatica*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade dos óleos essenciais contra os ovos através da inibição do seu desenvolvimento;
- Avaliar a atividade dos óleos essenciais em adultos, por meio da sua motilidade após diferentes tempos de exposição;

- Analisar as alterações no tegumento dos espécimes adultos tratados com os óleos essenciais, mediante análise histologia;
- Avaliar e comparar a eficácia dos óleos testados com os fármacos fasciolícidias;
- Determinar a citotoxicidade dos compostos utilizados, em cultivo celular.

2. Revisão de Literatura

2.1 Taxonomia e morfologia de *Fasciola hepatica*

O trematódeo *Fasciola hepatica*, classificado por Linnaeus em 1758, é causador de zoonose (BOWMAN, 2006; BOWMAN, 2014). Pertence ao Reino Animalia, Filo Platyhelminthes, Sub-Classe Digenea, Classe Trematoda, Família Fasciolidae e Sub-Família Fasciolinae (YAMAGUTI, 1961).

O trematódeo adulto possui formato foliáceo, achatado dorso-ventralmente, medindo de 2,5 a 3,5 centímetros (cm) de comprimento, 1 cm de largura e cerca de 3 milímetros (mm) de espessura (TAYLOR *et al.* 2017). Possui duas ventosas musculares para auxiliar na fixação ao hospedeiro, sendo uma ventosa oral anterior e uma ventosa ventral localizada na base do cone cafálico (BARUCH, 2005). Seu esôfago é desenvolvido e dividido em cecos ramificados estendendo-se para a parte posterior (CARRADA-BRAVO; ESCAMILLA, 2005). Sua superfície corpórea serve para absorção e apresenta-se coberta por espinhos, que auxiliam na fixação nos ductos de seu hospedeiro definitivo, promovendo proteção e facilitando a locomoção do trematódeo (GUIMARÃES, 2016). Os órgãos ficam localizados no parênquima, apresentando cecos intestinais ramificados, testículos e ovários multiramificados (TAYLOR *et al.* 2017). Os testículos são dendríticos e cobrem dois terços da porção posterior. O ovário é pequeno e dendrítico, situado anteriormente ao testículo anterior, enquanto o útero é curto e localizado anteriormente ao ovário. O poro genital está localizado anterior à ventosa ventral. Vitellaria são dendríticas e espalhadas em ambos os campos laterais do corpo (BELDING, 1965).

Os ovos são constituídos por um óvulo fertilizado, contendo células vitelínicas e rodeado por um envoltório protéico (BOWMAN, 2006; HUSSEIN *et al.* 2010). Medem cerca de 130-180 micrômetros (μm) de comprimento por 60-100 μm de largura (OJEDA-ROBERTOS, 2021). Possuem forma elíptica, cor amarelada, casca fina e são operculados (BOWMAN, 2006).

2.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico é do tipo heteroxeno e possui formas livres, sendo assim, dependente das condições ecológicas para o seu desenvolvimento (JACOBS *et al.* 2015). Para Dalton (2021) o ciclo de vida de *F. hepatica* consiste em cinco fases básicas (Figura 1): 1º a passagem dos ovos do hospedeiro para o ambiente externo e seu posterior desenvolvimento; 2º a eclosão de miracídios e sua busca e penetração no hospedeiro intermediário (HI), geralmente molusco do gênero *Lymnaea*; 3º desenvolvimento e multiplicação dos parasitas no interior do HI; 4º emergência das cercárias dos HI e seu encistamento e 5º ingestão de metacercárias infectantes pelos hospedeiros finais e desenvolvimento para vermes adultos (DALTON, 2021)

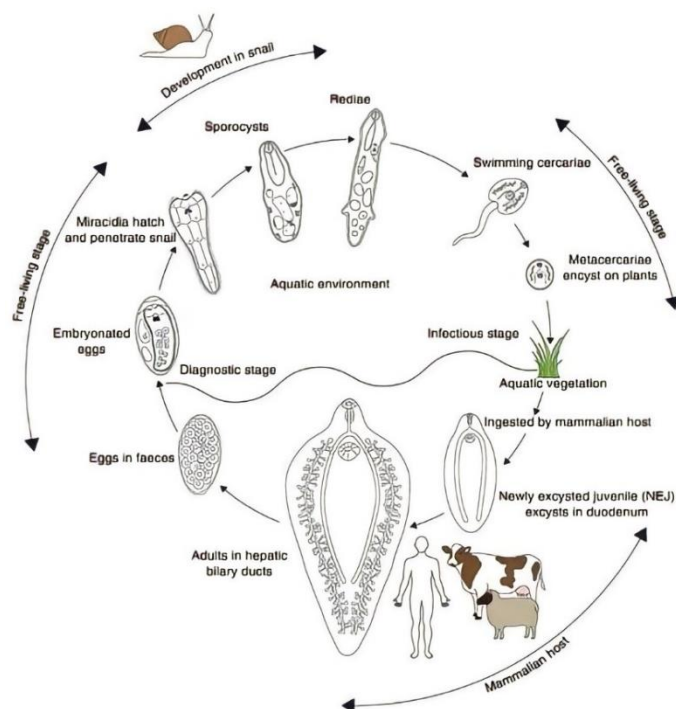


Figura 1 – Ciclo biológico *Fasciola hepatica*.
Fonte: DALTON, 2021 (Desenhado por FivePrime Desing).

Explorando mais sobre o ciclo, o mesmo começa quando o hospedeiro definitivo excreta ovos não embrionados nas fezes. Desde que estejam em ambiente úmido, estes ovos passam por um desenvolvimento embrionário, dando origem a um miracídio, processo que dura cerca de duas semanas (TAYLOR *et al.* 2018). Logo, esse miracídio sairá do ovo, com a ajuda do opérculo e, com auxílio de seus cílios, buscará o HI (CARRADA-BRAVO, 2007).

O miracídio na água penetra no molusco do gênero *Lymnaea* através de suas partes moles, perdendo seus cílios e se desenvolvendo em um esporocisto (GUIMARÃES, 2016).

Cada esporocisto dá origem de cinco a oito rédias que dão origem as rédias filhas e cercárias. Dessa forma, as cercárias saem do caramujo e se encistam nas lâminas de vegetais, logo abaixo do nível da água e transformam-se em metacercárias, forma infectante para o hospedeiro definitivo (TESSELE *et al.* 2013). Desde a infecção de um molusco com um miracídio até o desenvolvimento das metacercárias transcorre em torno de 6 a 7 semanas (TAYLOR *et al.* 2017)

Após a ingestão das metacercárias pelo hospedeiro definitivo estas desencistam no intestino delgado, migram através da parede intestinal, cruzam o peritônio e penetram na cápsula hepática, podendo permanecer por até quatro meses em migração pelo parênquima hepático até alojarem-se nos ductos biliares, onde vão se instalar e amadurecer, excretando ovos em 6 a 8 semanas, iniciando novamente o ciclo (BOWMAN, 2014). Os adultos maduros no fígado realizam a excreção de 20.000 a 50.000 ovos por dia (JACOBS *et al.* 2015).

O período pré-patente é de 10 a 12 semanas, já o período mínimo para completar o ciclo fica em volta de 17 a 18 semanas (BOWMAN, 2014). Por fim, um dos grandes sucessos em completar o seu ciclo biológico mencionado por Dalton (2021) se dá pela multiplicação que ocorre no HI. Segundo dados de um estudo realizado por Hodgkinson e colaboradores (2018) um caramujo infectado com um único miracídio pode gerar em torno de 500-800 metacercárias, característica importante para sua patogenicidade.

2.3 Histórico e distribuição da fasciolose no Brasil

A fasciolose tem a distribuição geográfica mais ampla entre as doenças helmínticas, e está presente em todos os continentes, com exceção da Antártida (MAS-COMA *et al.* 2019). Essa parasitose foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 1918, em ruminantes do Estado do Rio Grande do Sul (GUIMARÃES, 2016).

Segundo Molento e Pritsch (2018), a prevalência de *F. hepatica* em rebanhos no Brasil é considerada média. No entanto, a doença é considerada endêmica, principalmente nos estados do Sul e Sudeste, onde se tem mais de 65 milhões de cabeças, representando uma séria ameaça econômica.

O número de fígados descartados, condenados e a redução de peso de carcaças de animais, resultam em uma perda econômica brasileira de aproximadamente 210 milhões de dólares ao ano. O estado do Rio Grande do Sul apresenta destaque com maior perda econômica, com aproximadamente 147 milhões de dólares ao ano (MOLENTO; PRITSCH, 2018).

No Brasil, a notificação da fasciolose não é obrigatória, apenas 48 casos de infecção humana foram relatados em artigos científicos entre os anos de 1950 e 2016 (PRITSCH *et al.* 2018). O primeiro registro de fasciolose humana no Brasil foi em 1958 no Estado do Mato Grosso (GUIMARÃES, 2016). Novos relatos veem surgindo, como recentemente publicado por Pritsch e colaboradores (2019), apresentando o primeiro relato clínico de fasciolose humana no estado de Santa Catarina, Brasil.

A espécie *F. hepatica* possui distribuição cosmopolita, sendo encontrada principalmente em zonas temperadas e imperiosamente em áreas úmidas ou alagadiças (OLIVEIRA; SPOSITO FILHA, 2009; GUIMARÃES, 2016). Os principais estados brasileiros que apresentam casos descritos de fasciolose são Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Goiás (OLIVEIRA; SPOSITO FILHA, 2009; MOLENTO; PRITSCH, 2018).

2.4 Patologia e sinais clínicos

Segundo Sargison (2008) a patologia e consequentemente a relevância econômica da fasciolose é determinada pelo estágio de infecção e pelo número de trematódeos presentes no hospedeiro final. A fasciolose pode se apresentar de duas principais formas, a forma aguda e crônica (ECHEVARRIA, 2004).

A forma aguda é a menos comum e ocorre com ingestão de um grande número de metacercárias (acima 2.000). Manifesta-se cerca de seis semanas após a infecção (URQUHART *et al.* 1996). A manifestação ocorre devido às migrações realizadas por um grande número de formas infectantes pelo parênquima hepático, causando áreas de intensa hemorragia (BOWMAN, 2014).

A forma aguda raramente ocasiona morte em bovinos, no entanto para ovinos os índices de mortalidade são altos e a evolução ocorre em dias (ECHEVARRIA, 2004; CONCEIÇÃO, 2001; OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009).

A forma subaguda não é mencionada em toda literatura. Quando descrita, é caracterizada por ocorrer após a ingestão de 500 a 1.500 metacercárias durante um período mais longo de tempo (SARGISON, 2008). Esta forma da doença ocorre entre seis e dez semanas após a ingestão (URQUHART *et al.* 1996).

Semelhante ao que ocorre na forma aguda, na forma subaguda, as formas jovens do parasito seguem em migração para o fígado, enquanto parte destas atinge os ductos biliares causando fibrose. As hemorragias ocorrem como na fase aguda, porém, em menor proporção. São sinais clínicos a inapetência, dor abdominal, rápida perda de peso, anemia, ascite e depressão, podendo evoluir para morte súbita (SARGISON, 2008).

Por fim, a forma crônica da doença é causada pela ingestão moderada de metacercárias (200-500), sendo a forma mais comum da fasciolose e ocorre cerca de cinco meses após a infecção. O período crônico é importante em relação ao diagnóstico, pois o trematódeo em seu estado maduro, elimina os ovos através da bile, que podem ser contabilizados, permitindo o diagnóstico coprológico para indivíduos que apresentam condição crônica da doença (ESCALONA, 2012).

A doença crônica está relacionada ao comportamento alimentar dos vermes em seu estágio adulto, nos canais biliares do hospedeiro. Os sinais clínicos incluem

menor ganho de peso, redução da produção de leite, anemia, emaciação, edema submandibular e inchaço abdominal (SARGISON, 2008). Visto isso, a intensidade dos sintomas e os sinais clínicos são condicionados pela magnitude da carga parasitária, sendo que, indivíduos que ingerem poucas metacercárias provavelmente permanecerão assintomáticos (GIRÃO; UENO, 1985).

Os animais parasitados por *F. hepatica* no geral apresentam retardo no seu desenvolvimento, perda de peso e baixa na produção, gerando perdas econômicas consideráveis, principalmente em ovinos e bovinos (MAS-COMA *et al.* 1999; ECHEVARRIA, 2004; TOSTES *et al.* 2004).

O ser humano ao ingerir vegetais contaminados por grande quantidade de metacercárias, podem desenvolver hepatite hemorrágica e necrose, sendo um hospedeiro ocasional (OLAECHEA, 2004).

2.5 Diagnóstico

O método mais comum de diagnóstico é por meio da contagem de ovos nas fezes, por meio de testes de sedimentação. O diagnóstico é geralmente realizado durante a fase crônica, porém, a detecção precoce permitiria um tratamento eficaz e oportuno (MUÑOZ-ZAMBRANO *et al.* 2020).

Na fase aguda da doença é possível a detecção através de exames laboratoriais que medem o nível enzimático da glutamato de-hidrogenase e glutamato oxalacetato aminotransferase (ECHEVARRIA, 2004). Os testes sorológicos oferecem mais segurança, no entanto os resultados podem cruzar com outras doenças, causando falsos positivos, todavia, os mais indicados são os de intradermorreação, imunofluorescência e ELISA (GUIMARÃES, 2016).

O ensaio ELISA é considerado o mais eficaz, sendo capaz de detectar parasitos de duas a seis semanas após a infecção (LUQUE, 2014). O uso das técnicas imunológicas para complementar o diagnóstico clínico da fasciolose se justifica pela baixa sensibilidade dos exames coproparasitológicos. Além disso os ovos só são observados a partir da nona semana. O ELISA, é um dos testes mais utilizados

atualmente, com alta sensibilidade e apenas 30% de falsos positivos (ESCALANTE *et al.* 2011).

Por fim, o diagnóstico clínico é difícil, no entanto, quando acometidos, os animais podem apresentar sinais com enfraquecimento, anorexia, anemia e perda de peso, e, por não serem exclusivos desta enfermidade, necessitam de exames para comprovação da doença (GIRÃO; UENO, 1985).

2.6 Tratamento

Os principais anti-helmínticos utilizados no tratamento da fasciolose são pertencentes aos grupos dos benzimidazóis, macrolactonas, imidazotiazoles e salicilanilideos (BORGES, 2003). O grupo dos compostos anti-helmínticos mais administrados são os benzimidazóis que possuem amplo espectro (FAIRWEATHER, 2011).

Os benzimidazóis, atuam inibindo a polimerização da β -tubulina helmíntica, interferindo assim em funções dependentes de microtúbulos, como na formação de fuso durante a mitose e na captura de glicose (LACEY, 1988; RANG *et al.* 2016). O fármaco albendazole (AL) é muito utilizado e conhecido popularmente, no entanto, possui ação insatisfatória sobre fases imaturas do trematódeo, não sendo o mais adequado para tratamento (ALVAREZ *et al.* 2009).

Pertencente ao grupo dos benzimidazóis e considerado o medicamento padrão para combate da fasciolose por combater todas fases do trematódeo recomenda-se o triclabendazole (ALVAREZ *et al.* 2009). Sendo este, o princípio ativo o mais utilizado em animais infectados, principalmente por agir em todos estágios de desenvolvimento do trematódeo (FAIRWEATHER, 2011).

Como elucidado no estudo de Hanna *et al.* (2015) no qual os espécimes de *F. hepatica* sensíveis ao triclabendazole (TCBZ) exibiam lesões celulares, relacionadas a falhas no fuso durante a divisão celular, apoiando a afirmação de que o TCBZ e os derivados do benzimidazóis atuam na inibição da formação de microtúbulos.

Além do AL e do TCBZ, o fármaco nitroxinil (NIT) também é considerado uma interessante terapêutica contra fasciolose, todavia casos de intoxicação em rebanhos com o uso deste composto são descritos na literatura (CEBALLOS *et al.* 2017). Seu

mecanismo de ação esta relacionado a nível de tegumento da *F. hepatica*, levando o trematódeo a morte (MCKINSTY *et al.* 2003).

A busca por tratamentos eficazes e específicos para combate à fasciolose vem sendo cada vez mais necessários. A fitoterapia foi essencial até meados do século XIX, desde então, foi perdendo espaço e substituída por uso de substâncias químicas e em parte sintéticas. No entanto, com o avanço da fitoterapia, este segmento vem se tornando um assunto de grande importância e ganhando cada vez mais espaço na prospecção por novas substâncias ativas (ALMEIDA *et al.* 2006). Como elucidado nos estudos de Jeyathilakan *et al.* (2010) e Da Silva *et al.* (2020), os quais utilizaram da fitoterapia para combate da fasciolose, derivados fitoterápicos apresentam-se como novas formas de combate a esta importante enfermidade negligenciada.

2.7 Resistência

Resistência anti-helmintica pode ser definida quando indivíduos de determinada população sobrevivem a doses que para outras populações (susceptíveis) são consideradas letais (COSTA *et al.* 2011). Echevarria *et al.* (1996) considera que resistência anti-helmintica é um evento evolutivo, no qual os indivíduos sobrevivem aos tratamentos, reproduzem-se e transmitem esses genes resistentes à próxima geração.

As atuais medidas de tratamento de diversas parasitoses utilizam anti-helmínticos, os quais tem apresentado relatos de resistência devido à sua má utilização, gerando resistência parasitária (CHAGAS, 2004). Os primeiros relatos de resistência de *F. hepatica* a medicamentos no ambiente e em laboratório foram relatados no final da década de 80. Em 1990 já eram encontradas cepas resistentes a salicilanilidas (rafoxanida, closantel) em fazendas australianas (BORAY; DE BONO, 1990). O primeiro relato de resistência ao TCBZ foi publicado em 1995, e tratava-se de um isolado de campo de *F. hepatica* em ovinos na Austrália (OVEREND; BOWEN, 1995). Em 1998 na Holanda eram identificados, em rebanhos bovinos e ovinos, parasitos altamente resistentes ao TCBZ (MOLL *et al.* 2000).

Na Bolívia foi relatada a resistência de *F. hepatica* ao fármaco albendazole em rebanhos ovinos (WILLY; RENÉ, 2009). Posteriormente, nos estudos de Martínez-

Valladares *et al.* (2014) na Espanha, foi encontrado um rebanho resistente ao albendazole. Contudo, segundo Boray *et al.* (1983), o Albendazole atua apenas nos espécimes maduros, diferindo do Triclabendazole (MCKELLAR; SCOTT, 1990).

Visto isso, o uso do albendazole ocorre em menor escala quando comparado com o Triclabendazole, no entanto é ainda muito utilizado pelos produtores. Os relatos de resistência ao Albendazole em *F. hepatica* cresceram e ganharam destaque nos últimos anos, preocupando ainda mais o setor econômico (SANABRIA *et al.* 2013; NOVOBILSKÝ *et al.* 2016).

Além dos fármacos citados, o nitroxinil, é também utilizado como alternativa no tratamento contra *F. hepatica*, sendo observados relatos de populações do trematódeo resistentes a esse princípio ativo (NOVA *et al.* 2014).

Estudos baseados em um método de prevenção por meio do tratamento simultâneo com duas drogas de diferentes classes anti-helmintícas, que indicam que a resistência pode ser retardada. Entretanto, essa estratégia deve ser usada quando o medicamento for introduzido pela primeira vez, antes que ocorra qualquer seleção para resistência e assim não ocorrerá resistência por mais de vinte anos, sendo limitada aos fármacos uma vez já inseridos (SHALABY *et al.* 2020).

Existem meios descritos para lidar com a resistência aos fármacos utilizados contra a fasciolose, sendo eles a busca por fasciolicidas alternativos e desenvolvimento de novos medicamentos, além do sinergismo entre compostos já existentes. Neste contexto, os testes com produtos fitoterápicos oferecem uma nova alternativa promissora para na busca de novas ferramentas de controle deste helminto (FAIRWEATHER, 2005)

2.8 Controle

São recomendadas medidas de controle associadas com o tratamento realizado diretamente em rebanhos. Uma das estratégias recomendadas é o controle do hospedeiro intermediário. Existem diversos métodos de controle do HI, sendo estes químicos, físicos e biológicos (CUNHA *et al.* 2007). No entanto, o uso de produtos químicos para o controle dos moluscos não é recomendado e em diversos países não é permitido devido aos danos e resíduos que impactam a saúde do meio ambiente

(FOREYT, 2005). Visto isso, buscam-se sempre produtos que sejam atóxicos e que não deixem resíduos na fauna e flora (CUNHA *et al.* 2007).

Uma outra forma de controle dos moluscos, é a drenagem de terrenos alagadiços, considerada a forma ideal e eficiente para a redução dos hospedeiros intermediários em áreas contaminadas, manejo nem sempre possível devido à extensão das áreas contaminadas e alto custo deste processo (HOWELL *et al.* 2015).

Existe também o controle biológico de hospedeiros intermediários por meio de predadores, como outros moluscos (terrestre ou aquáticos), patos, marrecos e peixes entre outros, no entanto é a forma menos usual pelos produtores (XIMENES *et al.* 1995).

2.9 Óleos essenciais

Princípios ativos vegetais existem em grande quantidade com propriedades consideráveis no controle de diversas parasitoses, dentre eles, os óleos essenciais, obtidos a partir de metabólitos secundários das plantas (QI *et al.* 2015). Segundo El-Asbahani *et al.* (2015) os óleos essenciais (OEs) são produtos naturais extraídos por hidrodestilação de materiais vegetais, sendo substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis, extraídas a vapor ou por solventes de diversas regiões morfo-anatômicas das plantas, como através das flores, cascas, sementes, frutos e folhas (CALSAMIGLIA *et al.* 2007).

Os OEs também são utilizados na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos (DA CUNHA *et al.* 2013a). Devido ao aumento da utilização destes e de seus compostos bioativos na agricultura, saúde humana e animal, a demanda por esses produtos cresceu exponencialmente nos últimos anos (DA CUNHA *et al.* 2013b; DA CUNHA *et al.* 2015).

Os OEs são compostos com efeitos anti-parasitários promissores, muito aplicados na medicina veterinária (ROCHFORD *et al.* 2008). Entretanto, são escassos trabalhos explorando a ação de óleos essenciais contra *F. hepatica*. O estudo de Silva *et al.* (2020) demonstrou o potencial do OEs de *Helianthus annuus* (girassol) e *Cuminum cyminum* (cominho), dos quais, o óleo de cominho apresentou eficácia ovicida frente a *F. hepatica*.

Para outras espécies, como *Fasciola gigantica*, da mesma forma se conhece pouco sobre a ação de OEs. No estudo de Jeyathilakan e colaboradores (2010) foram avaliados os óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (citronela) e *Azadirachta indica* (nim), dos quais, óleo essencial (OE) de citronela apresentou potencial atividade anti-helmíntica.

O uso de óleos essenciais relacionados a *F. hepatica* é mais conhecido quanto aos seus efeitos moluscicida, contra moluscos da família Lymnaeidae. Como no estudo de Sousa *et al.* (2017), que mostrou o efeito biomoluscicidas dos OEs de *Anethum graveolens* (endro), *Cuminum cyminum* (cominho), *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (erva-doce amarga) e *Petroselinum crispum* (salsa) frente a *Radix peregra*, um caracol, HI suscetível de *F. hepatica*. Além dos OEs testados neste estudo, o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* (cerejeira brasileira) em *Lymnaea columella* e *Biomphalaria tenagophila*, dos quais o primeiro é hospedeiro intermediário da *F. hepatica* (PINHEIRO *et al.* 2017)

2.9.1 Óleo essencial de *Pelargonium graveolens*

Pelargonium graveolens (PEG), conhecido como gerânio ou malva-cheirosa é uma espécie aromática, pertencente à família Geraniaceae. Possui forma de vida arbustiva, sendo uma planta de origem nativa e não endêmica, nativa da África do Sul (HAMIDPOUR *et al.* 2017; REFLORA, 2020a).

Pertencente a classe Magnoliopsida, Ordem Geraniales e Família Geraniaceae, seu óleo é amplamente utilizado como substituto floral, sendo, portanto, um dos materiais naturais mais interessantes para a indústria (GOMES *et al.* 2006).

Segundo Asgarpanah (2015 *apud* EL-LETHY, 2011) *P. graveolens* possui diversos constituintes químicos, dentre eles, substâncias voláteis, terpenóides, flavonóides, cumarinas e taninos foram isolados da espécie. Os OEs dessa espécie apresentam quantidade considerável de monoterpenos. Al-Snafi (2016) quantificou em sua revisão que o OE de PEG foi caracterizado pela presença de 79,61% de monoterpenos e cerca de 2,66% de sesquiterpenos, além de outros compostos como aromáticos e alifáticos.

Há estudos que comprovam a eficácia anti-fúngica, anti-protozoária e antibacteriana do OE de *P. graveolens*. Como nos estudos de Patias *et al.* (2016), que comprovaram a eficácia anti-fúngica do óleo contra *Candida sp.*, Calzada e colaboradores (2001) demonstraram a atividade anti-protozoária da espécie contra *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Sadiki *et al.* (2019) testaram a eficácia do óleo de *P. graveolens* contra bactérias resistentes aos antibióticos, dentre elas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., e *Staphylococcus aureus*.

São poucos estudos que mostram eficácia anti-helmíntica de *P. graveolens*, como o estudo de Leela *et al.* (1992) o qual demonstrou a atividade anti-helmintica de *Meloidogyne incognita* (nematóide das galhas) com o uso do OE. Outras espécies do mesmo gênero também foram descritas na literatura, como no estudo de Kozan, Akkol e Sutar (2016), onde *P. endlicherianum* apresentou atividade anti-helmíntica significativa em três fases do ciclo de vida de *Haemonchus contortus*. Visto isso, este composto deve e merece ser mais estudado e observado frente a helmintos.

2.9.2 Óleo essencial de *Citrus aurantium*

A espécie *Citrus aurantium*, conhecida popularmente como laranja-amarga, possui forma de vida em árvore e vive em substrato terrícola. Não é endêmica no Brasil e possui origem asiática (LORENZI *et al.* 2006; REFLORA, 2020b).

Citrus aurantium, pertencente a classe Magnoliopsida, ordem Sapindales e família Rutaceae, apresentou potencial cicatrizante, antibacteriano e antioxidante (NUNES, 2009). Os principais constituintes biológicos ativos dos *Citrus* são flavonóides, como a hesperidina, naringina, alcalóides e sinefrina (PELLATI *et al.* 2002). O OE apresenta quantidade considerável de monoterpenos, chegando a 90% a fração constituinte de monoterpenos (GNIEWOSZ, *et al.* 2017). A utilização de subprodutos da indústria de *Citrus* é altamente desejável, devido ao seu valor comercial como também potencial farmacêutico (VIANA *et al.* 2016).

Dentre os diversos possíveis efeitos, seu papel fisiológico e farmacológico se destaca. Efeitos anti-cancerígenos, anti-diabéticos e pesticida já foram mencionados por Lee *et al.* (2015), Jia *et al.* 2015, Sanei-Dahkordi *et al.* (2016), respectivamente.

Taur *et al.* (2009) apresentaram *Citrus aurantium* com potencial anti-helmíntico em testes realizados com *Pheretima posthuma* (annelida), organismo muito utilizado em estudos devido sua semelhança com helmintos. Kowaltschuk *et al.* (2011) também encontrou resultados satisfatórios no controle de *Meloidogyne javanica* (nematóide fitopatogênico) utilizando extratos de plantas, incluindo o *C. aurantium*, o qual mostrou novamente um resultado satisfatório, visto isso, o OE de *C. aurantium* apresentou potencial prévio em estudos e assim, devido às suas características deve ser mais estudado frente outras abordagens (MAKSOUUD *et al.* 2021).

2.9.3 Óleo essencial de *Cuminum cyminum*

Cuminum cyminum (CYM), popularmente chamado de cominho, pertencente a família Apiaceae, apresenta-se com forma de vida em erva e vive em substrato terrícola. Não é endêmica do Brasil e sua origem é do Mediterrâneo Oriental e Egito (REFLORA, 2020c). O popular cominho, pertence a classe Magnoliopsida, ordem Apiales e família Apiaceae (ITIS, 2021).

Em diversos estudos frente a caracterização química do *Cuminum cyminum* continham: alcalóides, cumarinas, flavonóides, saponinas, taninos e outros componentes em menor quantidade (AL-SNAFI, 2016). Além disso, o OE é formado por um elevado número de monoterpenos e derivados sesquiterpenos (LI; JIANG, 2004). Essa espécie é muito visada indústria terapêutica visto que, seu OE é considerado uma fonte rica de componentes com potencial antibacteriano, antifúngico e antioxidante, podendo ser usado na indústria terapêutica (GACHKAR, 2007; MITHUN *et al.* 2010; JOHRI, 2011).

As sementes de cominho são amplamente utilizadas na culinária para saborizar alimentos e também como tempero. Componentes do cominho possuem potentes antioxidantes, anticâncer, antibacterianos e larvicida, além de outros diversos outros usos gerais (SINGH *et al.* 2017).

O estudo de Mithun e colaboradores (2010) relatou uma moderada atividade antifúngica e Shivakumar *et al.* (2010) constatou atividade anti-inflamatória. Além de suas capacidades antidiabéticas, anticarcinogênicas, antimutagênica e gastrointestinais (JOHRI, 2011).

Além disso, o OE de *C. cyminum* já é também conhecido por sua ação anti-helmintíca. Como no estudo de DE CASTRO *et al.* (2021) que mostrou a eficácia do OE de cominho contra *Haemonchus contortus*, a qual foi de 98,62% para inibição da eclosão, 69,12% para inibição do desenvolvimento e 23,45% para inibição da migração larval, sendo um composto promissor para o helminto.

Visto todas suas características descritas na literatura, o óleo de CYM ainda deve ser mais estudado, pois a ação deste em ovos de *F. hepatica* como supracitado e sua ação em adultos é de extrema relevancia para a veterinaria e saúde pública (DA SILVA *et al*, 2020).

3. Manuscrito

Manuscrito I. Alterações microscópicas em *Fasciola hepatica* tratadas com os óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* e *Citrus aurantium*.

Manuscrito será submetido ao periódico Parasitology.

O manuscrito é apresentado conforme as regras de formatação da revista para a qual será submetido.

Microscopic alterations in *Fasciola hepatica* treated with the essential oils of *Pelargonium graveolens* and *Citrus aurantium*

Alexia Brauner de Mello^{1*}, Bruna Fruet Baccega¹, Filipe Obelar Martins¹, Nara Amélia Farias¹, Marjorie de Giacometti¹, Renata Nobre da Fonseca³, Silvia de Oliveira Hübner³, Mauro Pereira Soares³, Camila Belmonte de Oliveira¹

* Author for correspondence: Alexia Brauner de Mello, E-mail: alexiabraunermello@gmail.com

Abstract:

Fasciolosis is one of the most important parasitic diseases in animal health, affecting mainly ruminants, causing economic and productivity losses. This study aimed to evaluate the *in vitro* ovicidal and adulticidal activity of essential oils (EOs) from *Pelargonium graveolens* (geranium) and *Citrus aurantium* (sour orange) on *Fasciola hepatica*. To carry out the experiment, adult specimens were collected directly from the liver of *post mortem* positive cattle. For the ovicidal tests, the adults were immersed in saline to release and obtain the eggs. Subsequently, the eggs were incubated with geranium EOs at concentrations from 4.5 to 0.03375 and sour orange at concentrations from 4.25 to 0.031875, along with four controls: albendazole (10mg/kg), nitroxinil (6.8mg/kg), water (negative control) and Tween® 80. The viable eggs were counted on the 14th day post-incubation. Adult forms of *F. hepatica* were incubated ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) containing the EOs and observed at 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h and 24h post-treatment, as well as the control groups. Later the specimens were fixed for histological analysis. Geranium and sour orange EOs in trematode eggs at the concentrations tested were 100% effective in inactivating hatching ($p < 0.05$) when compared to the negative control. In the adulticidal test, the essential oil (EO) of *P. graveolens* at both concentrations tested (0.0675 and 0.03375 mg/mL), within 15 hours, promoted the death of flukes. For *C. aurantium* EO, 18 hours was enough to inactivate all specimens, up to a concentration of 0.06375 mg/ml. In the histological analysis, it was possible to observe the accumulation of liquid in the tegument in the specimens incubated in *C. aurantium* EO (spongy aspect) as well as in *P. graveolens* a marked vacuolization in the tegument and spines, preventing externalization. The results of the present study the use of EOs as new compounds with anthelmintic potential against *F. hepatica*, since the drugs commonly used to control this disease show resistance reports worldwide.

Keywords: Phytotherapy, Ruminants, Trematode, Histological.

Introduction

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) is a trematode belonging to the Fasciolidae family (YAMAGUTI, 1961; BOWMAN, 2006), considered a species that causes zoonosis and has a worldwide distribution (Ashrafi *et al.* 2015; Kelley *et al.* 2016; Mas-Coma *et al.* 2018).

It is estimated that more than 300 million cattle are exposed to the parasite (Molento; Pritsch, *et al.* 2018), causing great economic losses, affecting livestock and also public health (Mehmood *et al.* 2017). The main economic loss occurs due to condemnation of livers during slaughter, as well as due to the systemic condition which causes weight loss, decreased milk

production, low fertility and lower meat and wool yield, in addition to high rates of morbidity and mortality (Mohammed *et al.* 2015; Fanke *et al.* 2017; Fang *et al.* 2022).

Popularly known as “liver cockroach” (Oliveira, Spósito Filha, 2009), this trematode affects the liver and bile ducts of sheep, cattle, buffalo, goats, swine and other animals, such as wild animals. Humans are accidental hosts (Aleixo *et al.* 2015; Monteiro, 2017). *F. hepatica* is found mainly in temperate zones, its distribution occurs mainly in humid or swampy areas (Mas-Coma *et al.* 2005; Mas-Coma *et al.* 2014; Martins *et al.* 2014). Its life cycle requires a definitive host, usually a herbivore that acts as a reservoir of the disease, and an intermediate host, the most common being the mollusc of the Lymnaeidae family (Calretas *et al.*, 2003; Fox *et al.* 2011).

The control of this disease can be carried out through the use of anthelmintics, proper management, muscicides and biological competitors (Monteiro, 2017). The main anthelmintics used for management and control in the definitive host in the treatment of this parasitosis are from the groups of benzimidazoles, macrolactones, imidazothiazoles and salicylanilides (Borges, 2003). Among the commonly used drugs are albendazole (AL), triclabendazole and nitroxinil (NIT) (Nova *et al.* 2014; ROMERO *et al.*; 2019; Babják *et al.* 2021).

However, the misadministration and indiscriminate use of these drugs originate populations of resistant parasites all over the world. Anthelmintic resistance in *F. hepatica* is reported in several countries, such as Bolivia, Spain, Chile and Brazil (Willy; René 2009, Martínez-Valladares *et al.* 2014; Romero *et al.* 2019; Nova *et al.* 2014).

In view of this theme, there is a vast amount of active plant ingredients with potential in the control of various parasites, thus increasing the interest and the search for new control alternatives using this aspect (Rocha *et al.* 2019). In this context, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* efficacy of essential oils of *Pelargonium graveolens* (geranium) and *Citrus aurantium* (sour orange) in eggs and adults of *Fasciola hepatica*, as well as the histopathological changes caused by the tested compounds and the commonly used drugs.

Material and Methods

Collections of Fasciola hepatica

The collection of *F. hepatica* specimens was performed from infected livers in post mortem examination provided by a slaughterhouse located in the municipality of Pelotas, Rio Grande do Sul (Brazil). The parasites were collected directly from the bile ducts with the aid of a scalpel and tweezers. Eggs were recovered using the natural egg retrieval technique described by Ueno and Gonçalves (1998). The adults were recovered and the technique of Jeyathilakan *et al.* (2010).

Acquisition of oils and reagents

The essential oil of *Pelargonium graveolens* (Lot STD1012) was purchased from Seiva Brázilis Ativos Naturais Ltda, São Paulo, Brazil and the oil of *Citrus aurantium* was provided by the Nanotechnology Laboratory of the Universidade Franciscana (UFN).

Gas Chromatography

The chromatography performed for *P. graveolens* oil (PEG) was according to the technique described by Giongo *et al.* (2015). The chromatographic analysis performed for *C. aurantium* oil (CAM) was as described in Lopes *et al.* (2018).

Test of ovicidal and adulticidal activity of essential oils against *Fasciola hepatica*

The oil solutions were based on the methodology described by Freire *et al.* (2014), with adaptations. Each solution was individually prepared in a standard solution with sterile distilled water, Tween® 80 1% and the EOs. In sterile tubes, 1000 µL of each oil, 400 µL of 1% Tween® 80 and sterile distilled water were added to complete the final volume of 20 mL. Tween® 80 was used to promote the solubilization of essential oils in water, without interfering with the biological activity of these products. The tubes were individually shaken in a Kasvi Basic 2800 RPM Vortex Shaker for a period of 5 min.

Eight concentrations were performed with each oil to be tested. To express the results in mg/mL, the densities of each oil (PEG= 0.9 g/cm; CAM= 0.85 g/cm) and the equation (density = mass/volume) were used. For the PEG oil at the end we obtained concentrations ranging between 4.5-0.03375 mg/mL and for CAM oil ranging between 4.25-0.031875 mg/mL.

Test of ovicidal activity of oils against *Fasciola hepatica*

The tests were performed based on the methodologies described by Fairweather *et al.* 2012, Robles-Pérez *et al.* (2014) e Arafa *et al.* (2015). After collection, the trematodes were immediately stored in glass vials containing saline solution heated to 30°C for the release of eggs. These were separated from the adults with the aid of a sieve (200 µm) and transferred to a sedimentation cup. Subsequently, the solution containing the eggs was washed three times with sterile distilled water to obtain a clear solution. This solution was then filtered according to Ueno's four-sieve technique (Girão; Ueno, 1985). Finally, the eggs were stored in labeled glass containers, containing sterile distilled water and kept refrigerated until the egg hatching test was prepared (Ueno; Gonçalves, 1998).

To carry out the tests, the eggs (n= 500 eggs) were deposited in six-well plates, together with the controls or EO according to their concentration. The plates were packed in aluminum foil, so that the eggs did not come into contact with light environment and subsequently incubated at ±28°C and 80% humidity in different climate chambers for 14 days, until the hatched eggs are counted. The test was performed in triplicate for each concentration of EO tested and controls performed. As a positive control, AL and NIT were used, both at a concentration equivalent to the therapeutic dose (AL= 10 mg/kg; NIT= 6.8 mg/kg), obtained respectively, by VeT.Pharma® (Audiência de Farmácia RS – Brazil) and Dovenix® Supra (Boehringer Ingelheim), negative control (NC) containing water and eggs, and the control of Tween® 80 1% (T), being the solvent diluting the oils.

The counting of non-embryonated, embryonated and hatched eggs was performed after 14 days of incubation, using an inverted microscope (Olympus - CKX 41). Egg development was analyzed, which were quantified according to development patterns.

Storage and procedure for testing Fasciola hepatica in adults

Adults of *F. hepatica* were collected from the livers and transported in vials containing blood and organ fragments, seeking to bring the specimens as close as possible to their natural environment. To evaluate the *in vitro* activity of essential oils in adults, the methodology of Jeyathilakan *et al.* (2010). The specimens were selected according to their integrity and washed with distilled water.

To carry out the tests, the trematodes were placed in petri dishes (n=3) with 10 mL of RPMI Medium 1640 culture medium (Gibco® by life technologies™) and 10 mL of the oil to be tested under different concentrations. The groups used as controls were: AL, NIT, T and NC. Readings were performed at 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h and 24h after immersion in the treatments. Between the intervals, the specimens were kept in an acclimatized chamber (BOD, brand Eletrolab, model EL101/0) at 27°C.

The results of each treatment were expressed according to the methodology used by Kiuchi *et al.* (1987), with modifications, being characterized as: without movement (dead) and with movement (alive), for each observation time.

After the test, the *F. hepatica* specimens were fixed by immersion in a 10% buffered formalin solution for 24 hours. Subsequently they were cross-cut and routinely processed, embedded in paraffin, cut into 3-4 µm sections, stained with hematoxylin-eosin (HE) and examined under a microscope at 200x increase.

Cytotoxicity Assay

The MTT assay was based on the reduction of the tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, catalog number: M5655) by actively growing cells and was performed based on the method described by Plumb (2004). Briefly, 100 µL of Madin-Darby-Bovine-Kidney (MDBK) cells were seeded in 96-well microplates at a concentration of 10⁶ cells/mL and incubated for 24 hours. Concentrations of essential oils ranging from 4.5 mg/mL to 0.031875 mg/mL were performed. After incubation, 50 µL of MTT solution (1 mg/mL) was added to each well and incubated for an additional 4 hours. The medium was then removed and the blue formazan crystals were solubilized with 150 µL of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, catalog number: D5879). MTT converted to formazan by metabolically viable cells and its absorbance was measured using an ELISA reader at 590 nm. The control group received only Minimum Essential Media. The percentage of cell viability was calculated using the following formula:

$$\% \text{ viable cells} = \frac{(\text{abs}_{\text{sample}} - \text{abs}_{\text{white}})}{(\text{abs}_{\text{control}} - \text{abs}_{\text{white}})} \times 100$$

Statistical Analysis

To determine the efficacy of the tested oils, the formula was used: efficacy (%) = [(average % of the negative control group - % average of the treated group) / % average of the negative control group] x 100, which results in the percentage of efficacy of the treated group compared to the control group, as defined by Wood *et al.* (1995). Statistically significant oils with ≥90% efficacy were considered effective. Statistical analysis for eggs and adults was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) using a probability value of p<0.05, followed by Tukey's Test (GraphPad PRISM® 8 Software).

Results

Gas Chromatography

For PEG oil as major compounds we obtained citronellol (31.37%), geraniol (10.34%) and citronellyl formate (6.51%). The EO of CAM showed a predominance of limonene (93.89%), linalool (2.60%) and β -pinene (1.71%).

Evaluation of essential oils in *Fasciola hepatica* eggs

The results obtained in the *in vitro* test in the concentrations carried out of the essential oils of *P. graveolens* and *C. aurantium* against the eggs can be seen in Table 1 and 2, respectively. All concentrations of the EOs tested made the eggs unviable, that is, without the formation of miracidia in their interior, not allowing the development of the trematode and, consequently, keeping them non-embryonated. All concentrations in the tested oils were significant ($p < 0.05$) when compared to the negative control.

In addition, the results for the different concentrations of EO used did not obtain a significant difference when compared, thus showing that the different concentrations were used did not presented a significant difference between them. Therefore, the highest concentration was equally effective when compared to the lowest used.

In the negative control, 96% of embryonated and/or hatched eggs were observed. The drug AL obtained an average of 90% of embryonated and/or hatched eggs, the NIT control presented an average of 16% of embryonated and/or hatched eggs. Finally, in the Tween® control, 93% of embryonated and/or hatched eggs.

Table 1. The percentage of eggs hatched after the incubation of the essential oil of *Pelargonium graveolens* from *F. hepatica* eggs and the percentage of ovicidal action at the different concentrations tested. All tested groups had significant differences ($p < 0.05$) in relation to the control group.

Dose (mg/mL)	4.5	2.25	1.125	0.5625	0.27	0.135	0.0675	0.03375
% Hatched	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
% Ovicidal Action	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)

Table 2. The percentage of eggs hatched after the incubation of *Citrus aurantium* essential oil from *F. hepatica* eggs and the percentage of ovicidal action at the different concentrations tested. All tested groups had significant differences ($p < 0.05$) in relation to the control group.

Dose (mg/mL)	4.25	2.125	1.0625	0.53125	0.255	0.1275	0.06375	0.031875
% Hatched	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
% Ovicidal Action	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)

Evaluation of essential oils in adults of *Fasciola hepatica*

Adults of *Fasciola hepatica* were analyzed for a total of 24 hours for their motility in each treatment. For a better observation and understanding of the data referring to the analysis times, two graphs were generated relating survival and analysis times (Figure 2). The specimens ($n=9$) of the negative control, containing only RPMI medium, showed good motility, moving all parts

of the body until the final time (24h). Positive controls using the drugs Albendazole and Nitroxinil inactivated all specimens within 18 hours and 6 hours, respectively (Figure 2).

The essential oil of *P. graveolens* at both concentrations tested (0.0675 and 0.03375 mg/mL) (Figure 2), within 15 hours, promoted the death of flukes, which did not show movement, showing efficacy in both doses tested in the aforementioned time. For *C. aurantium* EO, 18 hours was enough to inactivate all specimens, at a concentration of 0.06375 mg/ml (Figure 2). In addition, the Tween® 80 control, at the end of the test (24h) showed viable specimens (n=9) with good motility, showing that the compound used to dilute the oils did not alter the survival of *F. hepatica* adults.

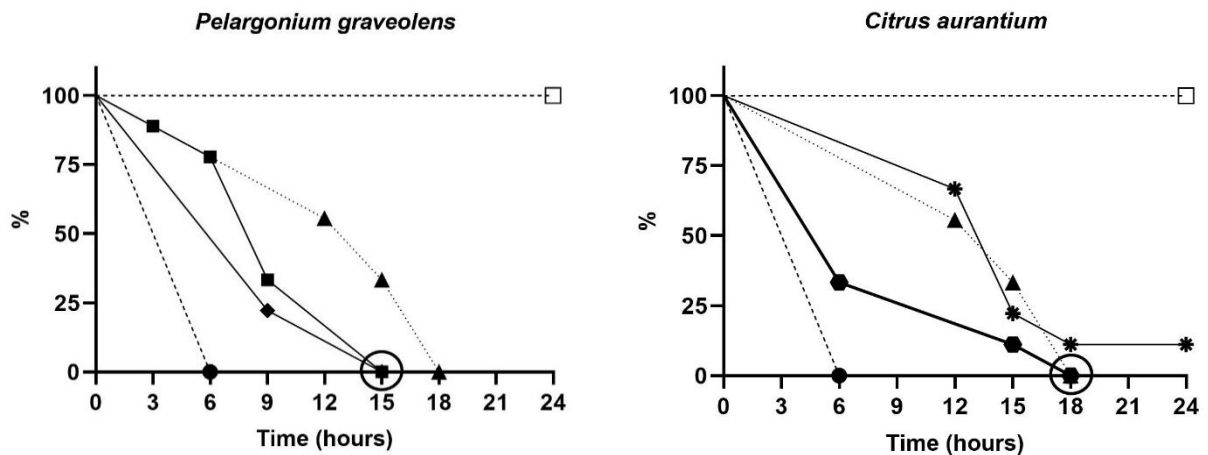


Figure 2. (I) Graph of adulticidal survival measured over time on *Pelargonium graveolens* essential oil treatment compared to controls. Y axis percentage of survival and X axis time in hours. Lozenge icon: *P. graveolens* 0.0675 mg/ml; Filled square icon: *P. graveolens* 0.03375 mg/ml; Hollow square icon: negative control; triangle icon: albendazole; Circle icon: nitroxinil. (II) Graph of adulticidal survival measured over time on *Citrus aurantium* essential oil treatment compared to controls. Y axis percentage of survival and X axis time in hours. Hexagon icon: *C. aurantium* 0.06375 mg/ml; asterisk icon: *C. aurantium* 0.031875 mg/ml; Hollow square icon: negative control; triangle icon: Albendazole; Circle icon: nitroxinil.

Histopathological Analysis

The specimens of the NC group (RPMI) presented the syncytium of the integument with a homogeneous appearance and with the presence of spines, in great majority externalized (Figure 3. I and II), without any sign of lesion or abnormal characteristic of the *Fasciola hepatica* species. Adults who were administered *C. aurantium* EO had fluid accumulation in the tegumental syncytium region (Figure 3. III), with the formation of vacuoles. The spines in most of the samples were enlarged and internalized (Figure 3. IV). The epithelial lining cells of the cecum and testis were dissolved, leaving only the supporting basal lamina (Figure 3. IV). The group that received EO from *P. graveolens* showed a marked vacuolization in the tegumental syncytium, with extensive clear areas, often forming vacuoles around the spines (Figure 3. V) that were generally internalized. In addition, the spines were usually covered with blisters and increased in size (Figure 3. V). The epithelial lining of the cecum and testis was dissolved, leaving only the basal lamina (Figure 3. VI). The group treated with the AL drug showed a marked accumulation of fluid in the region of the basal lamina and muscular layer, a distinct characteristic of the other tested compounds, and discrete vacuolization in the tegumental syncytium (Figure 3. VII and VIII). From the cecum and testis, only the basal lamina cell support remained. The spines, in turn, were largely intact in terms of shape and internalized.

Finally, the animals treated with the NIT drug showed vacuolization in the inner layer of the tegument syncytium immediately above the basal lamina and around the internalized and externalized spines. They also presented vacuolization in the superficial and deep regions of the musculature (Figure 3. IX and X).

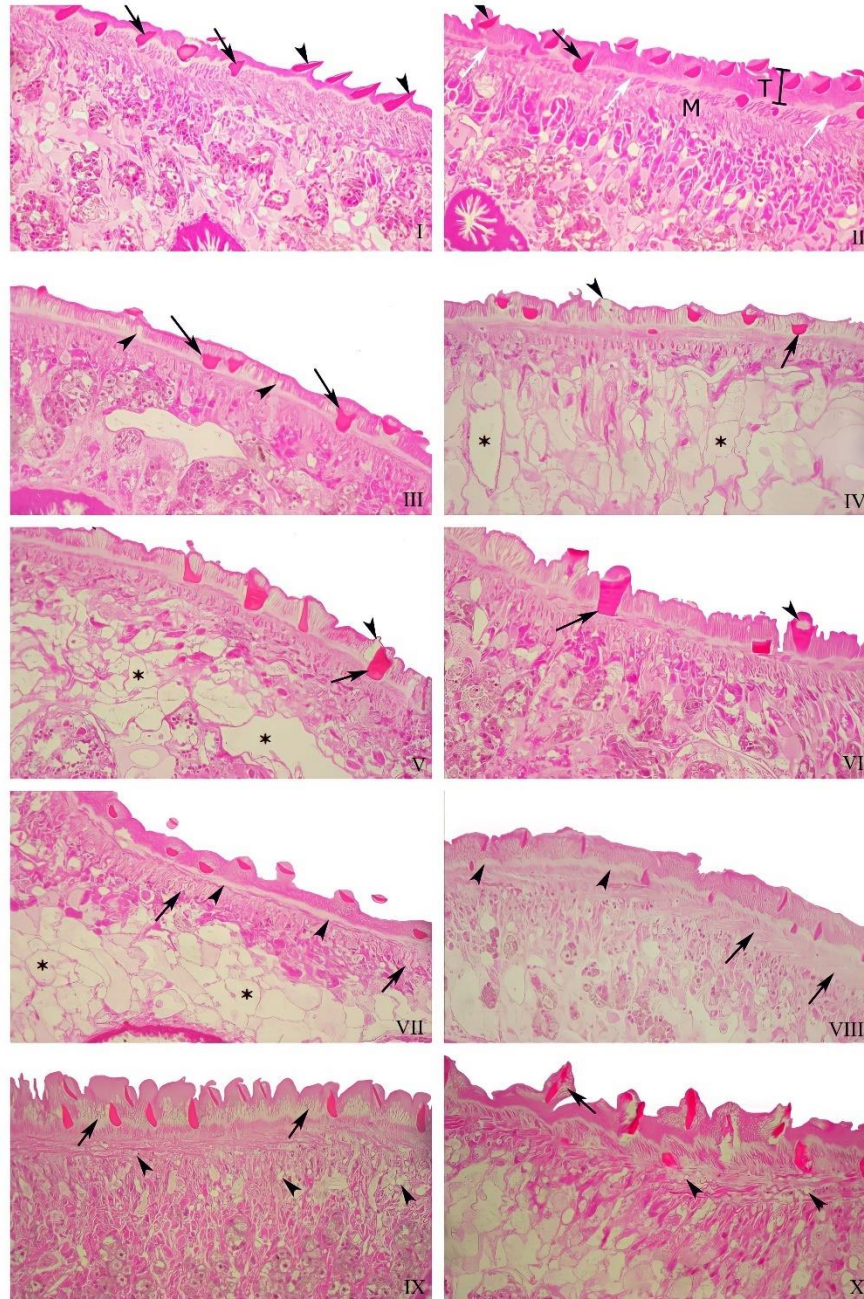


Figure 3. Histopathology *Fasciola hepatica*. (I) Negative Control – Tegument syncytium presenting a homogeneous appearance and internalized spines (arrow) and externalized spines (arrowhead). HE. 200 X. (II) Negative Control – Syncytium of the tegument presenting a homogeneous aspect with internalized spines (arrow) and externalized spines (arrowhead). Integument (T). Basal lamina (white arrow). Muscle layer (M). HE. 200 X. (III) *C. aurantium* 0.031875 mg/mL – Accumulation of fluid in the tegumental syncytium region, forming vacuoles (arrowhead). Enlarged internalized spines (arrow). HE. 200 X. (IV) *C. aurantium* 0.06375 mg/mL – Marked accumulation of fluid in the tegumental syncytium giving this region a spongy appearance. Note the formation of a large vesicle (arrow). The epithelial lining cells of the cecum and testis are dissolved, leaving only the supporting basal lamina (*). HE. 200 X. (V) *P. graveolens* 0.03375 mg/mL – Marked vacuolization in the tegumental syncytium with extensive clear areas, often forming vacuoles around the spines (arrowhead). Only the basal lamina supporting the cecum and testis remains (*). HE. 200 X. (VI) *P. graveolens* 0.0675 mg/mL – Spines increased in

size (arrow) and covered by a bubble (arrowhead). HE. 200 X (VII) Albendazole – Marked accumulation of fluid in the basal lamina (arrowhead) and muscular layer (arrow). Discrete vacuolization in the tegumental syncytium. From the cecum and testis, only the basal lamina cell support (*) remained. HE. 200 X. (VIII) Albendazole – Basal lamina very evident due to marked accumulation of fluid (arrowhead). Muscle fibers with the appearance of dissolved by the accumulation of fluid in the muscle layer (arrow). HE. 200 X. (IX) Nitroxinil – Vacuolization in the inner layer of the tegumental syncytium immediately above the basal lamina (arrow). Superficial and deep muscular layer with a large number of vesicles (arrowhead). HE. 200 X. (X) Nitroxinil – Vacuolation around the spines (arrow). Vacuolation in the muscular layer (arrowhead). HE. 200 X.

Action of cell viability

A high rate of cell viability was observed for *Citrus aurantium* at a concentration of 0.255 mg/mL. The lowest viability was 4.22% for the EO of *P. graveolens* at a concentration of 4.5 mg/mL, as seen in Table 3.

Table 3. Percentage of viability of MDBK cells (Madin-Darby-Bovine-Kidney) against different concentrations of EOs of PEG and CAM.

PEG (mg/mL)	%	CAM (mg/mL)	%
4.5	4.22	4.25	4.33
2.25	4.22	2.125	10.14
1.125	5.95	1.0625	12.40
0.5625	5.57	0.53125	83.73
0.27	5.95	0.255	93.90
0.135	16.91	0.1275	95.19
0.0675	18.39	0.06375	96.49
0.03375	23.31	0.031875	96.7

Discussion

Parasitic resistance to drugs commonly used in the treatment of fasciolosis has been reported by several studies over time (Coles; Stafford, 2001; Álvarez-Sánchez *et al.* 2016). The control of most parasites is based on the use of commercial anthelmintics, whose indiscriminate use leads to the inefficacy of the drugs, thus predisposing to parasite resistance, in addition to exorbitant drug costs (Álvarez-Sánchez *et al.* 2016). In this study, the EOs obtained an efficacy above 95%, showing a great fasciocidal potential. It is recommended by the World Association for the Advanced of Veterinary Parasitology that the antiparasitic activity should be greater than 90% (WOOD *et al.* 1995).

Essential oils gain evidence for being products of secondary metabolism and for being characterized mostly by terpenoid derivatives in their composition, with monoterpenes and sesquiterpenes being the main compounds responsible for the biological activities of these EO (Sapra *et al.* 2008; Martinez-Velasquez *et al.* 2012). Monoterpenes stand out for their phytotherapeutic characteristics, such as antifungal, antibacterial, antioxidant and antiparasitic effects (Almeida, 2015). *P. graveolens* and *C. aurantium* oils are derived from monoterpenes and in this study showed fasciocidal activity. The composition of the EOs interferes in their mechanism of action, and the activity of the major compounds, which is mostly complex and

depends mainly on the isolated compounds, chemical composition and the amount of the main isolated compounds, we will approach from this principle

The EO of *Pelargonium graveolens* showed high ovicidal and adulticidal activity in the present study. Hamidpour and collaborators (2017) showed a promising therapeutic profile of *P. graveolens* for the development of antibacterial, antifungal and antioxidant agents for herbal purposes. Regarding the ovicidal and adulticidal activity of the compound for *F. hepatica*, there are no studies that evaluate the *in vitro* effect, which makes it difficult to compare the results obtained in the present study. Although in the cell viability test in MDBK cells, the PEG EO showed low levels of viability, it cannot be disregarded, since it can still be used in nanostructured systems that reduce the toxicity of compounds in organic systems (Oliveira *et al.* 2004) or in environmental management. Recommendation that has been growing more and more to reduce herd infection, that is, seeking to eliminate HI (Oliveira; Spósito-Filha, 2009). Studies have demonstrated the efficacy of *P. graveolens* extract in aquatic molluscs, thus suggesting a possible action of EO on the HI of *F. hepatica* (El-Tantawy *et al.* 2013).

The major compound in *P. graveolens* oil, citronellol, an oxygenated monoterpene, is found naturally in the essential oils of many aromatic plants. However, its mechanism of action is unexplored (Hierro *et al.* 2004). The use of *P. graveolens* EO in adults caused the dissolution of the epithelial lining of the cecum and testis, leaving only the basal lamina, suggesting that the mechanism of action is related to the trematode epithelium. According to Hierro *et al.* (2004) the effect of citronellol and geraniol, major compounds present in *P. graveolens*, is the lysis of the intestinal wall and projection of different histological structures facing away from the parasite, producing cuticular protuberances in *Anisakis simplex*, a fish parasitic nematode, cutaneous effects similar to those caused in *F. hepatica*.

In addition, adults of *F. hepatica* treated with PEG showed intense vacuolization of the tegumental syncytium, often forming vacuoles around the spines, which were enlarged and intensely internalized, the presence of bubbles on the spines possibly prevented its externalization, an important factor for its pathology, since its integument is covered by spines, which help to fix the helminth in the bile ducts. Preventing the externalization of these, consequently prevents the fixation in the host (McConville *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2019).

The ovicidal and adulticidal activity achieved through the *Citrus aurantium* EO was effective, keeping the analyzed eggs not embryonated and the adults inert at a given time. The antibacterial, antioxidant and antifungal phytotherapeutic potential of this EO is already known by several researchers, as in the studies by Bendaha *et al.* (2016), Li *et al.* (2019) and Moosavy *et al.* (2017). The anthelmintic effects of this specific species have not yet been elucidated and against the species *F. hepatica* no study was detected. There are only studies with other *Citrus* species, such as *C. sinensis* for other parasites, such as the helminth *Haemonchus contortus* (Gaínza *et al.* 2015).

However, there are already reports of the anthelmintic activity of several oils with the major compound limonene (Gainza, 2015; Macedo, 2010). Han *et al.* (2021) suggests the mechanism of limonene through the destruction of the integrity and permeability of the cell wall and membrane, which can lead to cell death in bacteria. In this study, it is suggested that limonene has acted in the same way, with the alteration of cell membranes, however, more studies must be carried out to prove this fact.

The histological analysis performed in adults of *F. hepatica* treated with *C. aurantium* showed an accumulation of fluid in the tegumental syncytium region, causing the formation of vacuoles, in addition, the epithelial lining cells of the cecum and testis were dissolved, leaving only the supporting basal lamina, thus suggesting a possible mechanism of action through alteration of the integumental surface, similar to the studies by De Moraes *et al.* (2013), who found alterations in the integument of *Schistosoma mansoni*, treated with limonene. In addition, according to the authors, a reduction in motility and death was observed in all trematodes treated with limonene, which coincides with data from the present study.

In addition, adults who received *C. aurantium* had spines located in the anterior region largely enlarged and internalized, thus preventing the helminth from attaching to the bile ducts of its host (Vidal *et al.* 2019).

Several classes of anthelmintics, including albendazole, nitroxinil and others of broad spectrum, present several resistance reports in the literature (Cezar *et al.* 2010; Melo *et al.* 2021). In view of this, the need for products from natural resources, which are non-toxic, effective and low cost is clear and the present study presents promising data against the trematode in question. In this study, adulticidal treatment with AL showed a low efficacy when compared to the EOs tested in this study, since they made adults unfeasible in a lower concentration and/or time interval. In addition, the use of albendazole presented an ovicidal activity of 90%, considered moderate by the World Association for the Advanced of Veterinary Parasitology (Wood *et al.* 1995).

According to Fairweather and Boray (1999) and Alvarez *et al.* (2009) this compound has an unsatisfactory action on immature stages of the trematode, but it continues to be used by the vast majority of producers. In addition, this compound can be toxic if used in large amounts, and due to its poor administration, several reports of resistance have emerged, as in the studies by Novobilský *et al.* (2016) and Ceballos *et al.* (2019), which proved inefficacy and resistance in the hatching test of eggs from herds naturally infected by *F. hepatica*.

Sanabria *et al.* (2013) identified an isolate of *F. hepatica* resistant to AL, in which the efficacy of treatment with the anthelmintic was determined by comparing the values of adult trematodes in treated and untreated animals, through which efficacy values of only 29% for this active ingredient, being an alert for the need for new forms of treatment for this zoonosis.

The control performed with Nitroxinil for eggs showed moderate efficacy against *F. hepatica* eggs, corroborating studies performed (Rapic *et al.* 1988; Martínez-Valladares *et al.* 2010). Although effective, the NIT has disadvantages, such as: high cost, need for applications in large quantities (when it comes to herds), in addition, cases of intoxication are already observed (Campello *et al.* 2017). Adulticidal control with NIT inactivated the trematodes in 6 hours, this result can be attributed to the compound causing alterations in the integumentary surface of the trematode, as seen in the studies by McKinstry *et al.* (2003), who demonstrated alterations and/or ruptures of the tegument, causing its death. Campello *et al.* (2017) reported that sheep died within 24 hours of NIT administration. At necropsy, intestinal congestion, organs with bleeding points, heavy lungs with whitish or dark red areas, edema and kidneys with darkened areas were observed. This drug is toxic when used at higher doses and adverse environmental conditions (high temperatures) (Júnior *et al.*, 2021).

Conclusion

Our results demonstrated the efficacy of the essential oils, *P. graveolens* and *C. aurantium* in the *in vitro* treatment for *F. hepatica*, being observed its efficacy in all concentrations tested in eggs and inactivation of adults between 15 and 18 hours. EOs are promising in the production of new compounds with anthelmintic activity against parasites, which may reduce the parasite load. New *in vivo* studies must be carried out in order to verify a better treatment, avoiding exacerbated expenses and losses in animal production.

Acknowledgments

The authors are grateful to the following: Federal University of Santa Maria (UFSM), Frigorífico Famile, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES). This study was partially funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

References

- Aleixo, MA, Freitas, DF, Dutra, LH, Malone, J, Freire-martins, IV and Molento, M** (2015) *Fasciola hepatica*: epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. *Ciencia Investigación Agraria* **36**, 1451-65. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n3p1451
- Almeida, RR** (2015). Mecanismo de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacol [Mechanism of action of aromatic monoterpenes: thymol and carvacol]. São João del-Rei: Universidade Federal de São João del-Rei.
- Alvarez, L, Moreno, G, Moreno, L, Ceballos, L, Shaw, L, Fairweather, I and Lanusse, C** (2009) Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology* **164**, 211-216. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.014
- Arafa, WM, Shokeir, KM, Khateib, AM** (2015). Comparing an *in vivo* egg reduction test and *in vitro* egg hatching assay for different anthelmintics against *Fasciola* species, in cattle. *Veterinary Parasitology* **214**, 152-158. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.023
- Ashrafi, K, Saadat, F, Neill, SO, Rahmati, B, Amin Tahmasbi, H, Pius Dalton J, Nadim, A, Asadinezhad, M and Rezvani, SM** (2015) Endemicity of human fasciolosis in Guilan province, northern Iran: the baseline for implementing control strategies. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **44**, 501-511.
- Bendaha, H, Bouchal, B, Mounsi, I.E** (2016) Chemical composition, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of peel essential oils of *Citrus aurantium* grown in Eastern Morocco. *Der Pharmacia Lettre* **8**, 239-245.
- Boray, JC and De Bono, D** (1990) Drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Resistance of parasites to antiparasitic drugs: Round Table Conference, ICOPA VII. Paris: Merck & Co. Inc., pp. 51-60.

- Borges, CCL** (2003) *In vitro* activity of anthelmintics on infective larvae of goat gastrointestinal nematodes using the quantitative coproculture technique (Ueno, 1995). *Parasitology Latinoamericana* **58**, 142-147.
- Bowman, DD** 2006. Helminos. In: Bowman, D.D., Lynn, R.C., Eberhard, M.L., Alcaraz, A. (Ed.) *Parasitologia Veterinária de Georgis [Georgis Veterinary Parasitology]*. Manole, São Paulo, 422p.
- Campello, SB, Dos Anjos, BL, Moraes, DP, Wronski, JG and De Assis Brasil, N** (2017). Surto de intoxicação por nitroxinil em ovinos [Outbreak of nitroxylnil poisoning in sheep]. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*. **8**.
- Ceballos, L, Canton, C, Pruzzo, C, Sanabria, R, Moreno, L, Sanchis, J and Alvarez, L** (2019). The egg hatch test: a useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **271**, 7-13. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.06.001
- Cezar, AS, Toscan, G, Camillo, G, Sangioni, LA, Ribas, HO and Vogel, FSF** (2010) Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology* **173**, 157-160. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.013
- Coles, GC and Stafford, KA** (2001). Activity of oxyclozanide, nitroxylnil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record* **148**, 723- 724. doi: 10.1136/vr.148.23.723
- De Faria, PHA, Lima Filho, ACM, Gonçalves, CA, De Carvalho, FS, Galvão, GM, Martins, TRM and Machado, AS** (2021). Fitoterápicos com pontencial de ação antiparasitária presentes na baixada maranhense. *Brazilian Journal of Development* **7**, 27361-27376. doi: 10.34117/bjdv7n3-443
- De Moraes, J, Almeida, AA, Brito, MR, Marques, TH, Lima, TC, De Sousa, DP and Freitas, R.M** (2013). Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. *Planta Medica* **79**, 253-258. doi: 10.1055/s-0032-1328173
- Fairweather, I and Boray, JC** (1999) Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *The Veterinary Journal* **158**, 81-112. doi: 10.1053/tvj.1999.0377
- Fairweather, I, Mcshane, DD, Shaw, L, Ellison, SE, O'hagan, NT, York, EA, Brennan, GP** (2012) Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *Veterinary Parasitology* **183**, 249-259. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.023
- Fang, W, Yang, J, Wang, HY, Chen, SR, Li, KR, Liu, YH and Li, TM** (2022) Exploration of animal models to study the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 1-28. doi: 10.1017/S0031182022000609
- Fanke J, Charlier J, Steppin T, Von Samson-Himmelstjerna G, Vercruysse J, Demeler J,** (2017) Economic assessment of *Ostertagia ostertagi* and *Fasciola hepatica* infections in dairy cattle herds in Germany using Paracalc®. *Veterinary Parasitology* **240**, 39–48. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.03.018
- Freire, ICM, Pérez, ALAL, Cardoso, AMR, Mariz, BALA, Almeida, LFD, Cavalcanti, YW and Padilha, WWN** (2014) Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **16**, 372- 377. doi: 10.1590/1983-084X/12_053
- Fox, N, White, P, Mcclean, C, Marion, G, Evans, A and Hutchings, M** (2011) Predicting

- impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PLoS One* **6**. doi: 10.1371/journal.pone.0016126
- Gaínza, YA, Domingues, LF, Perez, OP, Rabelo, MD, López, ER and Chagas, ACS** (2015) Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Industrial Crops Products* **76**, 647-652. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.056
- Giongo, JL, Vaucher, RDA, Borin, D, Correa, MS, Dos Santos, VB, Santos, RCB, Boligon, AU, Athayde, ML, Bonez, PC, Rossi, GG, De Campus, MMA, Gomes, P and Steppe, M** (2015) Antimycobacterial, antimicrobial and antifungal activities of geranium oil loaded nanocapsules. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **7**, 414-419
- Girão, ES and Ueno, H** (1985) Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **20**, 905-912.
- Hamidpour, R, Hamidpour, S, Hamidpour, M, Marshall, V and Hamidpour, R** (2017) *Pelargonium graveolens* (Rose Geranium)-A novel therapeutic agent for antibacterial, antioxidant, antifungal and diabetics. *Archives in Cancer Research* **5**. doi: 10.21767/2254-6081.1000134
- Hierro, I, Valero, A, Perez, P, Gonzalez, P, Cabo, MM, Montilla MP and Navarro, MC** (2004) Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* sl L3 larvae. *Phytomedicine* **11**, 77-82. doi: 10.1078/0944-7113-00375
- Jeyathilakan, N, Murali, K, Anadaraj, A, Latha, BR and Abdul Basith, S** (2010) Anthelmintic activity of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Azadirachta indica* on *Fasciola gigantica*. *Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences* **6**, 204-209.
- Kelley, J.M, Elliott, TP, Beddoe, T, Anderson, G, Skuce, P and Spithill, TW** (2016) Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology* **32**, 458-469.
- Kiuchi, F, Myashita, N, Tsuda, Y, Kondo, K and Yoshimura, H** (1987) Studies on crude drugs effective on visceral larva Migrants. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **35**, 2880-2886. doi: 10.1248/cpb.35.2880
- Li, ZH, Cai, M, Liu, YS, Sun, PL and Luo, SL** (2019) Antibacterial activity and mechanisms of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules* **24**. doi: 10.3390/molecules24081577
- Lopes, JM, Souza, CF, Saccol, EMH, Pavanato, MA, Antoniazzi, A, Rovani, MT, Heinzmann, BM and Baldisserotto, B** (2018) *Citrus x aurantium* essential oil as feed additive improved growth performance, survival, metabolic, and oxidative parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition* **25**, 310-318. doi: 10.1111/anu.12854
- Martínez-Valladares, M, Del Rosario Famularo, M, Fernández-Pato, N, Castañón-Ordóñez, L, Cordero-Pérez, C and Rojo-Vázquez, FA** (2010) Efficacy of nitroxylin against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitology Research* **107**, 1205-1211. doi: 10.1007/s00436-010-1989-5
- Martínez-Valladares, M, Cordero-Pérez, C, Rojo-Vázquez, FA** (2014) Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Experimental Parasitology* **136**, 59-62. doi: 10.1016/j.exppara.2013.10.010

- Martins, IVF, Avelar, BRD, Bernardo, CDC, Leão, ACD and Salim, MJ** (2014) Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: na update. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **23**, 23-29. doi: 10.1590/S1984-29612014003
- Mas-Coma, S, Bargues, MD and Valero, MA** (2005) Fascioliasis and other plantborne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* **35**, 1255-1278.
- Mas-Coma, S, Valero, MA and Bargues, MD** (2014) Fascioliasis. Advances in experimental medicine and biology. *Diagenetic trematodes*, 766, 77–114.
- Mas-Coma, S, Bargues, MD and Valero, MA** (2018) Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. *Parasitology* **145**, 1665–1699. doi: 10.1017/S0031182018000914
- McConville, M, Brennan, G, McCoy, M, Castillo, R, Hernandez-Campos, A, Ibarra, F and Fairweather, I** (2006) Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: Surface and subsurface tegumental responses to *in vitro* treatment with the sulfoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology* **133**, 195-208. doi: 10.1017/S0031182006000114
- Mckinstry, B, Fairweather, I, Brennan, GP and Forbes, AB** (2003) *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment in vivo and in vitro with nitroxylinil (Trodax). *Parasitology Research* **91**, 251-263. doi: 10.1007/s00436-003-0930-6
- Mehmood, K, Zhang, H, Sabir, AJ, Abbas, RZ, Ijaz, M, Durrani, AZ, Saleem, MH, Ur-Rehman, M, Iqbal, MK, Wang, Y, Ahmad, HI, Abbas, T, Hussain, R, Ghori, MT, Ali, S, Khan, AU and Li, J** (2017) A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microbial Pathogenesis* **109**, 253–262. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.006
- Melo, LRBD, Sousa, LCD, De Menezes Oliveira, CS, Alvares, FBV, Ferreira, LC, Bezerra, RA and Vilela, VLR** (2021) Resistance of bovine gastrointestinal nematodes to four classes of anthelmintics in the semiarid region of Paraíba state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* **30**. doi: 10.1590/S1984-29612021077
- Mohammed, BR** (2015) The impact of fasciolosis on food security in Nigeria: a review. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research* **3**, 758-761.
- Molento, MB and Pritsch, ICJ** (2018) *Agroin Comunicação* **1**, 8-10.
- Monteiro, SG** (2017) *Parasitologia na medicina veterinária*. Roca, São Paulo, 356 p. ISBN 978857241882.
- Moosavy, MH, Hassanzadeh, P, Mohammadzadeh, E, Mahmoudi, R, Khatibi, SA and Mardani, K** (2017) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Lemon (*Citrus limon*) peel in vitro and in a food model. *Journal of Food Quality and Hazards Control* **4**, 42-48.
- Nova, LEV, Costa, ME, De Melo, PGCF, Cunha Filho, LFC, Junior, FAB, Da Silva, LC and Bogado, ALG** (2014) Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* **8**, 159-171. doi: 10.5935/1981-2965.20140011
- Novobilský, A, Solis, NA, Skarin, M and Höglund, J** (2016) Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test.

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance **6**, 141-147. doi: 10.1016/j.ijpddr.2016.06.004

Oliveira, AGD, Scarpa, MV, Correa, MA, Cera, LFR and Formariz, TP (2004) Microemulsions: Structure and application as drug delivery systems. *Química Nova* **27**, 131- 138. doi: 10.1590/S0100-40422004000100023

Oliveira, SM and Spósito Filha, E (2009) Divulgação técnica: Fasciolose hepática. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo* **71**, 5-7.

Plumb, JA (2004) Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture*. Humana Press. 165-169.

Rapic, D, Dzakula, N, Sakar, D and Richards, R (1988) Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxynil and rafoxanide against immature and mature *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle. *Veterinary Record* **122**, 59-62. doi: 10.1136/vr.122.3.59

Robles-Pérez, D, Martínez-Pérez, JM and Rojo-Vázquez, FA (2014) Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Veterinary Parasitology* **203**, 217–221. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.020

Rocha, C, Da Silva, NCS, Costa-Júnior, LM and Nunes, GS (2019) Advances in the development of technologies using essential oils for control of parasites of small ruminants. *Revista GEINTEC* **9**, 5067-5075.

Romero, J., Villaguala, C., Quiroz, F., Landaeta-Aqueveque, C., Alfaro, G., Pérez, R., (2019) Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of Triclabendazole and Nitroxynil in cattle of the central valley of Chile. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* **28**, 164-167. doi: 10.1590/S1984-296120180089

Royal Botanic Gardens. Base de dados online: Kewscience Plant names. Available at: <<http://www.kew.org/herbcat>>. Accessed on: November 22, 2020.

Sanabria, R, Ceballos, L, Moreno, L, Romero, J, Lanusse, C and Alvarez, L (2013) Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. *Veterinary Parasitology* **193**, 105-110. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.033

Sapra, B, Jain, S and Tiwary, AK (2008). Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. *The AAPS Journal* **10**. doi: 10.1208/s12248-008-9012-0

The International Plant Names Index, IPNI. Base de dados online: Kewscience Plant names. Available at: <<http://ipni.org>>. Accessed on: Dec. 22 2020.

Ueno, H and Gonçalves, PC (1998) Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. JICA, São Paulo, 166p.

Vidal, ML, Martins, I, Boeloni, J, Bolzan, T, Severi, JA (2019) Eficácia de extratos vegetais de *Punica granatum* L. no controle *in vitro* de ovos e adultos de *Fasciola hepatica*. *Enciclopédia Biosfera* **16**, 757-768. doi: 10.18677/EnciBio_2019A61

Willy, ML and René, CQ (2009) Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a albendazol y triclabendazol, La paz - Bolivia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* **20**, 54-262.

Wood, IB, Amaral, NK, Bairden, K, Duncan, JL, Kassai, T, Jr Malone, JB, Pankavich,

JA, Reinecke, RK, Slocombe, O, Taylor, SM (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* **58**, 181-213. doi: 10.1016/0304-4017(95)00806-2

Yamaguti, S. (1961) *Systema Helminthu: The Nematodes of Vertebrates*. Interscience Publishers, New York, 580p.

4. Manuscrito

Manuscrito II. Atividade do óleo essencial de cominho: eficácia e alterações no tegumento de *Fasciola hepatica*

.

Manuscrito será submetido ao periódico Experimental Control

O manuscrito é apresentado conforme as regras de formatação da revista para a qual será submetido.

Atividade do óleo essencial de cominho: eficácia e alterações no tegumento de *Fasciola hepatica*

Authors: Alexia Brauner de Mello^{1*}, Bruna Fruet Baccega¹, Filipe Obelar Martins¹, Ivandra Ignês de Santi¹, Marjorie de Giacometti¹, Mauro Pereira Soares², Camila Belmonte de Oliveira¹, Nara Amélia Farias¹.

COMUNICAÇÃO CURTA

Resumo

Fasciola hepatica infecta ruminantes causando grandes perdas econômicas. A influência negativa do parasitismo está crescendo devido ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica a drogas comerciais. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade do óleo essencial de cominho (*Cuminum cyminum* L.) contra ovos e adultos de *Fasciola hepatica*. Os ovos foram incubados nas concentrações de 0,031125, 0,06225, 0,1245, 0,249, 0,51875, 1,0375, 2,0075 e 4,15 mg/mL e utilizados três controles: nitroxinil (6,8mg/kg), água destilada (controle negativo) e Tween® 80. A contagem dos ovos viáveis foi realizada após o 14º dia pós-incubação. No teste adulticida, os trematodas foram incubados ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) contendo o óleo essencial e o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) e então observadas durante 24 horas (3 em 3 horas) pós-tratamento, juntamente como os grupos controle: nitroxinil, RPMI (controle negativo) e Tween® 80. Os óleos frente aos adultos foram testados nas duas menores concentrações eficazes no teste ovicida. Posteriormente ao teste os espécimes adultos foram processados e fixados em parafina para análise histológica. Foi observada a eficácia do óleo de cominho referente a inibição ovicida e adulticida frente o trematódeo *F. hepatica*, resultados significativos ($p < 0,05$) quando comparados com o controle negativo. Frente a análise histológica o óleo essencial de *C. cyminum* desmontrou marcadas áreas com vacuolização. Os espinhos não apresentaram alterações estruturais, no entanto encontravam-se envoltos por microvesículas. Visto isso, os resultados permitiram observar que óleo de cominho se mostrou como potencial composto para controle da fasciolose, importante enfermidade negligenciada.

Palavras-Chave: Anti-helmíntico. Óleo essencial. *Cuminum cyminum*.

1. Introdução

A fasciolose é a doença hepática de maior importância na medicina veterinária (Dalton, 2021). Suas perdas giram em torno de 3 bilhões de dólares anualmente (Cwiklinski, *et al.* 2016). O verme do fígado, *Fasciola hepatica* é comum em bovinos, ovinos, suínos, roedores e ocasionalmente o ser humano (Jacobs *et al.* 2015). Seu ciclo depende de condições ambientais e climáticas favoráveis, bem como a presença do hospedeiro intermediário (HI), molusco do gênero *Lymnaea*, fator importante em sua patogenicidade, e a presença de um mamífero, sendo o hospedeiro definitivo (HD) (Jacobs *et al.* 2015).

A patologia e relevância econômica da fasciolose é basicamente determinada pelo estágio de infecção e pelo número de trematódeos infectantes ingeridos, apresentando-se na forma aguda, sub-aguda ou crônica (Urquhart *et al.*, 1996). Na fase aguda ou sub-aguda da doença, as formas infectantes causam lesões, devido a migração na parede intestinal e fígado, provocando hemorragias, necrose e, geralmente, nessa fase o HD se mostra fraco, podendo ir a óbito (Jacobs *et al.* 2015). Quando os parasitos alcançam a maturidade, penetram nos ductos biliares e iniciam suas migrações através do epitélio, alimentando-se de sangue e gerando áreas inflamatórias (Oliveira; Spósito Filha, 2009).

Na forma aguda os sinais clínicos mais comuns são dores abdominais, anemia, apatia, anorexia e edema da conjuntiva (Escalona, 2012). A forma sub-aguda é acompanhada de ascite, edema submandibular, rápida perda de peso e anemia. A forma mais comum, a crônica caracteriza-se comumente como inchaço abdominal, emaciação, anemia, redução da produção de leite ou lã, casos de evolução para morte são mais habituais em ovinos (Sargison, 2008).

Para um controle significativo da doença, são necessários fasciolicidas de fácil aplicação, eficazes contra formas adultas e imaturas e que não deixem resíduos na carne e leite (ECHEVARRIA, 2004). No entanto os atuais fármacos existentes contam com diversos episódios de resistência, destacando a necessidade de novas formas de controle para essa zoonose emergente (Fairweather, 2011; Villegas *et al.* 2012).

A aplicação de compostos bioativos está sendo amplamente estudada para o combate de agentes patógenos, como por exemplo, os óleos essenciais. O óleo essencial (OE) de *Cuminum cyminum* (cominho) é abundantemente conhecido por sua capacidade inseticida, antimicrobiana, antidiabética, anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (Al-Snafi, 2016). Além de efeitos anti-helmínticos (Da Silva *et al.* 2020; De Castro *et al.* 2021). Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia *in vitro* do OE de *C. cyminum* em ovos e adultos de *Fasciola hepatica*.

2. Material e Métodos

2.1 Coletas e recuperação de ovos e adultos de *Fasciola hepatica*

A coleta e recuperação dos espécimes de *F. hepatica* foram realizadas a partir de fígados infectados, detectados no exame *post mortem* e cedidos por frigorífico localizado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul (Brasil).

2.2 Aquisição de óleos e cromatografia gasosa

O óleo essencial de *Cuminum cyminum* (CYM) foi disponibilizado pelo Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) do da Universidade Federal de Pelotas.

Para a identificação dos metabólitos presentes no OE *C. cyminum* (CYM) foram submetidos à análise cromatográfica no equipamento GC/MS, marca Shimadzu QP2010, equipado com um divisor split/splitless, com coluna capilar Rtx-5MS Restek (30 mx 0.25 mmx 0.25 µm) sob as seguintes condições cromatográficas: Transportador de gás de hélio obtido por fragmentos de impacto de elétrons até uma taxa de 70 eV de 1.2 mL/min, fluxo dividido de 1:50 e o volume da amostra injetada de 1 µL. Temperatura programada do forno: a temperatura inicial era de 40°C com uma rampa de aquecimento de 5°C/min a 280° C por 10 minutos, totalizando 58 minutos de corrida, com temperatura de injetor e de interface de 280° C. Os compostos foram analisados usando biblioteca NIST08 GC.

2.3 Ensaio de atividade ovicida dos óleos contra *Fasciola hepatica*

Os testes foram realizados com base nas metodologias descritas por Fairweather *et al.* 2012, Robles-Pérez *et al.* (2014) e Arafa *et al.* (2015). Posterior a coleta, os trematódeos foram imediatamente armazenados em frascos de vidro contendo solução salina aquecida a 30°C para a liberação de ovos. Estes foram separados dos adultos com o auxílio de uma tamise (200 µm) e transferidos para um cálice de sedimentação. A solução contendo os ovos foi lavada três vezes com água destilada e então filtrou-se essa solução de acordo com a técnica dos quatro tamises de Ueno (Girão; Ueno, 1985). Por fim, os ovos foram armazenados em frascos contendo água destilada e refrigerados até a preparação do ensaio de eclosão (Ueno; Gonçalves, 1998).

Para uma padronização, foi utilizado o cálculo da quantidade de ovos por mL, utilizando média aritmética. Calculou-se a média de três amostras para a determinação da quantidade de ovos (n= 500 ovos) em cada poço da placa. Durante a realização do teste, os ovos foram depositados em placas de seis poços, juntamente com os controles e o óleo essencial conforme sua concentração. Por fim, as placas foram embaladas em papel alumínio, para que os ovos não

entrassem em contato com a luz ambiente e incubadas a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ e umidade 80% em câmara climática por 14 dias, até a realização da contagem dos ovos eclodidos. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração de óleo testado e dos controles realizados.

Para o teste foram utilizados como controle positivo, o fármaco nitroxinil (NIT) na dose equivalente a dose terapêutica (6,8 mg/kg), obtido pela Dovenix® Supra (Boehringer Ingelheim), controle negativo (CN) contendo água e ovos e o controle do Tween® 80 (T) 1%. Para os OE de *C. cyminum* foram testadas as concentrações 0,031125, 0,06225, 0,1245, 0,249, 0,51875, 1,0375, 2,0075 e 4,15 mg/mL.

A contagem dos ovos não embrionados, embrionados e eclodidos foi realizada após 14 dias de incubação, utilizando-se o microscópio invertido (Olympus - CKX 41). Foi analisado o desenvolvimento dos ovos, os quais foram quantificados de acordo com os padrões de desenvolvimento como não embrionados, embrionados ou eclodidos.

2.4 Ensaio de atividade adulticida dos óleos contra *F. hepática*

Os adultos de *F. hepatica* foram coletados dos fígados e mantidos em frascos contendo sangue fresco, buscando deixar os espécimes em temperatura e umidade adequada para sua sobrevivência. Os exemplares foram selecionados e lavados com água destilada. Os trematodas foram alocados em placas de petri (n=3) com 10 mL de meio de cultura RPMI Medium 1640 (Gibco® by life technologies™) e 10 mL do óleo a ser testado sob diferentes concentrações (Jeyathilakan *et al.* 2010). Os grupos utilizados como controle foram: NIT, T e CN. As leituras foram realizadas em 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h e 24h pós-incubação.

Os espécimes, a cada tempo de observação, foram analisados de acordo com a metodologia utilizada por Kiuchi *et al.* (1987), com modificações, sendo definidos como com ausência movimento (morto) e apresentando movimento (vivo).

Por fim, os exemplares foram fixados por imersão em solução formalina 10% durante 24 horas. Posteriormente foram realizados cortes transversais (secções 3-4 μm), embebidas em parafina, coradas com hematoxilina-eosina (HE) e observadas em microscópio óptico.

2.5 Ensaio de Citotoxicidade

Para avaliação da viabilidade celular *in vitro* após exposição dos óleos, foram utilizadas células da linhagem MDBK (Madin-Darby-Bovine-Kidney). A avaliação quantitativa da viabilidade celular foi realizada através do método MTT utilizando o corante MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (Mosmann, 1983). As células MBDK foram cultivadas em microplacas por 24 h em câmara de CO_2 a 37°C até a confluência. Em seguida,

foram feitas as diluições em série das diferentes soluções do óleo no MEM. A viabilidade celular foi avaliada após a exposição das células nas diferentes concentrações do óleo por 48h. Após esse período, o sobrenadante (solução MEM + óleo) foi aspirado e 50µL/ poço de MTT (1 mg/mL) foi adicionado em cada poço das placas de cultura de células de 96 orifícios e mantido em câmara de CO² por 4 h. O MTT foi eliminado e 50 µg / poço de álcool etílico foi adicionado, retornando as placas à câmara de CO² por mais dez minutos para posterior aula. A absorção em 540nm foi determinada espectrofotométrica, de acordo com o protocolo (ISO/EN10993-5, 2009).

2.6 Análise estatística

Para determinação da eficácia do óleo testado utilizou-se a fórmula: eficácia (%) = [(% média do grupo controle negativo – % média do grupo tratado) / % média do grupo controle negativo] x 100. O resultado obtido equivale ao percentual de eficácia do grupo tratado em comparação com o grupo controle (Wood *et al.* 1995).

As análises estatísticas frente aos ovos e aos adultos foi realizada por análise unidirecional variância (ANOVA) usando um valor de probabilidade de p <0,05, seguido pelo Teste de Tukey (GraphPad PRISM® 8 Software).

3. Resultados

3.1 Cromatografia gasosa

O óleo essencial de *Cuminum cyminum* obteve como compostos majoritários o cumaldeído, 2-caren 10-al e 1-fenil-1 butanol. Os demais constituintes podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Cromatografia do Óleo essencial de *C. cyminum*.

Constituintes	<i>Cuminum cyminum</i>
Cumaldeído	26,80%
2-caren 10-al	22,17%
1-fenil-1 butanol	19,47%
Gamma-Terpinen	15,24%
Beta-pinene	10,75%
Cymene	5,56%

3.2 Avaliação dos óleos essenciais em ovos de *Fasciola hepatica*

Os resultados obtidos no teste *in vitro* nas concentrações realizadas frente aos ovos podem ser observados na Tabela 5. Todas as concentrações testadas do óleo essencial tornaram os ovos inviáveis, sem a formação de miracídios em seu interior, não permitindo o desenvolvimento do trematódeo e consequentemente, mantendo-os não embrionados. Todas as concentrações nos óleos foram significativas ($p < 0,05$) quando comparadas com o controle negativo. Os controles realizados referentes ao controle negativo, Tween® 80 e nitroxinil podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 5. A porcentagem de ovos eclodidos após a incubação do óleo essencial de *Cuminum cyminum* de ovos de *Fasciola hepatica* e a porcentagem da ação ovicida nas diferentes concentrações testadas. Todos os grupos testados tiveram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Dose (mg/mL)	4,15	2,075	1,0375	0,51875	0,249	0,1245	0,06225	0,031125
% Eclodidos	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
% Ação Ovicida	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)

Tabela 6. A porcentagem de ovos eclodidos após a incubação do controle negativo, controle positivo (Nitroxinil) e Tween® 80 de ovos de *Fasciola hepatica*. O controle positivo testado apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Dose (mg/mL)	Controle Negativo	Nitroxinil	Tween® 80
% Ovos Eclodidos (SD)	95,92(1,67)	16,01(0,44)	93,48(3,23)
% Ação Ovicida (SD)	-	83,87(0,58)	-

3.3 Avaliação dos óleos essenciais em adultos de *Fasciola hepatica*

Os adultos de *F. hepatica* foram analisados por um total de 24 horas quanto sua motilidade em cada tratamento. Os exemplares (n=9) do controle negativo (RPMI) moviam todas partes do corpo até o tempo final (24h), apresentavam ótima motilidade. O controle de Tween® 80, ao final do teste (24h) apresentou os exemplares (n=9) viáveis e com boa motilidade, mostrando que o composto utilizado para diluição dos óleos não alterou a sobrevivência dos espécimes. O controle positivo contendo nitroxinil inativou todos os exemplares (n=9) com 6 horas de testagem. O óleo de *C. cyminum* no tempo de 15 horas, inativou todos os exemplares na maior concentração testada, 0,06225 mg/mL. Já a menor concentração, 0,031125%, permaneceu com espécime vivo até o final do experimento.

Frente a avaliação histológica os espécimes do controle negativo apresentaram o sincício do tegumento com aspecto homogêneo e com a presença de espinhos em grande maioria externalizados (Fig. 4 – I), sem nenhum sinal de lesão ou anormalidades. Os espécimes tratados com o fármaco Nitroxinil apresentaram vacuolização na camada interna do sincício do tegumento (seta) e ao redor dos espinhos, que se encontravam em grande maioria internalizados ou destruídos. Vacuolização também presente na região superficial e profunda da musculatura (cabeça da seta) (Fig. 4 – II).

Por fim, o grupo tratado com OE de *C. cyminum* apresentou marcada vacuolização próximo da lâmina basal do sincício tegumental, formando grandes vesículas (cabeça da seta). Ao redor dos espinhos havia grande quantidade de microvesículas (seta) (Fig. 4– III). Os espinhos, não estavam alterados, mas aparentemente não se externalizavam, provavelmente devido ao marcado acúmulo de líquidos ao seu redor (seta e cabeça da seta) (Fig. 4 – IV). As células do ceco e testis desapareceram restando apenas a lâmina basal (Fig. 4 – III).

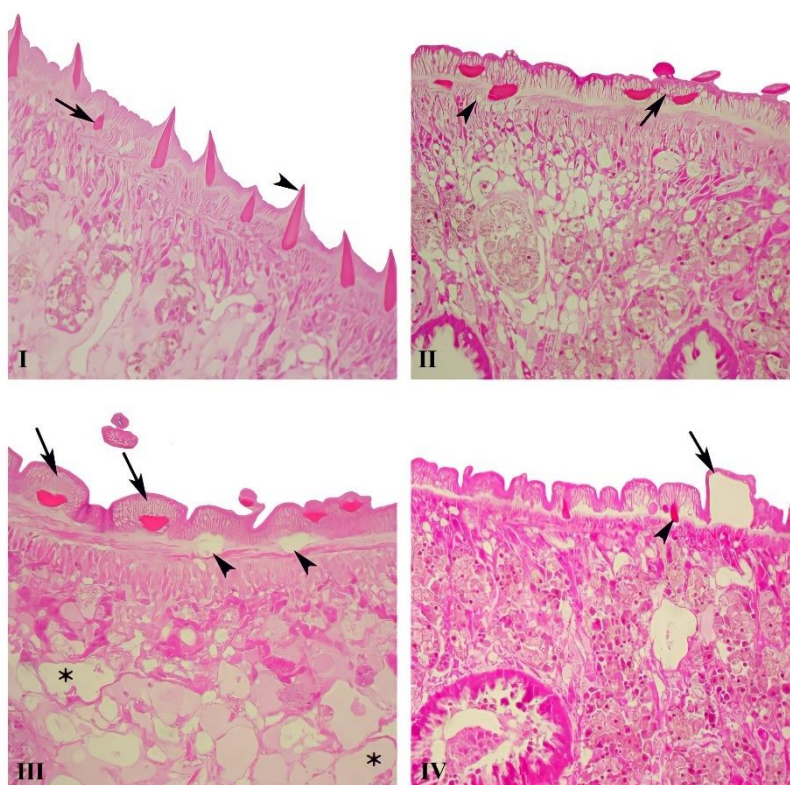


Figura 4. Histopatologia *Fasciola hepatica*. (I) Controle Negativo – Sincício do tegumento apresentando aspecto homogêneo e espinhos externalizados (cabeça de seta). Sincício do tegumento apresentando aspecto homogêneo com poucos espinhos internalizados (seta). 200 X. (II) Nitroxinil – Vacuolização na camada interna do sincício tegumental imediatamente acima da lâmina basal e ao redor dos espinhos (seta). Camada muscular superficial e profunda apresentando vesículas (cabeça de seta. HE. 200 X. (III) *C. cyminum* 0,031125 mg/mL – Marcada vacuolização próximo à lâmina basal do sincício tegumental formando grandes vesículas (cabeça da seta). Espinhos internalizados aparentemente normais rodeados por microvesículas (seta). Células do ceco e testis desapareceram restando apenas a lâmina basal (Fig. 4 – III).

desapareceram restando apenas a lâmina basal (*). HE. 200X. (IV) *C. cyminum* 0,06225 mg/mL – Espinho internalizado (cabeça da seta) rodeado por microvesículas. Grande vesícula se estendendo desde a lâmina basal até próximo à membrana externa do sincício tegumental (seta). HE. 200X.

3.5 Viabilidade celular

A viabilidade das células MDBK (Madin-Darby-Bovine-Kidney) foi realizada frente as diferentes concentrações testadas e extrapoladas do óleo essencial de *Cuminum cyminum*, variando de 4,15-0,031125 mg/mL. Foram expressas em porcentagem (%): 4,15 (58%), 2,07 (59%), 1,0375 (60%), 0,51875%, 0,249 (60%), 0,1241 (66%), 0,06225 (85%) e 0,031125 (93%).

4. Discussão

O óleo de cominho foi muito estudado ao longo do tempo por suas incríveis características fitoterápicas. Seus efeitos são diversos, como ação inseticida, antifúngica, anticancerígena e antibacteriana (Benelli *et al.* 2018; Vieira *et al.* 2019; Nirmala *et al.* 2020). Kumar *et al.* (2012) mostraram o potencial anti-helmíntico do composto contra *Pheritima posthuma* (annelida), organismo muito utilizado devido sua anatomia e fisiologia serem semelhantes com a dos helmintos intestinais, abrindo portas para novas pesquisas com esse composto. Estudos com o OE de cominho em *F. hepatica* são escassos, principalmente com atividade adulticida. Da Silva e colaboradores (2020), os quais, em concentrações semelhantes às aqui testadas obtiveram resultados satisfatórios na inibição das fases imaturas do trematódeo.

A atividade mosluquicida do óleo de cominho foi relatada por Sousa *et al.* (2014) que observaram resultados promissores em *Radix* (syn. *Lymnaea*), molusco de água doce europeu, identificado como HI suscetível a *F. hepatica*. Os métodos atuais de controle do hospedeiro intermediário em grande maioria são proibidos devido a poluição à fauna e flora (Torgerson; Claxton 1999), sendo assim a busca de compostos que o combatam também é um vies de estudo de extrema importância e possível frente as características do OE de cominho.

Para o OE de *C. cyminum* o composto majoritário foi o cumaldeído (26,8%), dados semelhantes com os achados por Wongkattiya *et al.* 2019 e Vieira *et al.* (2019) que encontraram 27,10% e 32,66% de cumaldeído, respectivamente. Suas incríveis capacidades fitoterápicas podem estar relacionadas ao seu composto majoritário, como descrito por Goel e colaboradores (2020), que no nematódeo *Haemonchus contortus* induziu dano físico mediado por estresse oxidativo seguido de morte. Através de observações feitas em nosso estudo, os espécimes

expostos ao cominho da mesma forma sofreram dano físico, apresentando áreas do tegumento danificadas e irregulares, sugerindo que a morte ocorreu através de sucessivas danificações no tegumento. Partindo para outro vies, através da análise histológica, ao redor dos espinhos havia grande quantidade de microvesículas, dificultando sua externalização e impedindo assim que o trematódeo se fixe ao seu hospedeiro, essa característica impossibilita o seguimento de seu ciclo biológico (Ribeiro *et al.* 2017).

A fasciolose ainda hoje não conta com um anti-helmintíco específico para seu tratamento. Sendo assim, utiliza-se para combate principalmente fármacos do grupo benzimidazóis, macrolactonas, imidazotiazoles e das salicilanilideos (Borges, 2003). A resistência parasitária é descrita a partir da década de 90 (Boray; De Bono, 1990) e em diversos países como Espanha, Brasil, Bolívia, Argentina, Peru e Austrália (Alvarez-Sanchez *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2008; Mamani; Condori, 2009; Olaechea *et al.* 2011; Chávez *et al.* 2012; Brockwell *et al.* 2014). Sendo assim, compostos derivados de produtos naturais mostram-se promissores para tratamento da fasciolose, em substituição ou possível associação aos fármacos já existentes, visto que, a combinação de substâncias pode ser favorável conectando diferentes produtos com mecanismos de ação distintos e assim evitando a resistência parasitária (Lanusse *et al.* 2018).

5. Conclusão

O uso do óleo de *C. cuminum* foi eficaz no tratamento *in vitro* sobre o trematódeo *F. hepatica*, sendo observado sua eficácia em todas as concentrações testadas em ovos e na inativação dos adultos em 15 horas na maior dose testada. Com a sequência dos estudos *in vivo*, o presente OE pode vir a ser utilizados no controle da fasciolose, zoonose negligenciada de importância mundial.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem aos seguintes: Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Frigorífico Famile, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

Referências

- Al-Snafi, A.E., 2016. The pharmacological activities of *Cuminum cyminum*-A review. IOSR J. Pharm. 6, 46-65.
- Alvarez-Sanchez, M. A., Mainar-Jaime, R.C., Perez-Garcia, J., Rojo-Vázquez, F.A., 2006. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. Vet. Rec. 159, 424.
- Arafa, W.M., Shokeir, K.M., Khateib, A.M., 2015. Comparing an *in vivo* egg reduction test and *in vitro* egg hatching assay for different anthelmintics against *Fasciola* species, in cattle. Vet. Parasitol. 214.152-158.
- Benelli, G., Pavela, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Canale, A., Senthilnathan, S., *et al.* 2018. Not just popular spices! Essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* are toxic to insect pests and vectors without affecting non target invertebrates. Ind Crops Prod. 124, 236–243.
- Boray, J.C.; De Bono, D. 1990. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Resistance of parasites to antiparasitic drugs: Round Table Conference, ICOPA VII. Paris: Merck and Co. Inc. pp. 51-60.
- Borges, C.C.L., 2003. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). Parasitología latinoamericana. 58, 142-147.
- Brockwell, Y.M., Elliott, T.P., Anderson, G.R., Stanton, R., Spithill, T.W., Sangster, N.C. 2014. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. Int J Parasitol-Drug. 4, 48-54.
- Chávez, A., Sánchez, L., Arana, C., Suárez, F. 2012. Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. Rev. de Investig. Veterinario. del Peru. 23, 90-97.
- Cwiklinski, K., O'Neill, S.M., Donnelly, S., Dalton, J.P.A. 2016. Prospective View Of Animal And Human Fasciolosis. Parasite Immunol. 38, 558–568.
- Da Silva, M.A.M.P., Zehetmeyer, F.K., Pereira, K.M., Pacheco, B.S., Freitag, R.A., Pinto, N.B., *et al.* 2020. Ovicidal *in vitro* activity of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. and the essential oil of *Cuminum cyminum* L. against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Exp. Parasitol. 218.
- Dalton, J.P., 2021. Fasciolosis. CABI, USA, 474 p.
- De Castro, L. M., Pinto, N. B., De Moura, M. Q., Freitag, R. A., De Almeida Capella, G., Motta, T. O., *et al.* 2021 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Cuminum cyminum* contra *Haemonchus contortus* de ovinos. Braz. J. Dev. 7, 44079-44091.
- Escalona, C., 2012. Fasciolosis aguda. Rev Chilena Infectol. 29, 543-54.

Fairweather I. 2011. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy. *Vet. Parasitol.* 180. 133-143.

Fairweather, I., Mcshane, D.D., Shaw, L., Ellison, S.E., O'hagan, N.T., York, E.A., *et al.* 2012. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *Vet. Parasitol.* 183, 249-259.

Freire, I.C.M., Pérez, A.L., Cardoso, A.M.R., Mariz, B.A.L.A., Almeida, L. F.D., Cavalcanti, Y.W., *et al.* 2014. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. de Plantas Medicinai.* 16, 372-377.

Girão, E.S., Ueno, H., 1985. Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesq. Agro. Bras.* 20, 905-912.

Goel, V., Singla, L.D., Choudhury, D., 2020. Cuminaldehyde induces oxidative stress-mediated physical damage and death of *Haemonchus contortus*. *Biomed. Pharmacother.* 130.

Jacobs, D., 2015. Platyhelminthes ('flatworms'). In: Jacobs, D.; Fox, M.; Gibbons, L.; Hermosilla, C. (Ed.), *Principles of Veterinary Parasitology*, Oxford and Wiley-Blackwell, pp. 117-146.

Jeyathilakan, N., Murali, K., Anadaraj, A., Latha, B. R., Abdul Basith, S., 2010. Anthelmintic activity of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Azadirachta indica* on *Fasciola gigantica*. *Vet. Anim. Sci.* 6, 204-209.

Kiuchi, F., Myashita, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H., 1987. Studies on crude drugs e Vective on visceral larva Migrants. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 2880-2886.

Kumar, S., Goyas, K.K., Bilal, S., 2012. Anthelmintic activity of *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare* and *Eugenia caryophyllus* against *Pheritima posthuma*. *Indones. J. Pharm.* 23, 225-230.

Lanusse, C., Canton, C., Virkel, G., Alvarez, L., Costa-Junior, L., Lifschitz, A. 2018. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. *Trends Parasitol.* 34, 664-682.

Mamani, W., Condori, R. 2009. Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a Albendazol y Triclabendazol, La Paz-Bolivia. *Rev. de Investig. Veterinario. del Peru.* 20, 254-262.

Molento, M.B, Pritsch, I.C. 2018. *Fasciola hepatica* em bovinos no Brasil: uma doença negligenciada. AGROIN.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.

Nirmala, M. J., Durai, L., Rao, K. A., Nagarajan, R., 2020. Ultrasonic nanoemulsification of *Cuminum cyminum* essential oil and its applications in medicine. *Int. J. Nanomedicine.* 15.

- Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., Cabrera, R. 2011. Resistência de *Fasciola hepatica* contra triclabendazol em bovinos na Patagônia (Argentina). *Vet Parasitol.* 178, 364-366.
- Oliveira, S. M., Spósito Filha, E., 2009. Divulgação técnica: Fasciolose hepática. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo.* 71, 5-7.
- Oliveira, D. R., Ferreira, D. M., Stival, C. C., Romero, F., Cavagnolli, F., Kloss, A., *et al.*, 2008. Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in Almirante Tamandare, Parana, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 17, 149-153.
- Ribeiro, V.M.A., Coaglio, A.L., Oliveira, F.L.P., Pereira, C.A.J., Lima, W.D.S., 2017. Dynamics of haemocytes from *Pseudosuccinea columella* circulating infected by *Fasciola hepatica*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.* 26, 411-418.
- Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., 2014. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Vet. Parasitol.* 203, 217–221.
- Sargison, N., 2008. Fluke diseases of UK ruminant livestock Part 1: Life cycles, economic consequences and diagnosis. *UK Vet Livestock.* 13, 59-67.
- Sousa, R.M., Rosa, J.S., Cunha, A., Fernandes-Ferreira, M., 2014. Activity of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare*, *Petroselinum crispum* and *Cuminum cyminum* essential oils and volatile compounds against the freshwater snail *Radix peregra* (Lymnaeae). *Planta Med.* 80.
- Torgerson, P.R., Claxton, J., 1999. Epidemiology and control. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CABI Publishing, Wallingford and UK, pp. 113-150.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. JICA, São Paulo, 166p.
- Urquhart, G M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. 1996. *Veterinary Parasitology*. Wiley-Blackwell, Oxford and Reino Unido, pp. 103-113
- Vieira, J.N., Gonçalves, C.L., Villarreal, J.P.V., Gonçalves, V.M., Lund, R.G., Freitag, R.A., *et al.*, 2019. Chemical composition of essential oils from the apiaceae family, cytotoxicity, and their antifungal activity *in vitro* against candida species from oral cavity. *Braz. J. of Biol.* 79, 432-437.
- Villegas, F.; Angles, R.; Barrientos, R.; Barrios, G.; Valero, M.A.; Hamed, K., *et al.*, 2012. Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *PLoS Negl Trop Dis.* 6.
- Wongkattiya, N., Sanguansermisri, P., Frases, I. H., Sanguansermisri, D., 2019. Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from *Cuminum cyminum* L. collected in Thailand. *J. Complement. Integr. Med.* 16.

Wood, I. B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Jr Malone, J.B, *et al.*, 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58, 181-213, 1995.

5. Considerações finais

Na avaliação da eficácia dos óleos essenciais sobre os ovos de *F. hepatica* todas as concentrações avaliadas mostraram-se eficazes na inativação da eclosão dos miracídios em todos óleos testados.

Todos os óleos essenciais testados no experimento para ovos foram mais eficazes do que o fármaco albendazole, o qual possui o princípio ativo de amplo espectro utilizado para combate do trematódeo.

No estudo realizado com adultos, os óleos essenciais de *P. graveolens* e *C. cyminum* mostram uma maior eficácia. Os óleos de *Pelargonium graveolens* e *C. cyminum* a partir de 15 horas demonstraram eficácia em distintas concentrações, enquanto, o óleo de *C. aurantium* só se mostrou eficaz na maior concentração testada, em 18 horas.

O estudo apresenta o uso de óleos essenciais como novos compostos com potencial anti-helmíntico, visto que os medicamentos comumente utilizados para controle desta doença apresentam relatos de resistência em todo o mundo. Ainda são necessários estudos para comprovação da eficácia em testes *in viv* com esses compostos, bem como seu sinergismo com os fármacos já utilizados.

Referências

- ABIDU, M.; SCHERER, P.O.; CARNEIRO, V.S.; BARBOSA, P.S.; LESSA, C.S.S.; FREIRE, N.M.S. Estudo comparativo entre técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 3, n. 1, 1996.
- AL-SNAFI, A.E. The pharmacological activities of *Cuminum cyminum*-A review. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 6, n. 6, p. 46-65, 2016.
- ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F.L.C.; PEREIRA, T.F.C. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro profissional veterinário. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.1, n. 1, p. 67-74, 2006.
- ALMEIDA, B.R.; SANTILIANO, F.C.; ALVES, D.P. Avanços farmacológicos no tratamento da fasciolose em rebanho bovino. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 18, p. 1-17, 2012.
- ALVAREZ, L., MORENO, G., MORENO, L., CEBALLOS, L., SHAW, L., FAIRWEATHER, I., & LANUSSE, C. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 211-216, 2009
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M.A.; MAINAR-JAIME, R.C.; PEREZ-GARCIA, J.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. **Veterinary Record**, v. 159, n. 13, p. 424, 2006.
- ARAÚJO-FILHO, J.V.; RIBEIRO, W.L.; ANDRÉ, W.P.; CAVALCANTE, G.S.; GUERRA, C.M.; M., MUNIZ, C.R.; DE OLIVEIRA, L.M. Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. **Industrial crops and products**, v. 124, n. 1, p. 294-299, 2018.
- ARAÚJO, Sandra Alves de. **Potencial anti-helmíntico de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Linn) (Fabaceae) e *Spigelia anthelmia* (Linn)(Loganiaceae) contra *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)**. 94f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

ASGARPANA, J.; RAMEZANLOO, F. An overview on phytopharmacology of *Pelargonium graveolens* L., **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 12, n. 4, 558-563, 2015.

BARUCH, W.A. Fasciolíase. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Org.) **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 222-227

BEESELEY, N.J.; WILLIAMS, D.J.L.; PATERSON, S.; HODGKINSON. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 1, p.11-20, 2017

BELDING, D.L. Textbook of parasitology. 3ed. Appleton-Century-Crofts: New York, 1,3740, 1965.

BORAY, J.C.; CROWFOOT, P.D.; STRONG, M.B.; ALLISON, J.R.; SCHELLENBAUM, M.; VON ORELLI, M.; SARASIN, G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. **The Veterinary Record**, v. 113, n. 14, p. 315-317, 1983.

BORAY, J. C.; DE BONO, D. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: **Resistance of parasites to antiparasitic drugs**: Round Table Conference, ICOPA VII. Paris: Merck & Co. Inc., 1990. p. 51-60.

BORAY, J.C. Liver fluke disease in sheep and cattle. Primefact 446. G.W. Hutchinson, S. Love (Eds.). NSW Depart. Prim. Indust. p. 1-14, 2017.

BORGES, C.C.L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitología latinoamericana**, v. 58, n. 3-4, p. 142-147, 2003.

BOWMAN, Dwight D. Helminths. In: BOWMAN, Dwight D.; LYNN, Randy Carl.; EBERHARD, Mark L.; ALCARAZ, Ana. (Org.) **Parasitologia Veterinária de Georgis**. São Paulo: Manole, 2006. 422p.

BOWMAN, D.D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 10.ed. Saint Louis: Elsevier Health Sciences, 2014. 477 p.

- CARRADA-BRAVO, T.; ESCAMILLA, R. Fasciolosis: revisión clínico - epidemiológica actualizada. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, v.52, n. 2, p. 83-96, 2005.
- CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.
- CALZADA, F.; CEDILLO-RIVERA, R.; BYE, R.; MATA, R. Geranins C and D, additional new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. **Planta Med**, v. 67, n. 7, p. 677-80, 2001.
- CALRETAS, S.; LAÏZ, M.; SIMÃO, A.; CARVALHO, A.; RODRIGUES, A.; SÁ, A.; SANTOS, A.; SANTOS, R.; SILVA, J.A.P.; REIS, C.; ALMIRO, E.; PORTO, A. Seis casos de fasciolíase hepática. **Medicina interna**, v. 10, n. 4, p. 185-192, 2003.
- CAMPELLO, S.B.; DOS ANJOS, B.L.; MORAES, D.P.; WRONSKI, J.G.; DE ASSIS BRASIL, N. Surto de intoxicação por nitroxinil em ovinos. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 2, 2017.
- CARRADA-BRAVO, T. *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, v. 54, n. 1, p. 21-27, 2007.
- CEBALLOS, L.; CANTÓN, C.; CADENAZZI, G.; LARSEN, K.; VIRKEL, G.; MORENO, L.; FAIRWEATHER, I.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L. Understanding the main route of drug entry in adult *Fasciola hepatica*: further insights into closantel pharmacological activity. **Experimental parasitology**, v. 181, p. 23-29, 2017.
- CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 156-160, 2004.
- COSTA, V. M.; SIMÕES, S.V.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do nordeste do brasil. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 31, v. 1, p. 65-71, 2011.
- COLES, G.C.; STAFFORD, K.A. Activity of oxyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. **Veterinary Record**, v. 148, n. 1, p. 723-724, 2001.

CONCEIÇÃO, Maria Antonia P. **Fasciolose Bovina: Aspectos de diagnóstico e modelos de avaliação de risco: Novas abordagens**. 2001. Tese de conclusão de curso (Faculdade de Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T.; MATTOS, M.J.T. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. **Parasitología Latinoamericana**, v. 62, n. 4, p.188-191, 2007.

DA CUNHA, A. Proença; GASPAR, Natália.; ROQUE, Odete Rodrigues.; *Cultura e Utilização das Plantas Medicinais e Aromáticas*. 2ª ed. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 2013a, 742 p.

DA CUNHA, A. Proença; ROQUE Odete Rodrigues. *Aromaterapia: fundamentos e utilização*. 1ª ed. , Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 2013b, 363 p.

DA CUNHA, A. Proença; DA SILVA, Alda Pereira.; ROQUE, Odete Rodrigues.; CUNHA Eunice. *Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia*. 4ª ed. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 2015, 310 p.

DA SILVA, M.A.M.P.; ZEHETMEYR, F.K.; PEREIRA, K.M.; PACHECO, B.S.; FREITAG, R.A.; PINTO, N.B.; DA SILVA NASCENTE, P. Ovicidal *in vitro* activity of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. and the essential oil of *Cuminum cyminum* L. against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Experimental parasitology**, v. 218, p. 107984, 2020.

DALTON, John Pius. 2 ed. *Fasciolosis*. USA: CABI, 2021 474 p.

ESCALANTE, H.; DAVELOIS, K.; ORTIZ, P.; RODRÍGUEZ, H.; DÍAZ, E.; JARA, C. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 28, n. 3, 2011.

ESCALONA, C. Fasciolosis aguda. **Revista chilena de infectología**, v. 29, n. 5, p. 543-546, 2012.

PATIAS, I.S.; FAUSTO, V.P.; HOMRICH, S. S.; DE ALMEIDA VAUCHER, R.; RECH, V.C.; GIONGO, J.L. Estabilidade e atividade antifúngica de nanoemulsão contendo óleo de gerânio incorporada em hidrogel. **Disciplinarum Scientia Naturais e Tecnológicas**, v. 17, n. 2, p. 269-283, 2016.

ECHEVARRIA, F.A.M. Mesa redonda sobre fasciolose bovina. **A Hora Veterinária**, v.1, p.27-31, 1995.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3-4, p. 199-206, 1996.

ECHEVARRIA, F.A.M. Fasciolose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 100-102, 2004.

EL-ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M., ADDI, E. A.; CASABIANCA, H.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n.1-2, p.220-243, 2015.

FAIRWEATHER, I. Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. **Journal Helminthol**, v. 79, n. 3, p. 227-234, 2005.

FAIRWEATHER, I.; BORAY, J.C. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. **Veterinary Journal**, v. 158, n. 2, p. 81-112, 1999.

FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.133-143, 2011.

FAIRWEATHER, I.; MCSHANE, D.D.; SHAW, L.; ELLISON, S.E.; O'HAGAN, N.T.; YORK, E.A.; BRENNAN, G.P. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3, p. 249-259, 2012

FOREYT, William J. **Parasitologia Veterinária: Manual de referência**. 5.ed. São Paulo: Roca, 2005. 238p.

GAÍNZA, Y.A.; DOMINGUES, L.F.; PEREZ, O.P; RABELO, M.D.; LÓPEZ, E.R.; CHAGAS, A.C.S. Anthelmintic activity *in vitro* of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. **Industrial Crops and Products**. v. 76, p. 647-652, 2015.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. **Food Chemistry**, v.100, n.1-2, p. 898-904, 2007.

GNIEWOSZ, M.; KRAŚNIEWSKA, K.; KOSAKOWSKA, O.; POBIEGA, K.; WOLSKA, I. Chemical compounds and antimicrobial activity of petitgrain (*Citrus aurantium* L. var. amara) essential oil. **Herba Polonica**, v. 63, n. 4, p. 18-25, 2017.

GIRÃO, E.S.; UENO, H. Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 8, p. 905-912, 1985.

GOMES, P.B.; MATA, V.G.; RODRIGUES, A.E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1-2, p. 50-60, 2006.

GUIMARÃES, Marcos Pezzi. *Fasciola hepatica*. In: NEVES, D.P., MELO, A.L., LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Org). **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu: 2004. p. 223-226.

HANNA, R. *Fasciola hepatica*: histology of the reproductive organs and differential effects of triclabendazole on drug-sensitive and drug-resistant fluke isolates and on flukes from selected field cases. **Pathogens**, v. 4, n. 3, p. 431-456, 2015.

HODGKINSON, J.E.; CWIKLINSKI, K.; BEESLEY, N.; HARTLEY, C.; ALLEN, K.; WILLIAMS, D.J. Clonal amplification of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula*: within and between isolate variation of triclabendazole-susceptible and-resistant clones. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2018.

HOWELL, A.; BAYLIS, M.; SMITH, R.; PINCHBECK, G.; WILLIAMS, D. Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, p. 41-48, 2015.

HUSSEIN, A.N.A.; HASSAN, I.M.; KHALIFA, R.M.A. Description of eggs and larval stages of *Fasciola*, light and scanning electron microscopic studies. **Research Journal of Parasitology**, v. 5, p. 1-12, 2010.

HUSSAIN, A.; KHAN, M. N.; IQBAL, Z.; SAJID, M.S. An account of the botanical anthelmintics used in traditional veterinary practices in Sahiwal district of Punjab, Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, v. 1, p. 185-190, 2008.

HUSSAIN, A.; ANWAR, F.; SHAHID, M.; ASHRAF, M.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint

(*Mentha spicata* L.) from Pakistan. **Journal of Essent Oil Research**, v. 22, n. 1, p 78-84, 2010.

ITIS (Integrated Taxonomic Information System) report, *Cuminum cyminum* L. Acesso em: 17 fev. 2022., Disponível em: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=18063#null>.

JACOBS, D. Platyhelminthes ('flatworms'). In: JACOBS, D.; FOX, M.; GIBBONS, L.; HERMOSILLA, C. **Principles of Veterinary Parasitology**. 1. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2015. p. 117-146.

JALALI-HERAVI, M.; ZEKAVAT, B.; SERESHTI, H. Characterization of essential oil components of Iranian geranium oil using gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, n. 1, p. 154-163, 2006.

JEYATHILAKAN, N.; MURALI, K.; ANADARAJ, A.; LATHA, B. R.; ABDUL BASITH, S. Anthelmintic activity of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Azadirachta indica* on *Fasciola gigantica*. **Veterinary e Animal Sciences**, v. 6, n. 4, p. 204-209, 2010.

JIA, S.; HU, Y.; ZHANG, W. ZHANG, W.; ZHAO, X.; CHEN Y.; SUN, Y.; LI, X.; CHEN, K. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of neohesperidin derived from *Citrus aurantium* L. in diabetic KK-A y mice. **Food & Function**, v. 6, n. 3, pp. 878–886, 2015.

JOHRI, R. *Cuminum cyminum* and *Carum carvi*: An update. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p. 63-72, 2011.

KEELEY, J. M.; ELLIOTT, T.P.; BEDDOE, T.; ANDERSON, G.; SKUCE, P.; SPITHILL, T.W. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 458-469, 2016.

KIUCHI, F.; MYASHITA, N.; TSUDA, Y.; KONDO, K.; YOSHIMURA, H. Studies on crude drugs effective on visceral larva Migrants. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 1, p. 2880–2886, 1987.

KOZAN, E.; AKKOL, E.K.; SÜNTAR, İ. Potential anthelmintic activity of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. **Journal of ethnopharmacology**, v.187, p.183-186, 2016.

KOWALTSCHUK, I.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FARIA, C. M. D. R.; NEVES, W. S.; CAVALLIN, I. C.; LEITE, C. D. Avaliação de produtos medicinais à base de plantas anti-helmínticas no controle do nematóide das galhas. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 1, 2011.

KUMAR, S.; GOYAS, K.K.; BILAL, S. Anthelmintic activity of *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare* and *Eugenia caryophyllus* against *Pheritima posthuma*. **Indonesian Journal of Pharmacy**, v. 23, n. 4, p. 225-230, 2012.

LACEY, E. O papel da proteína do citoesqueleto, tubulina, no modo de ação e mecanismo de resistência aos benzimidazóis. **International Journal for Parasitology**, v. 8, p. 399-404, 1988.

LEELA, N.K.; KHAN, R.M.; REDDY, P.P.; NIDIRY, E.S.J. Nematicidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, 1992.

LEITE, M.P.; FASSIN JR., J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 661–666, 2008

LEE, S.H.; YUMNAM, S.; HONG, G.E.; RAHA, S.; SARALAMMA, V.V.G.; LEE, H.J.; HEO, J.D.; LEE, S.J.; LEE, W-S.; KIM, E-H.; PARK, H.S.; KIM, G.S. Flavonoids of Korean *Citrus aurantium* L. induce apoptosis via intrinsic pathway in human hepatoblastoma HepG2 cells. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 12, pp. 1940–1949, 2015.

LI, R.; JIANG, Z. Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. **Flavour and fragrance journal**, v. 19, n. 4, p. 311-313, 2004.

LORENZI, H.; BACHER, L.B.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). São Paulo, Instituto Plantarum de estudos da flora, 2006. 672p.

LUQUE, J.L. Classe Trematoda. In: MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014, p. 181-190.

MAKSoud, S.; ABDEL-MASSIH, R.M.; RAJHA, H.N.; LOUKA, N.; CHEMAT, F.; BARBA, F. J.; DEBS, E. *Citrus aurantium* L. Active Constituents, Biological Effects and Extraction Methods. An Updated Review. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5832, 2021.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; DEL ROSARIO FAMULARO, M.; FERNÁNDEZ-PATO, N.; CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L.; CORDERO-PÉREZ, C.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. **Parasitology research**, v. 107, n. 5, p. 1205-1211, 2010.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; CORDERO-PÉREZ, C.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. **Experimental parasitology**, v. 136, n. 1, p. 59-62, 2014.

MATTOS, M.J.T.; UENO, H.; GONÇALVES, P.C. Ocorrência estacional e bioecologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) em habitat natural no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 6, p. 248-251, 1997.

MAS-COMA, M.S.; ESTEBAN, J.G.; BARGUES, M.D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 4, p. 340-346, 1999.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plantborne trematode zoonoses. **Journal Parasitol**, v. 35, n. 1, p. 1255-1278, 2005.

MAS-COMA, S., BARGUES, M.D., VALERO, M.A. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. **Parasitology**, v. 145, p. 1665–1699, 2018.

MAS-COMA, Santiago; VALERO, M Adela; BARGUES, M Dolores. Fascioliasis. In: **Digenetic Trematodes: Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 71-103, 2019.

MCKELLAR, Q.; SCOTT, E. **The benzimidazole anthelmintic agentes - A review.** J. Vet. Pharmacol. Ther., v. 13, p. 223-247, 1990.

MCKINSTY, B., FAIRWEATHER, I., BRENNAN, G. P., & FORBES, A. B. *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment *in vivo* and *in vitro* with nitroxynil (Trodax). **Parasitology Research**, v. 91, n. 3, pg. 251-263, 2003

MEHMOOD, K.; ZHANG, H.; SABIR, A.J.; ABBAS, R.Z.; IJAZ, M.; DURRANI, A.Z.; SALEEM, M.H.; UR-REHMAN, M.; IQBAL, M.K.; WANG, Y.; AHMAD, H.I.; ABBAS, T.; HUSSAIN, R.; GHORI, M.T.; ALI, S.; KHAN, A.U.; LI, J. A review on epidemiology,

global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 253–262, 2017.

MITHUN, B.H.P.; PRASHANT, G.M.; MURLIKRISHNA, K.S.; SHIVAKUMAR, K.M.; CHANDU, G.N. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: An *in vitro* study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 21, n. 3, p. 334-336, 2010.

MOLENTO, Marcelo Beltrão; PRITSCH, Izanara Cristine. *Fasciola hepatica* em bovinos no Brasil: uma doença negligenciada. AGROIN. 2018.

MOLL, L.; GAASENBEEK, C.P.; VELLEMA, P.; BORGSTEEDE, F.H. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. **Veterinary parasitology**, v. 91, n. 1-2, p. 153-158, 2000.

MUÑOZ-ZAMBRANO, M.E.; PLACENCIA MEDINA, M.; DEL POZO MUÑOZ, J.A.; SEVILLA ANDRADE, C.; HUIZA FRANCO, A. Diagnóstico serológico de la infección por *Fasciola hepatica*: una revisión sistemática. **Revista de Gastroenterología del Perú**, v. 40, n. 2, p. 155-161, 2020.

NOVA, L.E.V.; COSTA, M.E.; DE MELO, P.G.C.F.; CUNHA FILHO, L.F.C.; JUNIOR, F.A.B.; DA SILVA, L.C.; BOGADO, A.L.G. Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 1, p. 159-171, 2014.

NOVOBILSKÝ, A.; SOLIS, N.A.; SKARIN, M.; HÖGLUND, J. Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 141-147, 2016.

NUNES, P. M. P.; SMOLAREK, F.S.F.; KAMINSKI, G.A.T.; FIN, M.T.; ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. A importância do aproveitamento dos resíduos industriais da semente de Citrus. **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 1, 2009.

OJEDA-ROBERTOS, N.F.; FLORES-RAMÍREZ, S.V.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; PERALTA-TORRES, J.A.; CHAY-CANUL, A.J.; MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; REYES-NOVELO, E. Morphometry of *Fasciola hepatica* collected from livers of two hosts in central Tabasco, Mexico. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 24, n. 3, 2021.

OLAECHEA, F.V. *Fasciola hepatica*. **Red. de helmintología para América Latina y el Caribe**, v.1, n.1, p. 159-188, 2004.

OLALEKAN, B.J.; ROBERT, G.I.; THOZAMILE, M.W. The Anthelmintic and Antioxidant Activities of South African *Geranium Incanum*. **International Journal of Medicinal Plants and Natural Products**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2015.

OLIVEIRA, A.A.; NASCIMENTO, A.S.; SANTOS, T.A.M.; CARMO, G.M.I.; DIMECH, C.P.N.; ALVES, R.M.S.; MALASPINA, F.G.; GARCIA, M.H.O.; SANTOS, D.A.; AGUIAR, G.P.R.; ALBUQUERQUE, B.C.; CARMO, E.H. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 4, p. 251-259, 2007.

OLIVEIRA, S. M.; SPÓSITO FILHA, E. Divulgação técnica: *Fasciolose hepatica*. **Arq. Instituto Biológico de São Paulo**, v. 71, n. 1, p. 5-7, 2009.

OMS (Organização Mundial da Saúde): 1º relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas: Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas. ISBN 978-92-75-71672-4. 184 p., 2010.

OVEREND, D.J.; BOWEN, F.L. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. **Australian veterinary journal**, v. 72, n. 7, p. 275-276, 1995.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MELEGARI, M.; FIRENZUOLI, F. Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. Amara by LC. Department of Pharmaceutical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Via Campi 183, Modena, Italy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v, 29, n. 6, p. 1113-1119, 2002.

PILE, E.; SANTOS, J.A.A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M. *Fasciola hepatica* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 42-43, 2001.

PINHEIRO, P.F.; GONÇALVES, L.V.; CRICCO, K.B.; PINHEIRO, C.A.; TULER, A.; DA CUNHA, J.B.; IGNACCHITI, M.D.C. Chemical characterization and molluscicidal activity of essential oil from leaves of *Eugenia uniflora* L. on *Lymnaea columella* (Say, 1817) and *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 6, p. 1482-1491, 2017.

PRITSCH, I.C.; MOLENTO, M.B. Recount of reported cases of human fascioliasis in Brazil over the last 60 years. **Journal of Tropical Pathology**, v. 47, n. 2, p. 75–85, 2018.

PRITSCH, I. C.; GARCIA, R. L.; DOUAT, D.; SCHWENDLER, R.R.; BUTTENDORF, M.R.B.; MOLENTO, M.B. First reported case of clinical fascioliasis in Santa Catarina, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019

QI, H.; WANG, W.X.; DAI, J.L.; ZHU, L. 2015. *In vitro* *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 3-4, p.223-227, 2015.

QUEIROZ, V.S.; LUZ, E.; LEITE, L.C.; CÍRIO, S.M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, v. 31, n. 1-4, p. 99-111, 2002.

QUINESSENCE, Aromatheraphy Lifestyle. Disponível em: <<https://www.quinessence.com/blog/bitter-orange-essential-oil>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

RANG, R.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

RAPIC, D.; DZAKULA, N.; SAKAR, D.; RICHARDS, R. Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxynil and rafoxanide against immature and mature *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle. **Veterinary Record**, v. 122, n. 1, p. 59-62, 1988.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REFLORA in Flora do Brasil 2020a em construção. *Geraniaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7802>>. Acesso em: 09 Nov. 2021.

REFLORA in Flora do Brasil 2020b em construção. *Rutaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB361>>. Acesso em: 09 Nov. 2021.

REFLORA in Flora do Brasil 2020c em construção. Rutaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB597694>>. Acesso em: 09 Nov. 2021

ROBLES-PÉREZ, D.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J.M.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n.1, p. 217–221, 2014.

SADIKI, F.Z.; EL-IDRISSI, M.; SBITI, M. Antibacterial properties of the essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Hér. **RHAZES: Green and Applied Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 17-23, 2019.

SANABRIA, R.; CEBALLOS, L.; MORENO, L.; ROMERO, J.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L. Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. **Veterinary parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 105-110, 2013.

SANEI-DEHKORDI, A.; SEDAGHAT, M.M.; VATANDOOST, H.; ABAI, M.R. Chemical compositions of the peel essential oil of *Citrus aurantium* and its natural larvicidal activity against the malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in comparison with *Citrus paradisi*. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 577–585, 2016.

SARGISON, N. Fluke diseases of UK ruminant livestock Part 1: Life cycles, economic consequences and diagnosis. **UK Vet Livestock**, v. 13, n. 5, p. 59-67, 2008.

SAHANA, K.; NAGARAJAN, S.; RAO, L.J.M. Cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed volatile oil: Chemistry and role in health and disease prevention. In Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. **Academic Press**, v. 1, n. 1, p. 417-427, 2011.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose no Vale do Paraíba. **Revista Agrotécnica**, v. 14, p. 14 -19, 1990.

SHALABY, H.A.; EL NAMAKY, A.H.; ASHRY, H.M.; EL, F. *In Vitro* Efficacy Of Antimalarial Drug Primaquine Against Adult Cestode And Trematode Helminthes Of Sheep, 2020.

SOUSA, R.M.O.; ROSA, J.S.; CUNHA, A.C.; FERNANDES-FERREIRA, M.; Molluscicidal activity of four Apiaceae essential oils against the freshwater snail *Radix peregra*. **Journal of Pest Science**, v. 90, v. 3, p. 971-984, 2017.

SHIVAKUMAR, S.I.; SHAHAPURKAR, A.A.; KALMATH, K.V.; SHIVAKUMAR, B. Antiinflammatory activity of fruits of *Cuminum cyminum* Linn. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, n. 1, p. 22-24, 2010

SINGH, R.P.; GANGADHARAPPA, H.V.; MRUTHUNJAYA, K. *Cuminum cyminum* – A popular spice: An updated review. **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 3, 2017.

TAUR, D.J.; KULKARNI, V.B.; PATIL, R.Y.; PATIL, R.N. Anthelmintic activity of *Ocimum sanctum* and *Citrus aurantifolia* oils. **Pharmacologyonline**, v. 3, n. 1, p. 495-499, 2009.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1052p.

TENEVA, D.; DENKOVA, Z.; GORANOV, B.; DENKOVA, R.; KOSTOV, G.; ATANASOVA, T.; MERDZHANOV, P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from black pepper, cumin, coriander and cardamom against some pathogenic microorganisms. **Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology**, v. 20, n. 2, p. 39-52, 2016.

TESSELE, B.; BRUM, J. S.; BARROS, C. S. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 873-889, 2013

TOSTES, R.A.; SANTAREM, V.A.; ALBERTI, H.; SANCHES, O.C. Casos autóctones de *Fasciola hepatica* na região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 961-962, 2004.

TRIVILIN, L.O.; SOUZA, D.R.; NUNES, L.C.; MARTINS, I.V.F.M. Imunofenotipagem da resposta inflamatória em fígados de bovinos cronicamente e naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. 1, p. 41-47, 2013.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4 ed. São Paulo: JICA, 1998. 166p.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Veterinary Parasitology**. 2 ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1996, p. 224-234.

VIANA, M.D.M.; VIEIRA, A.C.S.; DA SILVA NETO, G.J.; PÓVOAS, F.T.X.; CAMPESATTO, E.A. Potencial ansiolítico do gênero *Citrus*: revisão integrativa da literatura. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 1, 2016.

WILLY M.L.; RENÉ C.Q. Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a albendazol y triclabendazol, La paz - Bolivia. **Rev. Invest. Vet. del Perú**, v. 20, n. 1, p. 254-262, 2009.

WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE JR, J.B.; PANKAVICH, J.A.; REINECKE, R.K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S.M; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary parasitology**. v. 58, n. 3, p. 181-213, 1995.

XIMENES, T.; RONDELAUD, D.; MAGE, C.; CHERMETTE, R. A eliminação da *Lymnaea truncatula* das pastagens: controle biológico e controle integrado contra a fasciolose. **A Hora Veterinária**, v. 1, p. 40- 46, 1995.

YAMAGUTI, Satyu. **Systema Helminthu: The Nematodes of Vertebrates**. 3.ed. New York: Interscience Publishers, 1961. 580p.