

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Controle integrado de nematódeos de ruminantes com a utilização de bactérias
e fitoterápicos**

Natália Berne Pinto

Pelotas, 2017

Natália Berne Pinto

**Controle integrado de nematódeos de ruminantes com a utilização de bactérias
e fitoterápicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P659c Pinto, Natália Berne

Controle integrado de nematódeos de ruminantes com a utilização de bactérias e fitoterápicos / Natália Berne Pinto ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador. — Pelotas, 2017.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Bacillus spp.. 2. Bovinos. 3. Ovinos. 4. Rosmarinus officinalis. 5. Trichostrongylidae. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Título.

CDD : 636.2

Natália Berne Pinto

Controle integrado de nematódeos de ruminantes com a utilização de bactérias e
fitoterápicos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)
Doutor em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin-Madison

Profa. Dra. Patricia da Silva Nascente
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Alessandro Pelegrine Minho
Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo - Piracicaba

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Dedico esta dissertação a pessoa que esteve ao meu lado em todos os
momentos de minha vida, minha mãe Beth.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por todas as bênçãos que me são concedidas a cada passo de minha caminhada.

À minha mãe, Beth, por toda a incansável dedicação e amor, tanto na minha jornada científica, como em todos os momentos de minha vida.

À todos os meu familiares e ao meu namorado pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu orientador Professor Fábio Pereira Leivas Leite por acreditar na minha capacidade e estar sempre disponível possibilitando o meu crescimento e aprendizado neste período.

À todos os meu colegas de laboratório (Leonardo, Gabriela, Micaele, Wesley, Ana Paula, Tairan e Adriane) pela parceria e companheirismo construído no nosso dia-dia.

À todos os amigos que me incentivaram e estiveram ao meu lado.

Muito Obrigado!

Resumo

PINTO, Natália Berne. **Controle integrado de nematódeos de ruminantes com a utilização de bactérias e fitoterápicos**. 2017. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Este estudo objetivou avaliar alternativas de controle integrado dos nematódeos gastrintestinais (NGI) de ruminantes. Na primeira etapa foram realizadas coprocultura quantitativa e qualitativa para os testes *in vitro* de *Bacillus circulans* (Bcir), *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) frente aos NGI. Todas as espécies de *Bacillus* demonstraram efeito larvicida ($\geq 60\%$). Bcir e Bti foram incubados com anti-helmínticos (moxidectin, nitroxynil e levamisole) e mantiveram a sua viabilidade. O melhor resultado nos dois testes anteriores foi obtido com Bti, o qual foi avaliado *in vivo* em bovinos jovens naturalmente infectados com NGI. Grupo I tratado com Levamisol (anti-helmíntico), grupo II com Bti, grupo III com Bti associado ao Levamisol e o grupo IV Controle (não tratado). A eficácia foi estabelecida comparando o número de larvas recuperadas antes (hora zero) e após (24, 48 e 72 horas) os tratamentos. O potencial nematicida de Bti *in vivo* de 84% foi observado às 24h. Idealizando a associação de mais de uma alternativa de controle parasitário foi realizado testes *in vitro* de inibição da eclodibilidade e de migração larval de NGI de ovinos frente ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, o qual foi submetido e testado em seis concentrações (227,5mg/mL; 113,7mg/mL; 56,8mg/mL; 28,4mg/mL; 14,2mg/mL; 7,1mg/mL). Na análise cromatográfica deste óleo foram identificados 18 constituintes, sendo os majoritários o Eucalyptol (1.8-cineole) com 42,11%, o (+)-2-Bornanone com 16,37% e o α -Pinene com 14,76%. Nos testes *in vitro* o óleo de *R. officinalis* inibiu 100% da eclodibilidade nas quatro maiores concentrações e alcançou 70% e 74% de inibição da migração das larvas nas duas maiores concentrações, respectivamente. A concentração inibitória de 50% (CI50) do óleo sobre os ovos foi de 0,5181 mg/mL, enquanto a CI50 das larvas foi de 62,17 mg/mL. Com este estudo foi determinado a ação nematicida de quatro espécies de *Bacillus in vitro* e o mesmo efeito *in vivo* do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, bem como a ação ovicida e larvicida do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, o que permite concluir que estas duas alternativas avaliadas tem potencial para a utilização no controle de NGI de ruminantes.

Palavras-chave: *Bacillus* spp.; bovinos; ovinos; *Rosmarinus officinalis*; Tricostromylideos

Abstract

Pinto, Natália Berne. **Integrated control of ruminant nematodes with the use of bacteria and phytotherapics**. 2017. 66f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

This study aimed to evaluate alternatives of integrated control to the gastrointestinal nematodes (GIN) of ruminants. In the first stage, *in vitro* tests were performed, in order to confront *Bacillus circulans* (Bcir), *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) against nematodes. All species of *Bacillus* showed larvicidal effect ($\leq 60\%$). Bcir and Bti were incubated with anthelmintics (moxidectin, nitroxylin and levamisole) and maintained their viability. The best result in the two previous tests was obtained with Bti, which was evaluated *in vivo* in young cattle naturally infected with GIN. Group I treated with Levamisole (anthelmintic), group II with Bti, group III with Bti associated with Levamisole and group IV Control (untreated). Efficacy was established by comparing the number of larvae recovered before treatment (hour zero) and after (24, 48 and 72 hours). The nematicidal potential of Bti *in vivo* of 84% was observed at 24h. Idealizing the association of more than one parasitic control alternative, *in vitro* tests of inhibition of hatchability and larval migration of GIN of ovine species against *Rosmarinus officinalis* essential oil were carried out and tested in six concentrations (227,5mg/mL; 113,7mg/mL; 56,8mg/mL; 28,4mg/mL; 14,2mg/mL; 7,1mg/mL). In the chromatographic analysis of this oil, 18 constituents were identified, the majority being Eucalyptol (1,8-cineole) with 42.11%, (+) - 2-Bornanone with 16.37% and alpha.-Pinene with 14.76%. *In vitro* tests, *R. officinalis* oil inhibited 100% hatchability at the four highest concentrations and reached 70% and 74% inhibition of larval migration at the two highest concentrations, respectively. The inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) of the oil on the eggs was 0.5181 mg / mL, while the IC₅₀ of larval inhibition was 62.17 mg / mL. This study determined the nematicidal action of four species of *Bacillus in vitro* and the same *in vivo* effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, as well as the ovicidal and larvicidal action of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*, which allows to conclude that these two alternatives have potential for the use in the control of GIN of ruminants.

Keywords: *Bacillus* spp.; cattle; sheep; *Rosmarinus officinalis*; Tricostroglydeos

Lista de Figuras

Figura 1	Larvicidal efficacy <i>in vitro</i> . The data represents the mean percentage efficacy (+/- SD) <i>in vitro</i> from <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>osvaldocruzi</i> (Bto), <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> (Btk), <i>Bacillus circulans</i> (Bcir) e <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelenses</i> (Bti) on larvae (L1 / L2) of gastrointestinal nematodes of cattle.....	38
Figura 2	Larvicidal efficacy <i>in vivo</i> . The date represents the mean percentage (+/- SD) of the anthelmintic efficacy of <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti) and their association in gastrointestinal nematodes of cattle <i>in vivo</i> test.....	39
Figura 3	Graphical Abstract.....	39
Figura 4	Eficácia do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> em inibir a eclodibilidade (IE) e a migração das larvas (IM) de nematódeos gastrintestinais de ovinos.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Bacillus</i> species viability before and after combination with different anthelmintic for 24, 72 and 144 hours of incubation.....	38
Tabela 2	Compostos do óleo essencial <i>Rosmarinus officinalis</i> identificados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	52

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Objetivos.....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 Revisão da Literatura.....	13
3.1 Nematódeos gastrintestinais de ruminantes.....	13
3.2 Resistência anti-helmíntica.....	14
3.3 Resíduos dos tratamentos.....	15
3.4 Alternativas ao controle parasitário.....	16
3.5 <i>Bacillus</i> spp.....	20
3.6 <i>Rosmarinus officinalis</i>.....	21
4 Artigos.....	23
4.1 Artigo 1.....	23
4.2 Artigo 2.....	40
5 Considerações Finais.....	54
Referências.....	55
Anexos.....	65

1 Introdução

A alimentação é uma necessidade básica para todo ser humano e que depende diretamente do setor agropecuário. A pecuária de ruminantes é responsável por 40% do Produto Interno Bruto (PIB) do mundo e o Brasil, com o seu vasto território, possui vocação agrícola e tem grande parte do seu PIB baseado nesta produção (MORGAN et al., 2013). Em período de crise econômica o único setor neste país que manteve taxas positivas de crescimento durante todo o ano de 2014 foi o setor agropecuário, figurando como retentor do título de segundo maior rebanho comercial do mundo e grande exportador de proteína de origem animal de bovino, suíno e de aves com a expectativa de que esta produção suprirá 44,5% do mercado mundial até 2020 (BRASIL, 2015).

Ao contrário deste cenário, a produção de carne ovina é insuficiente para abastecer até mesmo mercado interno brasileiro, sendo necessária a importação de aproximadamente nove mil toneladas apenas do Uruguai (BRASIL, 2016). O Rio Grande do Sul é o estado que possui o maior rebanho de ovinos do Brasil e historicamente tem grande aptidão para a ovinocultura (BRASIL, 2014).

Apesar de haver um grande espaço para a expansão da produção de rebanhos comerciais de ovinos e bovinos no país, a rentabilidade desta produção, em inúmeros casos, fica aquém do esperado devido a prejuízos causados por parasitos (STIVARI et al., 2013). Na ovinocultura os NGI frequentemente inviabilizam a sua produção, pois além de gerar gastos com o seu tratamento, diminuem a produtividade do rebanho e podendo levar os seus hospedeiros a morte (AMARANTE & SALES, 2007). O cenário da bovinocultura se assemelha ao que presenciamos na produção de ovinos, sendo as parasitoses uma das maiores causas de entraves na sua produção (STROMBERG et al., 2015).

No intuito de controlar os nematódeos gastrintestinais (NGI) destes ruminantes diversas moléculas químicas foram desenvolvidas, porém a utilização errônea destes fármacos e um manejo sanitário inadequado levaram a uma seleção de parasitos multirresistentes (SOUTELLO et al., 2007; ZAROS et al., 2014).

Assim as linhas de pesquisa visando novas alternativas ao controle de NGI de ruminantes são de notável importância, visando à diminuição de resíduos em produtos de origem animal e principalmente para aumentar a produtividade de rebanhos de ruminantes e atenuar a sua taxa de mortalidade. Dentre estes estudos destaca-se a seleção de raças resistentes, produção de vacinas, fitoterapia e controle biológico (FAWZI et al., 2014; MOLENTO et al., 2013; LARA et al., 2016).

Além de buscar novas formas de controle, é importante que se use esses métodos de forma associada visando diminuir os níveis de contaminação do ambiente e de infecção dos animais. Com isso a utilização de fitoterápicos, bactérias e anti-helmínticos concomitantemente se torna uma estratégia extremamente relevante para o controle de NGI de ruminantes.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar alternativas ao controle dos nematódeos gastrintestinais de ruminantes através de fitoterapia e controle biológico com espécies de *Bacillus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ação nematicida *in vitro* de *Bacillus circulans* (Bcir), *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) e do *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) sobre *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. e *Trichostrongylus* spp. de bovinos;
- Verificar a viabilidade de Bcir, Bto, Bti e Btk, após a incubação com os antihelmínticos;
- Testar a ação nematicida do Bti *in vivo* administrado em bovinos;
- Avaliar a ação nematicida *in vivo* de Bti associado a levamisole em bovinos;
- Avaliar a ação ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos;
- Identificar os constituintes do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*.

3 Revisão da Literatura

3.1 Nematódeos gastrintestinais de ruminantes

Os NGI são os parasitos de maior importância para os ruminantes, (COSTA, 2007) as suas infecções ocorrem de forma mista, ou seja, mais de um gênero de parasito em um mesmo hospedeiro, concomitantemente. Os seus representantes de maior importância são da família Trichostrongylidae que possuem ciclo de vida monoxênico e permanecem uma fase no ambiente e outra em seu hospedeiro definitivo (SANTOS et al., 2015). Rebanhos de bovinos e ovinos com altas taxas de infecção por parasitos apresentam uma diminuição drástica de sua produtividade, isto ocorre por menor taxa de prenhes, retardo no crescimento e queda na produção de carne e leite (STROMBERG et al., 2012).

Em ovinos, os gêneros que estão comumente envolvidos nestas infecções são *Trichostrongylus* spp. e *Haemonchus* spp. (OLIVEIRA-SEQUEIRA e AMARANTE, 2002). Quando se considera todas as afecções que podem acometer estes pequenos ruminantes a haemoncose aparece como principal causa de morte destes animais (SPRENGER et al., 2016).

Em bovinos, estudo desenvolvido por Assis-Brasil et al. (2013) demonstrou que após o desmame, os NGI constituem a principal enfermidade do trato digestório destes animais. No Brasil os Trichostrongilídeos mais frequentes são *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp. (SANTOS et al., 2010). O grau de infecção por esses nematódeos pode se alternar de acordo com a região do país, e do histórico do rebanho, como demonstra relatos de Minas Gerais, onde a maior prevalência foi determinada por *Haemonchus* spp. (SANTOS et al., 2010), enquanto que em São Paulo há registro de rebanhos com maiores taxas de *Cooperia* spp. (BRESCIANI et al., 2001).

O nematódeo gastrintestinal de maior relevância em rebanhos de ruminantes no mundo é *Haemonchus* spp., que tem como órgão de eleição o abomaso, onde faz hematofagia levando seus hospedeiros a quadros de anemia severa (AMARANTE, 2015). O nematódeo *H. contortus* é a espécie mais frequente em ovinos (MACIEL et

al., 2014), já em bovinos a frequência maior de *H. similis* e *H. placei* (SILVA et al., 2015).

O gênero *Cooperia* tem como órgão de eleição o intestino delgado de ruminantes, onde se nutre dos tecidos da parede de seu hospedeiro. Está presente em todos os continentes e na maioria dos rebanhos, sendo a sua prevalência maior na bovinocultura (SANTOS et al., 2015). As espécies desse gênero que mais ocorre em bovinos e ovinos são *C. curticei*, *C. punctata*, *C. pectinata* e *C. spatulata* (SANTOS et al., 2010; BUZZULINI et al., 2007).

Ao contrário de outros gêneros da família Trichostrongylidae, *Trichostrongylus* spp. possui diferentes órgãos de eleição entre suas espécies. *T. colubriformis* e *T. vitrinus* localizam-se na porção anterior do intestino delgado e duodeno, já a espécie *T. axei* se fixa no abomaso. Sendo maior a prevalência em ovinos das espécies *T. colubriformis* e *T. axei* (AMARANTE, 2015) e em bovinos *T. axei* é mais comumente encontrado (STROMBERG et al., 2015).

Ostertagia spp. é um parasito que possui elevada patogenicidade por sua característica de permanecer em hipobiose causando severas lesões na mucosa do abomaso de seus hospedeiros (CHAPARRO et al., 2013). As principais espécies deste parasito em ovinos são *Teladorsagia circumcincta*, *T. ostertagi* e *T. trifurcata*, em bovinos a maior prevalência é de *O. ostertagi* (AMARANTE, 2015; CHAPARRO et al., 2013).

3.2 Resistência anti-helmíntica

A preocupação com a resistência de parasitos aos anti-helmínticos é justificada, visto a existência de populações multirresistentes, ou seja, que não sofrem efeito deletério de nenhum fármaco disponível no mercado (SCZESNY-MORAES et al., 2010). Isto se agrava com o fato de que nos últimos 30 anos apenas uma molécula nova foi disponibilizada no mercado brasileiro, este produto é derivado do amino-acetonitrilo e possui indicação para o tratamento apenas em ovinos (KAMINSKY et al., 2008a). Esta dificuldade em desenvolver novas moléculas químicas para o controle de NGI está intimamente ligada ao fato de serem muito dispendiosos os estudos nesta área e pelo rápido aparecimento de sua ineficiência (PRICHARD, 1994).

O registro de resistência está descrito em rebanhos ovinos desde os anos 50 (LELAND et al., 1957), sendo o Rio Grande do Sul o primeiro local no Brasil a registrar o seu aparecimento em 1967/68 (SANTOS & GONÇALVES, 1967/68). Atualmente este problema já está relatado em todos os continentes. No continente Americano já foi descrito a multirresistência em países pertencentes às três américas, como Brasil, Estados Unidos da América e México (TORRES-ACOSTA et al., 2012). Também foi nesta região, mais precisamente no Uruguai, que foi descrito o primeiro relato de resistência a última molécula lançada para o tratamento de ovinos (MEDEROS et al., 2014). A tendência da insuficiente eficácia destes químicos é aumentar, como pode ser observado pelo histórico de evolução deste entrave. Sendo notável a necessidade de medidas em conjunto para a sua solução, passando pela informação ao produtor até a acessibilidade de seu correto diagnóstico (TORRES-ACOSTA et al., 2012).

Em bovinos a preocupação com a pouca eficácia dos anti-helmínticos é mais recente e são poucos os relatos de resistência parasitária, porém já existem estudos que comprovam multirresistência também nestes rebanhos (MEJÍA et al., 2003; GASBARRE et al., 2009). Os registros demonstram a resistência de todas as espécies de NGI de bovinos a um ou mais princípio-ativo na América, representada por Brasil, Estados Unidos e Argentina; na Ásia, pela Índia; na Oceania, pela Austrália e Nova Zelândia; e na Europa pela Alemanha e Reino Unido. Isto reforça a ideia de problema de importância mundial (SUTHERLAND & LEATHWICK, 2011).

3.3 Resíduos dos tratamentos

As populações de NGI pouco sensíveis a todos os anti-helmínticos comerciais disponíveis, levam a altas frequências de tratamentos e a utilização de sobre doses destes fármacos. Isto se reflete, não só em maiores gastos com os rebanhos, mas também em elevados índices de resíduos no ambiente e nos produtos de origem animal. Em estudo realizado em amostras de leite cru na grande bacia leiteira no estado de Minas Gerais foi observado expressiva porcentagem de contaminação por anti-helmínticos, dentre os quais os amino-benzimidazóis (55,42%), levamisol (53,57%), avermectinas (60,24%), tiabendazóis (67,47%), moxidectina (73,49%) e triclabendazóis (45,78%) (CERQUEIRA et al., 2014). Nos leites processados, UHT, leite em pó e o leite pasteurizado, as avermectinas foram os principais resíduos

encontrados por órgãos de fiscalização, alcançando 87% de presença nas amostras (PACHECO-SILVA et al., 2014).

Recentemente o Brasil foi alvo de restrições para a exportação de carne bovina, gerando grande impacto econômico no setor. Amostras de animais abatidos em frigoríficos habilitados para exportação apresentaram concentrações de avermectinas no intervalo de 20µg/kg a 1.359µg/kg, ou seja, acima do limite máximo permitido (COOPER et al., 2012). Já quanto aos resíduos no ambiente, é possível que ocorra a liberação de moléculas nas fezes em quantidade expressiva ($213 \pm 10 \mu\text{g kg}^{-1}$) por até 70 dias após o tratamento (ERZEN et al., 2005).

3.4 Alternativas ao controle parasitário

A necessidade de buscar outros métodos para o controle dos NGI de ruminantes ocorre, não só pelo fato de se estar em eminente perigo de não possuir mais químicos capazes de controlar estes parasitos, mas também pela tendência mundial dos consumidores de produtos de origem animal optarem por produtos orgânicos, ou seja, produtos oriundos de rebanhos nos quais é proibida a utilização de anti-helmínticos (SILVA et al., 2012).

A forma como está sendo enfrentado este grave problema, se distingue em alguns aspectos nos diferentes continentes do mundo e isto ocorre de acordo com a cultura, o conhecimento dos produtores e as condições climáticas locais. A Oceania tem grande experiência na produção de rebanhos de ruminantes e possui alto nível de tecnificação, a aceitação por parte dos produtores a novas estratégias de manejo é grande e o controle dos NGI está baseado na manutenção da população de refugia, ou seja, parasitos sensíveis aos anti-helmínticos, escolha de moléculas e de suas combinações de acordo com o seu potencial de ação em determinada propriedade e prevenção da entrada de nematódeos resistentes no rebanho (LEATHWICK & BESIER, 2014).

Na Europa o clima continental predominante na região, diverge muito do encontrado em regiões tropicais e subtropicais. Por esta razão o entrave imposto por parasitos deveria ser atenuado pela característica de invernos longos e rigorosos contrastando com verões secos e quentes, o que não favorece o desenvolvimento dos nematódeos. Porém o aquecimento global tem mudado este cenário, levando ao aparecimento destes helmintos em regiões de elevadas altitudes e em locais mais

próximos ao Círculo Ártico. Este novo cenário encontra produtores não adaptados a estes problemas ocasionando importantes perdas econômicas nos rebanhos. Estudos visando amenizar eminentemente estes prejuízos estão baseados em diagnósticos das parasitoses a nível individual e de rebanho. Realizando além da identificação dos gêneros envolvidos e das populações resistentes, também uma previsão do impacto das mudanças globais na epidemiologia das infecções parasitárias, bem como na distribuição e disseminação da resistência anti-helmíntica. Visando assim, o desenvolvimento de estratégias para o manejo sustentável de infecções por helmintos considerando as perspectivas de futuras mudança nas tendências sazonais (MORGAN et al., 2013).

Na América se observa diferentes situações entre a América do Sul e a América do Norte. Na América do Sul a convivência com os problemas decorridos das parasitoses é observado desde o início da intensificação das criações comerciais de ruminantes, porém a introdução de novas tecnologias para o controle de NGI é recente e a resistência do produtor as mudanças ainda está presente. O tratamento dos animais ainda está baseado na utilização de anti-helmínticos e a ausência de um manejo sanitário e nutricional eficiente leva a uma baixa produtividade dos rebanhos e é um fator desestimulante parte este ramo do setor agropecuário (AMARANTE, 2014).

Na América do Norte a produção de ovinos e bovinos visa mercados com valor agregado e para isso tem como objetivo rebanhos que possuam algum diferencial com destaque para os orgânicos (WHITLEY et al., 2014). Para a criação de rebanhos de “ruminantes orgânicos” visando a produção de leite apenas três moléculas de anti-helmínticos são autorizadas ao uso, a ivermectina, o fenbendazole e a moxidectina, e apenas são utilizados como parte de um manejo preventivo fora do período de lactação. Para animais destinados ao abate não é permitido a utilização de nenhuma molécula química comercial. A diminuição da infecção e dos efeitos deletérios dos NGI ocorre principalmente devido ao investimento em quantidade e qualidade de alimentos (SORGE et al., 2015).

Em uma união de esforços e visando a utilização integrada de estratégias de controle, são diversas as linhas de pesquisas em todo o mundo buscando a resolução deste problema, dentre estes os sistemas eficientes de manejo dos rebanhos já demonstraram a sua relevância. Este método inclui a adequação de lotação dos locais onde serão alocados estes rebanhos, a associação de diferentes categorias e raças

de animais, a alternância entre períodos em que o rebanho permanece na pastagem com períodos em que a pastagem fica vazia e uma correta nutrição. Todos estes métodos visam diminuir a contaminação ambiental com parasitos e assim atingir grande parte de sua população que se encontra na fase de vida livre (CEZAR et al., 2008).

A superlotação dos locais destinados a pecuária é um fator que auxilia de forma importante no aumento das populações de parasitos, pois quanto maior for a ocupação de hospedeiros infectados maior será a contaminação do ambiente. Este problema tem se agravado com a disputa entre a pecuária e a agricultura, onde diversas vezes os rebanhos perdem espaço para as lavouras (WALLER, 2002).

A associação entre espécies é um método que tem demonstrado relevante impacto ao diminuir a infecção dos hospedeiros. Bovinos adultos são mais resistentes a infecção por NGI e quando alocados junto a ovinos beneficiam esta espécie. Grande parte das larvas ingeridas pelos bovinos não vão conseguir estabelecer a infecção e assim não iram liberar ovos ao ambiente, diminuindo a contaminação das pastagens. Outro fator que pode auxiliar na diminuição da contaminação da pastagem é a introdução de bovinos adultos em locais destinados a ovinocultura, reduzindo o número de ovinos, que são mais susceptíveis, por hectare sem diminuir a produtividade deste local (WALLER & THAMSBORG, 2004). Além de agregar espécies, a associação entre categorias é benéfica aos animais mais jovens com baixa imunidade, não causando efeitos deletérios aos animais adultos e mais resistentes (MOLENTO et al., 2013).

O manejo de pastagens tem como princípio a divisão da área de pastejo, com áreas onde os animais permaneçam em pastejo por curtos períodos e áreas que permanecem em “descanso”, visa principalmente a recuperação das forrageiras. Porém, se este período de permanência dos animais, for inferior ao tempo de desenvolvimento dos ovos até a fase de larva infectante e o intervalo de descanso da área for suficiente para a degradação das larvas, esta rotação pode ser benéfica para os ruminantes, diminuindo a contaminação ambiental (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011). Esse período de descanso pode ser realizado associando lavoura e pecuária, assim durante o período de plantação até a colheita a área fica livre de contaminação por NGI.

A nutrição adequada aos animais suscetíveis a infecção tem elevada notoriedade para o desenvolvimento do sistema imune em animais jovens e para a melhor resposta

deste, em animais adultos. A melhor resposta do hospedeiro com acesso a uma alimentação com elevados níveis de proteína bruta, sobrevém com uma maior resiliência e maior resistência destes animais (AMARANTE, 2014).

A seleção de indivíduos mais resistentes a infecções por parasitos ocorre naturalmente desde que essas populações começaram a coexistir, onde apenas os mais adaptados sobreviveram. Os estudos de resistência em ruminantes tem concentrando-se em ovinos, com identificação de raças mais resistentes, como: Scottish Blackface (ABBOTT et al., 1985); Saint Croix (GAMBLE & ZAJAC, 1992); Gulf Coast Native (BAHIRATHAN et al., 1996); Santa Inês (AMARANTE et al., 2004); Crioula Lanada (BRICARELLO et al., 2004) e Menz (GETACHEW et al., 2015). Já em bovinos foi detectada maior adaptabilidade da raça Aberdeen Angus (SUAREZ, et al., 1995) aos nematódeos. Nesta mesma linha de pesquisa, estudos vem sendo conduzidos para identificar animais mais adaptados dentro de uma determinada população, permitindo assim a escolha de indivíduos mais resistentes dentro de qualquer raça (IDRIS et al., 2012; MACKINNON et al., 1991). Com maior precisão é possível fazer esta escolha baseada em marcadores genéticos que conferem a característica de resistência ou suscetibilidade aos animais (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011; MCRAE et al., 2014).

Uma outra linha de pesquisa promissora são as vacinas, através da utilização de antígenos “ocultos” e “naturais”, demonstrando uma proteção significativa em estudos que utilizaram como antígeno vacinal em desafio experimental de *Haemonchus contortus*. Os antígenos ocultos são oriundos da membrana que reveste o trato digestório do parasito levando a formação de anticorpos contra os mesmos. Ao se alimentar, os anticorpos ingeridos pelo parasito adulto se ligam à superfície da sua membrana intestinal resultando em lesões, um exemplo é a H11 (MUNN et al., 1993a), uma glicoproteína presente na membrana intestinal de *H. contortus*. Os antígenos naturais, como exemplo, a proteína somática de *H. contortus* adulto Hc23 (FAWZI et al., 2014), são antígenos dos parasitos que induzem a uma resposta imune a nível de mucosa dos hospedeiros, local de entrada ou de estabelecimento da maioria dos patógenos.

O controle biológico tem demonstrado ser uma importante opção para reduzir a contaminação ambiental por NGI. Fungos e bactérias com potencial nematicida têm sido explorados e o resultado tem sido de êxito. Os fungos nematófagos utilizam diversos meios para diminuir a população de nematódeos. Dentre estes, o principal

utilizado pelos fungos mais eficientes, é a característica de aprisionar e penetrar em larvas e ovos de nematódeos com as suas hifas, por isso são chamados de fungos predadores. Alguns fungos ainda colonizam a vulva de parasitos adultos e produzem toxinas que causam efeitos deletérios a estes (DEGENKOLB & VILCINSKAS, 2016). As bactérias também utilizam mais de um método para causar lesões a estes parasitos. Estas produzem proteínas e toxinas capazes de ocasionar danos por ação de proteases e quitinases a cutícula do nematódeos e, quando ingeridas, gerando poros na mucosa do trato digestório dos mesmos (ZENG et al., 2015; ZHENG et al., 2016).

Na busca por alternativas ao controle de parasitos, uma opção baseada na utilização de plantas vem sendo alvo de diversos estudos, não somente no Brasil como no mundo. A utilização de fitoterápicos na medicina humana já é uma realidade, na área animal muitos estudos vem sendo conduzidos com diferentes plantas na tentativa de identificar constituintes promissores (SAKONG et al., 2016), principalmente no Brasil que possui o maior acervo de diversidade vegetal do mundo (SANTOS et al., 2013). Os objetos de pesquisa muitas vezes são determinados através de conhecimento popular prévio das plantas, que podem ter ação, tanto diretamente sobre os parasitos, como estimulando as defesas dos seus hospedeiros (ALONSO-DIAZ et al., 2010). São diversos os estudos que já evidenciaram o potencial nematocida de plantas e de seus componentes (NERY et al., 2010; YOSHIHARA et al., 2014). Dentre estas plantas, as aromáticas tem sido alvo de pesquisa do núcleo de pesquisa sobre fitoterápicos da Universidade Federal de Pelotas, o qual envolve várias áreas, entre as quais, química, microbiologia e parasitologia (DIAS DE CASTRO et al., 2013).

3.5 *Bacillus* spp.

Pesquisas com controle biológico tem mostrado o grande potencial de bactérias nematopatogênicas no controle de NGI de ruminantes. Essas bactérias apresentam diversos mecanismos de ação, através da produção de proteínas, enzimas e toxinas, durante o período de esporulação no bolo fecal, onde se encontram as larvas de primeiro e segundo estágio dos principais NGI. Estas larvas ao entrarem em contato, e por vezes se alimentarem de bactérias, sofrem lesões na membrana do seu trato digestório, inviabilizando seu desenvolvimento (URBAN JR et al., 2013; LARA et al.,

2016; PENG et al., 2016). Além disso, estudos observaram que estes microrganismos também possuem a capacidade de induzir a proteção de mucosas, através do maior aporte de eosinófilos locais e proteção sistêmica com a produção de interleucinas (RICHARD et al., 2000; KHAN et al., 2003).

O gênero *Bacillus* compreende microrganismos presentes em grande quantidade no solo, em forma de bastonete simples, aeróbio ou anaeróbio facultativo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Existem diversas espécies deste gênero, sendo algumas já avaliadas no controle de insetos e parasitos de animais, dentre essas se destaca o *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus circulans* (OLIVEIRA et al., 2006; SINOTT et al., 2012).

A espécie *B. circulans* foi assim nomeada em 1890 por possuir movimentos circulares no interior de sua colônia (NAKAMURA & SWEZEY, 1983). O potencial nematicida desta bactéria é atribuído a toxicidade de seus esporos, sendo necessária a ingestão destes para o controle de parasitos (SINOTT et al., 2014).

Descrito pela primeira vez na Alemanha, o *B. thuringiensis* foi isolado em 1915 da traça da farinha, é um microrganismo formador de esporo e se caracteriza pela presença intracelular de um cristal proteico (ANGELO et al., 2010). Esta espécie possui algumas subespécies, como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto) e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk).

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Bti) é mesofílica, flagelada, entomopatogênica e formadora de esporos e de endotoxinas delta (SINOTT et al., 2012). Foi isolada pela primeira vez de mosquitos mortos em Israel, durante a pesquisa de microrganismos capazes de diminuir a população destes insetos (GOLDBERG & MARGALIT, 1977; MARGALIT & DEAN, 1985). Alguns estudos já demonstraram o potencial deletério das endotoxinas e o seu mecanismo de ação (SOBERÓN et al., 2016), inclusive evidenciando o efeito tóxico destas em *Haemonchus contortus* (LARA et al., 2016).

3.6 *Rosmarinus officinalis*

O *Rosmarinus officinalis* é uma planta originária do Mediterrâneo, pertencente à família Lamiaceae e conhecida popularmente no Brasil por Alecrim. Esta erva cresce em formato de arbusto, possui folhas em formato de agulha, perfume característico, floração nas cores rosa, branca, roxa e azul, e atualmente é cultivada em diferentes

continentes no mundo. Seus constituintes químicos incluem resina, ácido tânico, óleos voláteis e flavonóides (BEGUM et al., 2013).

É uma planta lenhosa perene, ou seja, com ciclo de vida longo, com duração de aproximadamente dois anos, onde, durante este período as suas folhas não caem e possui na sua estrutura partes lenhosas. Muito utilizada na culinária como tempero, na ornamentação de casas e, desde a antiguidade, é cultivada no intuito de curar diversas enfermidades, como doenças do sistema nervoso central, sistema cardiovascular, fígado, sistema reprodutor, sistema respiratório, artrite, gota, dor muscular, feridas e para evitar a calvície prematura (BEGUM et al., 2013).

Existem diversas linhas de pesquisa com o objetivo de comprovar o potencial desta planta, tanto em estimular o organismo para responder melhor a determinadas afecções, como de atuar diretamente contra agentes infecciosos. Assim, já foi determinada a ação anti-inflamatória (NOQUEIRA DE MELO et al., 2011), a ação antimicrobiana (DERWICH et al., 2011) e a ação antifúngica (WALLER et al., 2017) deste fitoterápico. Além destes, a ação ovicida e larvicida em nematóides fitopatogênicos já foi observada por estudos desenvolvidos por Oka et al. (2000).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Controlling Gastrointestinal Nematodes in Cattle by *Bacillus* species

Natália Berne Pinto; Leonardo Mortagua de Castro; Gabriela de Almeida Capella;
Tairan Ourique Motta; Ana Paula de Souza Stori de Lara; Micaele Quintana de
Moura; Maria Elisabeth Aires Berne; Fábio Pereira Leivas Leite

Submetido à revista Parasitology International

Controlling Gastrointestinal Nematodes in Cattle by *Bacillus* species

Natália Berne Pinto¹; Leonardo Mortagua de Castro²; Gabriela de Almeida Capella³; Tairan Ourique Motta⁴,
Ana Paula de Souza Stori de Lara⁵; Micaele Quintana de Moura⁶; Maria Elisabeth Aires Berne⁷; Fábio Pereira
Leivas Leite⁸

1. Médica Veterinária, aluna de Pós-Graduação em Veterinária - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. nbernevet@gmail.com
2. Médico Veterinário, aluno de Pós-Graduação em Veterinária - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. leonardomortagua@gmail.com
3. Médica Veterinária, aluna de Pós-Graduação em Veterinária - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. gabicapella@gmail.com
4. Aluno de Graduação em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. tairanourique@gmail.com
5. Bióloga, aluna de Pós-Graduação em Parasitologia - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. ana.paula.central@hotmail.com
6. Bióloga, aluna de Pós-Graduação em Parasitologia - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. micaele_m@yahoo.com.br
7. Prof^a. Dr^a. Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. bernemea@gmail.com
8. Prof. Dr. CDTec, Núcleo de Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas, Brasil. fabio@leivasleite.com.br

Corresponding author: Fábio Pereira Leivas Leite

E-mail address: fabio_leite@ufpel.edu.br

Postal address: Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, S/N, Caixa Postal 354, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

Abstract

In this study, we tested the *in vitro* and *in vivo* larvicidal activity of *Bacillus* species against gastrointestinal nematodes in cattle, and their viability in the presence of anthelmintics. For *in vitro* tests, cattle feces naturally infected with trichostrongylides were incubated with spore suspensions of *Bacillus circulans* (Bcir), *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) or *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). Subsequently, residual larvae were counted and identified. All of the *Bacillus* species showed 60% or more larvicidal effects. Bcir and Bti were selected to be incubated with anthelmintics (moxidectin, nitroxylin and levamisole), and after 24, 72, and 144 h, their viability was evaluated. Bti showed highest drug resistance, maintaining a concentration of 1.10^7 CFU/mL. Based on this result, Bti was selected for *in vivo* tests on calves naturally infected with gastrointestinal nematodes. The calves were divided into four groups: Group 1, Bti suspension of $\sim 1 \times 10^9$ CFU orally administered; Group 2, Bti suspension of $\sim 1 \times 10^9$ CFU orally administered with levamisole (subcutaneously, 150 mg); Group 3, only levamisole (subcutaneously, 150 mg), and Group 4 untreated. Then 24 and 48 h after treatment, larvae numbers were counted. We observed a reduction of 84%, 100%, and 100% after 48 h of treatment, respectively, for Groups 1, 2 and 3 treatments in comparison with the untreated. The tested *Bacillus* species showed larvicidal activity against bovine trichostrongylides, and its association with anthelmintics. It may serve as a promising integrated alternative for control of gastrointestinal nematodes in cattle.

Keywords: *Bacillus* spp.; biological control; Trichostrongylides; Anthelmintics.

1. Introduction

GIN infection in cattle results in a significant economic loss to the cattle production worldwide. This damage mainly causes reductions in milk production, slaughter weight, and animal deaths [1,2]. After a long indiscriminate use, the currently available anthelmintics are able to produce only a limited anti-parasitic effect. Besides, the residual anthelmintics in the meat are undesirable for consumption and their secretion pollute the environment [3].

Though anthelmintics remain the principal method of controlling GIN in ruminants, their effectiveness in many herds is questionable [4,5,6]. The integrated gastrointestinal nematode control, with the use of pasture management, rotational grazing, genetic selection, nematicidal fungi, and herbal medicines, has already consolidated for small ruminants [7,8].

In agriculture, there are many studies looking at bacteria as an alternative to control nematodes [9,10,11], but there are very few extending the same approach to control nematodes in domestic animals [12,13]. The maximum proportion of parasites is present in the environment, thus the use of bacteria might reduce environmental load of the nematodes [14].

The toxins released by *Bacillus* spp. act on the early stages of the trichostrongylide larvae and the larvicidal activity depends on the bacterial load and time of exposure [15]. It is important that the alternative biological control offers an integrated nematode control, such as in combination with pharmaceuticals, which in turn becomes an effective strategy to control gastrointestinal nematodiasis [16].

In pursuit of this alternative, the present study aimed to verify the *in vitro* and *in vivo* nematicidal effects of *Bacillus* species, and assessed the effectiveness of these bacteria in combination with commercial anthelmintics.

2. Material and Methods

2.1. Recovery of the parasite eggs

For the *in vitro* efficacy tests, the nematode eggs were obtained by the fecal samples collected directly from the rectums of calves naturally infected with gastrointestinal nematodes. The samples were analyzed using the Gordon and Whitlock [17] technique, using only samples containing ≥ 1000 eggs per gram of feces.

2.2. *Bacillus* spp.

The bacterial strains *Bacillus circulans* (Bcir), *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) and *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) used in this study were obtained from microbial collection of the Department of Microbiology and Parasitology, Pelotas Federal University. The bacteria were revived by subculturing on NYSM medium agar [18], incubated at 28 °C for 24 h. The purity of the inoculum was confirmed by the Gram-staining. The cultures were then inoculated into a 1-L volumetric flask containing 200 mL of Nutrient Yeast Extract Salt Medium (NYSM) medium, and then incubated on a rotary shaker at 28 °C at a speed of 150 rpm for 48 h till sporulation occurred. Afterwards, all sporulated cultures were placed in a water bath (80 °C) for 12 min to remove any vegetative *Bacillus* forms and then titrated. To perform the tests, we used Bti and Bto at a concentration of 10^8 colony-forming units per mL (CFU/mL), Btk, and Bcir. The optimum concentrations were based on an earlier study [15].

2.3. *In vitro* larvicidal assay for *Bacillus*

To evaluate the larvicidal activity of the selected *Bacillus* species against trichostrongylide five groups of test samples were made. In each group 4 g of feces was taken from the pool, and in Group I Bcir ($2 \cdot 10^8$ CFU/mL/vial), in group II Bto ($2 \cdot 10^8$ CFU/mL/vial), in group III Bti ($2 \cdot 10^8$ CFU/mL/vial), in group IV Btk ($2 \cdot 10^8$ CFU/mL/vial), and in Group V (as negative control) 2 mL of distilled water per vial was added. Then, all groups were subjected

to coproculture using the Roberts and O'Sullivan [19] technique. Larvae (L3) were recovered for counting and identification. All experiments were independently repeated three times. The efficiency of larval reduction was determined by using the formula $R = 100 (1 - T/C)$, where R is the reduction (larvicidal effect), C is the number of larvae in the control, and T is the number of larvae in the bacteria treated group [20].

2.4. Feasibility of *Bacillus* with test drugs

To determine the compatibility of the tested *Bacillus* species with the anthelmintics, the *Bacillus* species that showed the best larvicidal effect *in vitro* was chosen. For this, 2 mL spore suspensions of Bti (1.10^8 CFU/mL) and Bcir (1.10^8 CFU/mL) were mixed with 2 mL of the anthelmintics: moxidectin (Cydectin® - 10mg/mL), levamisole (Ripercol® - 75mg/mL), and nitroxylin (Dovenix® - 340mg/mL). All groups were incubated at room temperature and then bacteria in each group were quantified at 24, 72 and 144 h of incubation. The experiment was independently repeated three times in triplicate.

2.5. *In vivo* *Bacillus* larvicidal effect

Twenty-six mixed breed (Aberdeen Angus with Hereford) one-year-old calves, with an EPG average of ≥ 2000 were used. All calves were kept in natural (extensive) grazing conditions throughout the experiment. All experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA-9118). For evaluations, the animals were divided into four groups: Group A included four animals, which were administered levamisole (7.5 g/100 mL) subcutaneously at a dose of 1 mL/20 kg body weight (as recommended by the supplier); Group B included eight animals receiving levamisole along with oral administration of Bti spore suspension (3.10^9 CFU /mL); Group C with twelve animals administered oral Bti spore suspension (3.10^9 CFU /mL), and Group D with two calves as controls.

Before treatments, and 24 and 48 h after treatment, EPG and the number of larvae recovered from coprocultures, were performed as describe above.

3. Results

3.1 *In vitro* *Bacillus* larvicidal efficacy

All of the *Bacillus* species tested showed larvicidal effect against larvae (L3) of the gastrointestinal nematodes found in naturally infected feces (Fig. 1). Getting from the untreated group 793 larvae while from the group Bto 266 larvae, Btk 80 larvae, Bcir 73 larvae and Bti 40 larvae. It was estimated that 80–90% of the incubated eggs would hatch under favorable conditions, and this was confirmed during the experiments. In relation to the identification of the larvae obtained from the coprocultures, it was observed that *Haemonchus* spp. were most prevalent, accounting for approximately 80% of the genus present.

The efficacy percentages of the larvicidal activity of Bto, Btk, Bcir and Bti, against the total larvae of trichostrongylides, were 66%, 89%, 90% and 94%, respectively, when compared to the negative control group.

3.2. *Bacillus* larvicidal effect on trichostrongylides

When the larvicidal effect for all *Bacillus* species on each species of gastrointestinal nematode in the feces was evaluated, the highest mortality rate was observed with *Trichostrongylus* spp. (90.3%), followed by *Ostertagia* spp. (87%) and *Haemonchus* spp. (85.7%) (Fig. 1).

3.3. The bactericidal effect of the anthelmintics

The only combination of bacteria and anthelmintic that generated bactericidal effect was moxidectin against Bcir, with a drop of log in every 24 h (Table 1). However, moxidectin did not shown any bactericidal effect against Bti. The other anthelmintics, levamisole and nitroxylnil, did not show any bactericidal effect against Bcir and Bti.

3.4. *In vivo* larvicidal effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti)

The group that was administered levamisole showed an efficacy of 91% at 24 h and 100% at 48 h. The group in combination with Bti and levamisole had an efficacy of 94% at 24

h and 100% at 48 h. The group treated with Bti alone showed larvicidal efficiency of 84% at 24 h and 34% at 48 h (Fig. 2).

4. Discussion

Gastrointestinal parasites cause significant economic losses to cattle livestock. Different anthelmintics are used to control these parasites, but most of them have developed resistance [3]. In agriculture, biological control is already in use as an alternative control nematode infestation [21]. However, the potential for using this kind of alternative against gastrointestinal parasites in cattle is still under investigation. This study presents direct evidence for the successful implication of *Bacillus* spp. as a biological control agent for the gastrointestinal trichostrongylides in cattle.

Bacillus circulans (Bcir), *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), and *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) showed potential *in vitro* larvicidal effect against the larvae of nematodes *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. and *Trichostrongylus* spp. Among the tested bacteria, *Bacillus circulans* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* showed the best *in vitro* larvicidal efficiency of 90% and 94%, respectively, against the tested nematodes. These results were in line with our earlier report on the control of nematodes in naturally infected sheep herd [15].

Besides these, there are also other parallel studies conducted with an aim of using *Bacillus* as an alternative to improve agricultural production [22,23,24,25]. The study conducted by Kotze [26] using *B. thuringiensis* to control *in vitro* larval development of *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, and *Ostertagia circumcincta* obtained similar results to the present study, suggesting its use as an alternative endoparasite control.

In an *in vitro* study conducted by our group [15], Bcir and Bti showed 86.63% and 81.55% efficacy, respectively, in inhibiting the development of larval nematodes in sheep. The present study obtained better test results with these two *Bacillus*. The difference between the

two studies could be attributed to the nematodes under evaluation, as the cited work tested *Haemonchus contortus* alone, whereas we evaluated *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. and *Trichostrongylus* spp. The difference in the fecal compositions (pH, water content in sheep vs. cattle) might also play some role for the microorganism production of the larvicidal toxin. However, we could not evaluate such possibilities. In general, most herds involve extensive farming; therefore, infections are the rule, and thus a testing done with multiple genera approximates the reality found in the field [27].

Urban [25] orally administered Bti Cry 5B toxin in pigs and found a reduction of 97% in *Ascaris suum* L4 larvae. Similar results were also found by Capello [28], while evaluating Bti Cry 5B toxin, *in vitro* and *in vivo*, against larvae and adults of *Ancylostoma ceylanicum*. The efficacy of Bti reported herein might be based on the secretion of the same toxin; however, in contrast to our experiment, the mentioned study used a purified form of Bti Cry 5B toxin. However, there are also evidences that suggest Cry11Aa toxin produced by Bti renders larvicidal effect against *Haemonchus contortus* [29].

Baloyi [30], while studying *in vitro* migration inhibition of *Haemonchus contortus* L3 by *Bacillus thuringiensis*, observed a reduction of ~73% in larval recovery. On the other hand, we reported a 94% larval inhibition by Bti. We observed an *in vitro* reduction of 66%, 89%, and 94% for Bto, Btk, and Bti, respectively. This difference in results can be attributed to the difference in the strains, spore or toxin concentration, and to the different toxins expressed by the strains used.

The *Bacillus* strains used in this experiment showed similar toxin band patterns when electrophoresed on 12% SDS–PAGE, where each strain produced predominant bands of 10–90 kDa (data not show). The data obtained in this study suggest that one or more toxins could confer the larvicidal effect to *Bacillus*. We acknowledge this as limitation of our work that we did not identify which toxin(s) is responsible for the toxic effect on the trichostrongylide larvae.

The anthelmintics levamisole, moxidectin, and nitroxynil showed no toxic effect on Bti. The *in vivo* combination test indicated that levamisole with Bti does not cause synergistic effect, thus suggesting that the anthelmintic effect observed was due to levamisole alone. Levamisole generates spastic paralysis in gastrointestinal nematodes (adults and larvae), thus facilitating elimination of the parasites in the stool and inhibiting their migration [31]. However, in some herd levamisole resistance has been noted [32], in such cases; some synergic effect might be manifested.

This study found a reduction of 91% in the larvae with the treatment by *Bacillus* and levamisole combination in the first 24 h. A similar result was found in a study conducted by Soutello [33], where a reduction of 97.4% occurred after 24 h possibly via the same active mechanism.

The *in vivo* larvicidal effect of Bti was observed only at 24 h post administration with 84% efficacy, whereas at 48 h its efficacy dropped to 34%. This was expected since a single administration of Bti was applied, and the higher number of bacteria, after oral administration, in the feces occurs at 12 h [34].

5. Conclusions

Although there is a growing interest in the use of bacteria for biological control of gastrointestinal nematodes in ruminants, studies employing different *Bacillus* species are scarce. Given the significant nematicide effect observed in this study, it is clear that all of the tested *Bacillus* species are promising for the biological control of bovine nematodiasis. In addition, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* can be used in combination with anthelmintics as an integrated control management of the parasites.

In summary, the *Bacillus* species used in this study seem to be a promising alternative for the control of nematode in veterinary medicine.

Acknowledgements

We thank Dr. Carlos Vianna for the assistance and all our collaborators.

Funding: This work was supported by Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES (Ministério da Educação, Brazil, Edital 032 – Parasitologia Básica), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brazil).

6. References

- [1] L. Grisi, R.C. Leite, J.R.D.S. Martins, A.T.M.D. Barros, R. Andreotti, P.H.D. Cançado, H.S. Villela, Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 23(2) (2014) 150-156.
- [2] B.D. Perry, T.F. Randolph, Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals, *Veterinary Parasitology*. 84 (1999) 145–168.
- [3] R.M. Kaplan, Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report, *Trends in Parasitology*. 20(10) (2004) 477-481.
- [4] J.H. Neves, N. Carvalho, L. Rinaldi, G. Cringoli, A.F. Amarante, Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: A comparison of different methodologies, *Veterinary Parasitology*. 206 (2014) 216-226.
- [5] R.G.V. Soutello, M.C.Z. Seno, A.F.T. Amarante, Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil, *Veterinary Parasitology*. 148 (2007) 360 – 364.
- [6] F.A. Almeida, K.C.O.D. Garcia, P.R. Torgerson, A.F.T.D. Amarante, Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil, *Parasitology International*. 59(4) (2010) 622-625.

- [7] M.B. Molento, C.J. Veríssimo, A.T. Amarante, J. Van Wyk, A.C.S. Chagas, J.V. de Araújo, F.A. Borges, Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes, *Arquivos do Instituto Biológico*. 80(2) (2013) 253-263.
- [8] M.E. Silva, F.R. Braga, P.M.D. Gives, M.A.M. Uriostegui, M. Reyes, F.E.D.F. Soares, J.V.D. Araújo, Efficacy of *Clonostachys rosea* and *Duddingtonia flagrans* in Reducing the *Haemonchus contortus* Infective Larvae, *Bio Med Research International*. 2015 (2015).
- [9] J. Ludwig, A.B. Moura, C.B. Gomes, Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas, *Tropical PlantPathology*. (2013) 264-268.
- [10] B.O. Corrêa, A.B. Moura, C.B. Gomes, L. Somavilla, D.J.A. Rocha, I.F. Antunes, Potencial of seed microbiolization with Rhizobacteria to control of Root-Knot nematode in common bean, *Nematropica*. 42(2) (2012) 343-350.
- [11] R.H. Fernandes, E.A. Lopes, B.S. Vieira, A.F. Bontempo, Controle de *Meloidogyne javanica* na Cultura do Feijoeiro com Isolados de *Bacillus* spp., *Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas*. 1 (2013) 7.
- [12] Y. Hu, B. Zhan, B. Keegan, Y.Y. Yiu, M.M. Miller, K. Jones, R.V. Aroian, Mechanistic and Single-Dose *In Vivo* Therapeutic Studies of Cry5B Anthelmintic Action against Hookworms, *PLoS neglected tropical diseases*. 1900 (2012) 6.
- [13] M. Larsen, Biological control of helminthes, *International Journal for Parasitology*. 29 (1999) 139-146.
- [14] P.J. Waller, M. Faedo, The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock, *International Journal for Parasitology*. 26 (8/9) (1996) 915-925.

- [15] M.C. Sinott, N.A. Cunha Filho, L.L.D. Castro, L.B. Lorenzon, N.B. Pinto, G.A. Capella, F.P.L. Leite, *Bacillus* spp. Toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures, *Experimental Parasitology*. 132 (2012) 103–108.
- [16] J. O'Grady, R.J. Akhurst, A.C. Kotze, The requirement for early exposure of *Haemonchus contortus* larvae to *Bacillus thuringiensis* for effective inhibition of larval development, *Veterinary Parasitology*. 150 (2007) 97–103.
- [17] H.M. Gordon, H.V. Whitlock, A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces, *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*. 12 (1939) 50-52.
- [18] A.A. Yousten, *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide, *Advances in Biotechnology Processes*. 3 (1984) 315-343.
- [19] F.H.S. Roberts, P.J. O'Sullivan, Methods for eggs-counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle, *Australian Journal of Agricultural Research*. 1(1) (1950) 99-102.
- [20] G.C. Coles, C. Bauer, F.H.M. Borgsteede, S. Geerts, T.R. Klei, M.A. Taylor, P.J. Waller, World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance, *Veterinary Parasitology*. 4 (1992) 35-44.
- [21] F.S. Betz, B.G. Hammond, R.L. Fuchs, Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*: protected plants to control insect pests, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 32 (2000) 156-173.
- [22] K.C. Constanski, J. Zorzetti, G.T.V. Boas, A.P.S. Ricietto, F.A.P. Fazon, L.V. Boas, P.M.O.J. Neves, Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp., *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 50(8) (2015) 730-733.
- [23] R.M. Goulart, S.A. De Bortoli, A.M. Vacari, V.L. Laurentis, A.C.P. Veiga, C.P. De Bortoli, R.A. Polanczyk, Efeito de *Bacillus thuringiensis* nas características biológicas do

- predador *Orius insidiosus* Say (Hemiptera: Anthocoridae) alimentado com ovos de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), *BioAssay*. 10 (2015).
- [24] G. Andrade Bezerra, D.A. Macedo, I. de Oliveira Nascimento, T.P. de Sousa, N.B. Costa, L.F.R. de Aquino Sousa, Uso de *Bacillus* spp. no controle de fitopatógenos em sementes de soja variedade BRS VALIOSA RR., *Revista Agroecossistemas*. 5(1) (2013) 68-73.
- [25] J.F.Jr. Urban, Y. Hu, M.M. Miller, U. Scheib, Y.Y. Yiu, R.V. Aroian, *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B Has Potent Anthelmintic Activity against *Ascaris suum*, *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7 (2013) e2263.
- [26] A.C. Kotze, J. O'Grady, J.M. Gough, R. Pearson, N.H. Bagnall, D.H. Kemp, R.J. Akhurst, Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of economically important nematode parasites of livestock, *International Journal for Parasitology*. 35 (2005) 1013–1022.
- [27] T.R. Santos, W.D.Z. Lopes, C. Buzulini, F.A. Borges, C.A.M. Sakamoto, R.C.A. Lima, G.P. Oliveira, A.J. Costa, Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil, *Ciência Rural (UFSM. Impresso)*. 40 (2010) 934-938.
- [28] M. Capello, R.D. Bungiro, L.M. Harrison, L.J. Bischof, J.S. Griffiths, B.D. Barrows, R.V. Aroian, A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*. 103 (2006) 15154-15159.
- [29] A. Lara, L. Lorenzon, A. Vianna, F. Santos, L. Pinto, M.E. Berne, F. LEITE, Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*, *Parasitology*. (2016) in Press.
- [30] M.A. Baloyi, M.D. Laing, K.S. Yobo, Use of mixed cultures of biocontrol agents to control sheep nematodes, *Veterinary Parasitology*. 184 (2012) 367–370.

- [31] P. Köhler, The biochemical basis of anthelmintic action and resistance, *International Journal for Parasitology*. 31 (2001) 336-345.
- [32] A.P. Souza, C.I. Ramos, V. Bellato, A.A. Sartor, C.A. Schelbauer, Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense, *Ciência Rural*. 38(5) (2008) 1363-1367.
- [33] R.G.V. Soutello, W.M.D. Coelho, F.P. de Oliveira, J.F. Fonzar, B.C. Luquetti R.F.P. de Souza, M.C.Z. Seno, A.F.T. Amarante, Evaluation of reduction in egg shedding of gastrointestinal nematodes in cattle following administration of anthelmintics, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 19(3) (2010) 183-185.
- [34] M.C. Sinott, L.L. Dias de Castro, F.P.L. Leite, T. Gallina, M.T. De-Souza, D.F.L. Santos, F.P.L. Leite, Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep, *Journal of Helminthology*. 1 (2014) 1-6.

Table 1: *Bacillus* species viability before and after incubation with different anthelmintic for 24, 72 and 144 hours of incubation

Treatments	Concentration (UFC/mL)			
	Initial Concentration*	24 h	72 h	144 h
Levamisol+ Bcir	1.10^{10}	1.10^{10}	1.10^9	2.10^9
Levamisol + Bti	1.10^8	6.10^8	3.10^8	1.10^7
Moxidectina + Bcir	1.10^{10}	1.10^9	6.10^7	3.10^6
Moxidectina + Bti	1.10^8	1.10^8	6.10^7	3.10^7
Nitroxinil+ Bcir	1.10^{10}	1.10^9	2.10^9	7.10^8
Nitroxinil+ Bti	1.10^8	8.10^7	7.10^7	2.10^7

*Concentration of each *Bacillus* species before addition of antihelminthic

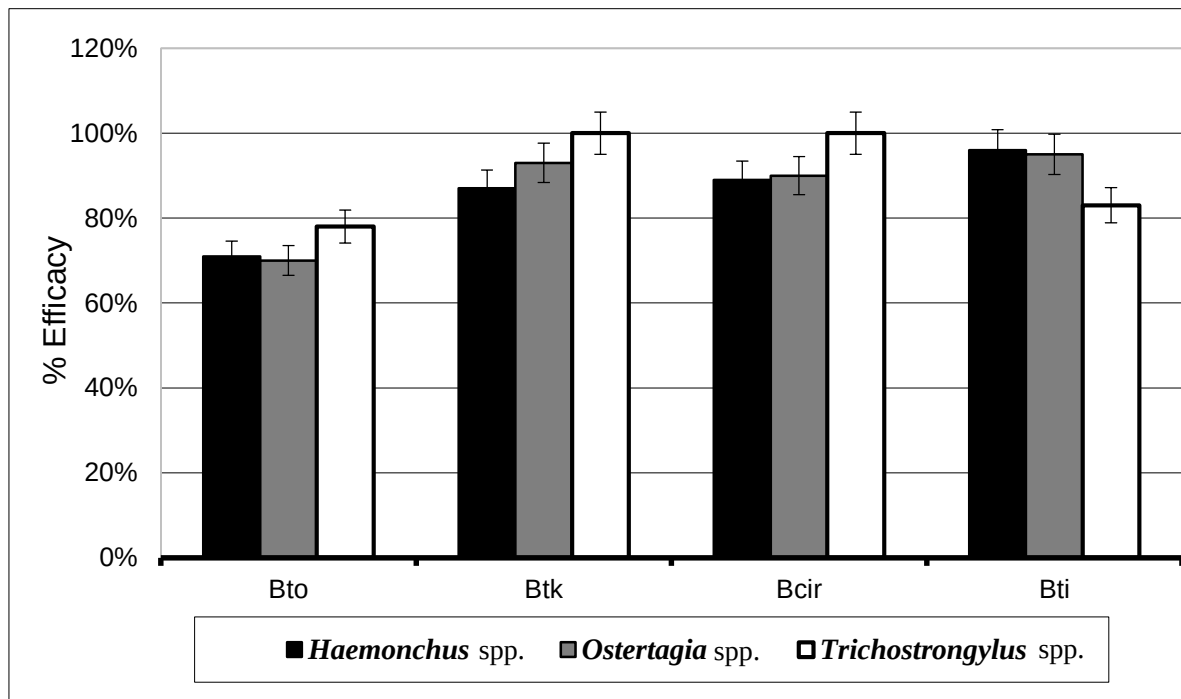


Fig. 1: Larvicidal efficacy *in vitro*. The data represents the mean percentage efficacy (+/- SD) *in vitro* from *Bacillus thuringiensis* var. *osvaldocruzi* (Bto), *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), *Bacillus circulans* (Bcir), and *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti) on larvae (L1 / L2) of gastrointestinal nematodes of cattle.

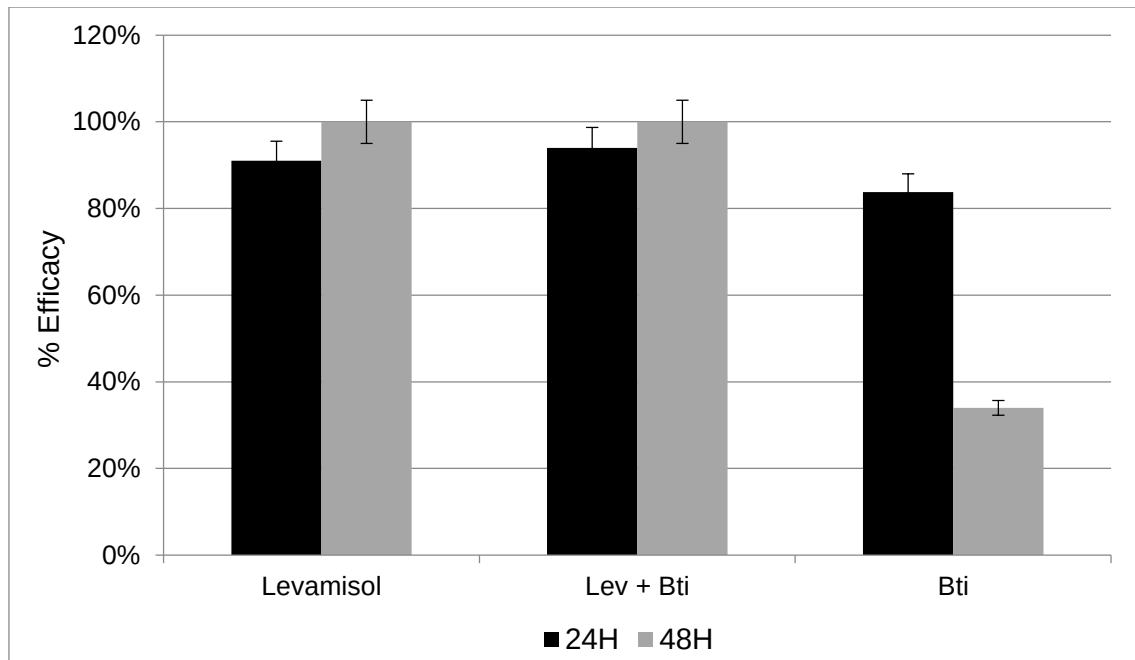


Fig. 2: Larvicidal efficacy *in vivo*. The data represents the mean percentage (+/- SD) of the anthelmintic efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti) and their association in gastrointestinal nematodes of cattle *in vivo* test.

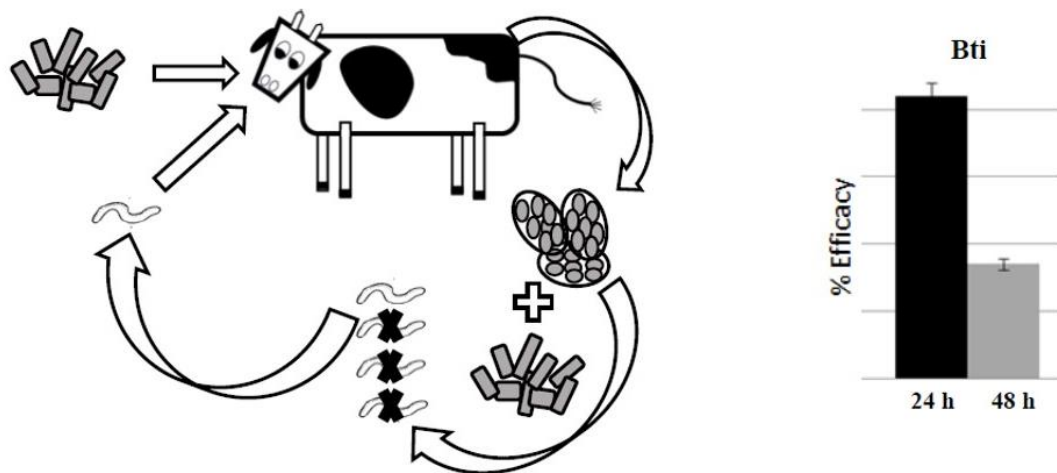


Fig. 3 Graphical Abstract

4.2 Artigo 2

Inibição da eclodibilidade e da migração larval de nematódeos gastrintestinais de ovinos por óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

Natália Berne Pinto, Leonardo Mortagua de Castro, Rosária Helena Machado Azambuja, Micaele Quintana de Moura, Wesley Douglas Terto, Marlete Brum Cleff, Rogério Antonio Freitag, Sabrina Jeske, Maria Elisabeth Aires Berne, Fábio Pereira Leivas Leite

Artigo formatado segundo as normas da UFPel

Inibição da eclodibilidade e da migração larval de nematódeos gastrintestinais de ovinos por óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

Natália Berne Pinto, Leonardo Mortagua de Castro, Rosária Helena Machado Azambuja, Micaele Quintana de Moura, Wesley Douglas Terto, Marlete Brum Cleff, Rogério Antonio Freitag, Sabrina Jeske, Maria Elisabeth Aires Berne, Fábio Pereira Leivas Leite

Resumo

As infecções por nematódeos gastrintestinais (NGI) constituem a maior limitação à produção de pequenos ruminantes e o seu controle realizado intensamente por anti-helmínticos levou ao aparecimento da resistência. Dentre as alternativas ao controle de NGI de ovinos, estudos com a utilização de plantas, com possível potencial antihelmíntico, se torna uma importante linha de pesquisa. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação ovicida e larvica *in vitro* do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. O óleo de *R. officinalis* foi analisado por cromatografia gasosa e foram testados em NGI as seis seguintes concentrações, 227,5mg/mL; 113,7mg/mL; 56,8mg/mL; 28,4mg/mL; 14,2mg/mL; 7,1mg/mL. Para determinar a ação ovicida, ovos foram recuperados de fezes de ovinos naturalmente infectados por NGI, através de filtrações em quatro tamises de diferentes aberturas de malhas e incubados por 24h com as diferentes concentrações do óleo, seguindo-se a contagem de ovos e larvas. Na avaliação da migração das larvas, estas foram obtidas por coprocultura, e da mesma forma associadas ao óleo essencial por 24h nas mesmas concentrações, em seguida permaneceram por mais 24h em microtamises, seguindo-se a contagem de larvas que migraram e que não migraram. Na análise cromatográfica deste óleo foram identificados 18 constituintes, sendo os majoritários o Eucalyptol (1.8-cineole) com 42,11%, o (+)-2-Bornanone com 16,37% e o α -Pinene com 14,76%. Nos testes *in vitro* o óleo de *R. officinalis* inibiu 100% da eclodibilidade nas quatro maiores concentrações e alcançou 70% e 74% de inibição da migração das larvas nas duas maiores concentrações, respectivamente. A concentração inibitória 50 (CI50) do óleo sobre os ovos foi de 0,5181 mg/mL enquanto a CI50 da migração das larvas foi de 62,17 mg/mL. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, o óleo essencial de *R. officinalis* possui ação ovicida e larvica sobre NGI de ovinos, portanto com potencial para novos estudos *in vivo*.

Palavras-chave: Controle biológico; Fitoterapicos; Helmintos; Ruminantes

1 Introdução

O incentivo para a produção de carne ovina tem sido grande e a estrutura da criação se modificou para atender ao mercado, visando maior produtividade em menor espaço. Para isso, os rebanhos foram concentrados em pequenas áreas e os animais selecionados a partir da sua produção de carne. Esta nova realidade de produção, aliada a um manejo ineficiente levou os nematódeos gastrintestinais (NGI) a ser o principal entrave na produção de ovinos (AMARANTE et al., 2015).

Na tentativa de reduzir os prejuízos, houve um elevado aumento na frequência e nas doses de tratamentos com anti-helmínticos acarretando de forma irreversível a resistência dos NGI a praticamente todos os princípios ativos disponíveis (SALGADO & SANTOS, 2016). Dentre estes parasitos destaca-se o *Haemonchus contortus*, principalmente por sua característica hematófaga e alta prolificidade das fêmeas (GETACHEW et al., 2007).

Novas estratégias de combate a esses nematódeos são alvos de estudos em todo o mundo, dentre os quais se destacam a utilização de manejo com diferentes espécies de ruminantes, pastejo rotativo, integração lavoura-pecuária, seleção genética de animais, utilização de fungos e bactérias no controle biológico, fitoterápicos e produção de vacinas (MOLENTO et al., 2013; SINOTT et al., 2012).

Nos últimos anos os estudos com plantas obtiveram grande representatividade dentre as linhas de pesquisa que buscam alternativas contra parasitos de ruminantes. Estes tem mostrado atividade anti-helmíntica promissoras sobre NGI de ovinos (CAMURCA-VASCONCELOS et al., 2007; YOSHIHARA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014; MARIE-MAGDELEINE et al., 2014; MACEDO et al., 2015).

Rosmarinus officinalis, pertence à família Lamiaceae e é conhecida popularmente por Alecrim. Esta planta é comumente utilizada na culinária, mas em estudos realizados seu óleo essencial já demonstrou ação antibacteriana e antifúngica (OLUWATUYI et al., 2004; GENENA et al., 2008). Com isso, em face ao grave problema de resistência, aliado ao apelo do consumidor por alimentos sem resíduos químicos, buscar alternativas sustentáveis de controle aos nematódeos de ovinos é uma necessidade eminente e o Alecrim surge como agente em potencial.

Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade *in vitro* do óleo de *R. officinalis*, sobre ovos e larvas de NGI de ovinos.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção do óleo

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

Foi realizada a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa do óleo essencial de *R. officinalis* (Chiaradia et al., 2008) e os compostos foram analisados com base na biblioteca NIST08 do GC/MS. Para os testes, o óleo essencial foi diluído em Água Destilada e Tween 80 a 1% como segue: 227,5mg/mL; 113,7mg/mL; 56,8mg/mL; 28,4mg/mL; 14,2mg/mL; 7,1mg/mL, corresponde, respectivamente a concentração de 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56% e 0,78%.

2.2 Obtenção de ovos

Os ovos de NGI foram recuperados através de coleta de fezes diretamente da ampola retal de ovinos com infecção natural mista. As amostras de fezes coletadas foram imediatamente processadas, passando primeiro por maceração e homogeneização com água destilada à 40 °C. Seguindo-se a passagem por três tamises de malhas de 1mm, 105µm, 55µm com o objetivo de reter as maiores partículas do bolo fecal. O material restante passou por tamise de malha de 25µm onde os ovos ficaram retidos, foram recuperados e centrifugados (203 g por 5 minutos) com água destilada por três vezes desprezando o sobrenadante. Uma última centrifugação foi realizada utilizando solução hiperssaturada para a flutuação dos ovos e este sobrenadante foi desprezado na tamise de malha de 25µm para lavagem com água destilada (Hubert e Kerboeuf, 1992).

2.3 Teste *in vitro* de Inibição da Eclodibilidade (IE)

O teste de inibição da eclodibilidade foi realizado a partir da técnica de Coles et al. (1992), utilizando-se aproximadamente 150 ovos das soluções testes em placas de polietileno de 24 poços. Assim foram formados quatro seguintes grupos, Grupo 1: Óleo Essencial de Alecrim nas concentrações de 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56% e 0,78%; Grupo 2: Controle negativo com água destilada, Grupo 3: Controle positivo

com Levamisol 0,025 mg/mL, Grupo 4 controle de atuação física com o Óleo Mineral e Grupo 5 com Tween 80 a 1%. Todos os testes foram incubados por 24 horas em estufa a 28° C e 80% UR e realizados em triplicatas. Após este período se procedeu as leituras em microscópio invertido, com a contando dos ovos e das larvas presentes em cada poço. As médias da inibição da eclodibilidade para cada tratamento foi determinada conforme a equação descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007): % de Inibição da Eclodibilidade = número de larvas / número de larvas+número de ovos X 100.

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.7 pt (2017). E a concentração inibitória 50% (CI50), concentração capaz de inibir 50% da eclosão foi determinada a partir da curva dose-resposta. Com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa GraphPad Prism para Windows, versão 5.0.

2.4 Obtenção de larvas

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de ovinos com infecção mista natural por NGI. Estas foram processadas para identificar as positivas através da quantificação dos ovos pela técnica descrita por Gordon & Whitlock (1939). As amostras positivas foram acondicionadas em estufa a 28 °C e UR acima de 80% por sete dias, quando então as larvas de terceiro estágio foram recuperadas, contadas e identificadas (ROBERTS E O'SULLIVAN, 1950).

2.5 Teste *in vitro* da Inibição da Migração Larval (IML)

No teste de IML segundo Jackson e Hoste (2010) com modificações, primeiramente as larvas foram colocadas para migrar em tamis de 25µm por aproximadamente uma hora em placas de polietileno de seis poços, selecionando as larvas viáveis. Após essa seleção inicial, as L3 foram colocadas em contato com 0,6% da solução de desembainhamento (hipoclorito de sódio 2%) por aproximadamente 20min. Seguindo-se três lavagens através de centrifugando, a 203 g por 2min com água destilada e a adequação final para concentração de 150 larvas em 100µL.

Então, foi adicionado 100µL da solução larvar na primeira e na terceira linha das placas de 24 poços para incubação por 24 horas em estufa a 28 °C com 80% UR, com 900µL do óleo nas concentrações de 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56% e 0,78%. Após este período, o conteúdo de cada poço contendo as L3 foi transferido para

tamises de 25µm inseridas em outra placa de polietileno de 24 poços e acondicionadas novamente em estufa a 28 °C por 24 horas. Após este período os tamises foram removidos e conteúdo retido foi colocado nos poços da segunda e quarta linha da placa, seguindo-se a contagem em microscópio invertido das larvas que migraram e das larvas que ficaram retidas nos tamises. O mesmo procedimento foi realizado com os controles de água destilada, Óleo Mineral, Tween, e anti-helmíntico (Levamisol 0,025 mg/mL), e todos os testes foram realizados em triplicatas.

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.7 pt (2017). E a concentração inibitória 50% (CI50), concentração capaz de inibir 50% da migração larval foi determinada a partir da curva dose-resposta. Com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa GraphPad Prism para Windows, versão 5.0. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) com o número 3897.

3 Resultados

Na avaliação cromatografica do óleo essencial de *R. officinalis* foi observado dezoito diferentes compostos (Tabela 1), sendo que os três majoritários foram o Eucalyptol, o (+)-2-Bornanone e o alpha.-Pinene. Juntos, estes três representam mais de 70% dos componentes do óleo essencial.

Segundo a classificação de POWERS et al. (1982), este óleo se mostrou altamente eficaz ao inibir a eclodibilidade em todas as concentrações testadas, alcançando 100% de ação em quatro das seis diluições (Figura 1).

O mesmo óleo na avaliação da inibição da migração larval foi pouco efetivo nas duas maiores concentrações testadas, alcançando 74% e 70% respectivamente, e não foi efetivo nas demais concentrações (Figura 1). Os controles de Água Destilada, Tween e Óleo Mineral resultaram em menos de 10% de inibição para ambos os testes.

Os gêneros identificados na coprocultura foram *Haemonchus* spp. (79%), *Ostertagia* spp. (18%) e *Trichostrongylus* spp. (3%). A análise estatística da inibição da eclodibilidade não demonstrou diferença entre os tratamentos, mas todos foram estatisticamente diferente do controle. A mesma análise sobre a inibição da migração larval identificou que as duas maiores concentrações são estatisticamente iguais entre si e diferentes dos demais tratamentos e do controle. A concentração mínima do óleo essencial de *R. officinalis*, necessária para inibir 50% da eclodibilidade (CI50) foi de 0,5181 mg/mL, enquanto a CI50 da inibição das larvas foi de 62,17 mg/mL.

4 Discussão

A ação nematocida de óleos essenciais se deve a múltiplos fatores deletérios na atividade metabólica, na alteração da permeabilidade da membrana celular e na desestruturação do sistema nervoso (OKA et al., 2000). Em análises cromatográficas realizadas, foram identificados diferentes compostos para o óleo essencial de *R. officinalis*, dentre estes o 1,8-cineol e α -pineno foram descritos como componentes majoritários além de no presente estudo, também por Jiang et al. (2011), Santoyo et al. (2005) e Okoh et al. (2010). O α -pineno também foi encontrado dentre os principais composto por Bozin et al. (2007), Gachkar et al. (2007), e Bouchra et al. (2003), destacando assim a sua relevância.

Em avaliação realizada por Grando et al. (2016) em larvas de *Haemonchus contortus* com o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi observado 88% de inibição no teste de migração larval (IM) a uma concentração de 56 mg / ml e 100% de inibição no teste de eclodibilidade (IE) a uma concentração de 3,5mg/mL. No presente estudo, onde o gênero de parasito mais prevalente foi o *Haemonchus* (79%), no teste de IM com a mesma concentração, porém com o óleo essencial de *R. officinalis*, foi observado uma inibição de 55,3% e no teste de IE a inibição foi de 96,6% na menor concentração. Os resultados dos dois estudos demonstram que são necessárias concentração relevantemente maior para inibir a migração das larvas do que para inibir e eclodibilidade. Isso ocorre pois, as larvas infectantes são mais resistentes visto que evoluíram para conseguir permanecer por longos períodos no ambiente expostas a ações deletérias do clima. Para isto, estas larvas possuem dupla cutícula e passam por um processo denominado anidrobiose, que gera uma severa diminuição da sua atividade metabólica aumentando o seu período de sobrevivência (Amarante, 2015). A avaliação cromatográfica destes óleos demonstram semelhanças, como o composto que está presente em maior quantidade no óleo de *M. alternifolia* é o terpinen-4-ol (41.98%), este também está no óleo de *R. officinalis*, porém em menor quantidade. E o componente de maior representatividade no óleo de *R. officinalis*, o 1.8-cineole, está entre os quatro principais do óleo de *M. alternifolia*. A CL₅₀ para os dois óleos foi semelhante sendo de 0,43 mg/mL para *M. alternifolia* e de 0,5181 mg/mL para *R. officinalis* no presente estudo.

Em estudo realizado por Barbosa et al. (2012), também com óleo essencial de *R. officinalis* em nematóides parasitos de plantas, foram realizados três coletas desta planta em diferentes locais e foi observado um potencial larvicida máximo de 2,55%

na concentração de 1,95%. Esta atividade foi inferior ao do presente estudo, mesmo na menor concentração, o que pode estar relacionado à época e local de coleta da planta, bem como as características do próprio nematódeo, visto o avaliado pelos autores ser de vida livre.

A ação ovicida do óleo essencial de *R. officinalis* já havia sido observada em ovos de besouro e mariposa em pesquisa desenvolvida por Tunc et al. (2000), porém alcançando resultados de 65% de eficácia na concentração de 100%, e assim sendo inferior ao determinado no presente estudo que obteve 100% de inibição já na concentração de 3,12%. Esta diferença pode ser atribuída à origem dos ovos avaliados, que é recoberto por várias finas membranas, e estas características podem gerar maior resistência a ação do óleo. Também a origem da planta que podem apresentar diferentes concentrações em seus constituintes, como evidenciado por Yesil-Celiktas et al., (2007).

Em estudo realizado por Yoshihara, et al. (2014) com extrato de Taninos Condensados (TCs) foi avaliado a inibição da migração das larvas e da eclodibilidade de quatro gêneros de NGI, sendo estes *Haemonchus* (84%), *Trichostrongylus* (13%), *Oesophagostomum* (2%) e *Cooperia* (1%). Estes dois gêneros mais frequentes, também foram os identificados no presente estudo, e as duas análises foram semelhantes ao que se refere a média do gênero mais patogênico em ovinos, o *Haemonchus*, que no presente estudo foi de 79%. Este extrato obteve ação superior a 90% de inibição da eclodibilidade, apenas a partir da concentração de 25mg/mL sendo que este mesmo resultado foi obtido no presente estudo já na concentração de 7,1 mg/mL, consequentemente a sua CL50 foi maior de 2,85 mg/mL enquanto a do óleo foi de 0,5181 mg/mL. Em contrapartida o extrato de TCs alcançou melhores resultados no teste de IML obtendo 97,1% de inibição enquanto o do óleo de *Rosmarinus officinalis* foi de 74% na maior concentração (227,5 mg/mL). Mesmo com resultados superiores para o teste de IML, não foi observado 100% da inibição das larvas em nenhuma das concentrações testadas, confirmando o que foi observado no presente estudo, de serem as larvas desses nematódeos mais resistentes a ação dos fitoterápicos, quando comparado a ação destes sobre ovos. Como consequência, a CL50 das larvas deste estudo foi de uma concentração inferior, 12,45 mg/mL, enquanto a CL50 do óleo foi de 62,17 mg/mL.

Avaliando o potencial em inibir a eclodibilidade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em *H. contortus*, Macedo et al. (2015) observaram 99,5% de

inibição na concentração de 1,25 mg/mL, resultado próximo ao óleo essencial de *R. officinalis* 96,6% quando testado em maior concentração (7,1 mg/mL). Os diferentes resultados encontrados entre os estudos pode ser atribuído as plantas, por serem distintas. E também aos parasitos, os quais no presente estudo foi avaliado três gêneros de NGI, o que se assemelha ao encontrado a campo, visto que ovinos comumente possuem infecções mistas, enquanto o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi avaliado apenas com *H. contortus*. Esta diferença de eficácia dos produtos entre os gêneros de NGI de ruminantes já foi descrita inclusive com anti-helmínticos comerciais, sugerindo que a espécie *Haemonchus* seja mais sensível (NOVA et al., 2014).

5 Conclusões

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* demonstrou significativa eficácia ao inibir a eclodibilidade de NGI de ovinos e, como também estas observações sugerem a eficácia sobre a motilidade das larvas destes parasitos. Assim este demonstrou ser uma promissora alternativa ao controle de parasitos de ovinos.

Referências

- AMARANTE, A. F. T. D., RAGOZO, A., & SILVA, B. F. D.. Os parasitas de ovinos. São Paulo: **Editora Unesp Digital**, 2015.
- BARBOSA, P., FARIA, J., MENDES, M. D., DIAS, L. S., TINOCO, M. T., BARROSO, J. G., ... & MOTA, M.. Bioassays against pinewood nematode: assessment of a suitable dilution agent and screening for bioactive essential oils. **Molecules**, 17(10), 12312-12329. 2012.
- BOUCHRA, C.; ACHOURI, M.; IDRISSE, H. L. M.; HMAMOUCHE, M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, pp. 165-169, 2003.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 55(19): 7879-7885, 2007.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, p. 288-294, 2007.

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

COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H.M. et al. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.35-44, 1992.

GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M. B., TAGHIZADEH, M., ASTANEH, S. A., & RASOOLI, I.. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, 102(3), 898-904. 2007.

GENENA AZIZA KAMAL, HENSE HAIKO, SMÂNIA JUNIOR ARTUR, SOUZA SIMONE MACHADO. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(2): 463-469, abr.-jun. 2008.

GETACHEW T, DORCHIES P, JACQUIET P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Review Parasite**. Mar 1;14(1):3-14. 2007.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in sheep faeces. **Journal Council Science Industrial Research**. V. 12, p. 50-52, 1939.

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

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

JACKSON, F.; HOSTE, H. In vitro methods for primary screening of plant products direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. London: **Springer**, p. 25-45. 2010.

JIANG, Y., WU, N., FU, Y. J., WANG, W., LUO, M., ZHAO, C. J., ... & LIU, X. L.. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, 32(1), 63-68. 2011.

MACEDO, I. T. F., OLIVEIRA, L. M. B. D., RIBEIRO, W. L. C., SANTOS, J. M. L. D., SILVA, K. D. C., ARAÚJO FILHO, J. V. D., ... & BEVILAQUA, C. M. L.. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 24(3), 268-275. 2015.

MARIE-MAGDELEINE, C., UDINO, L., PHILIBERT, L., BOCAGE, B., & ARCHIMEDE, H.. *In vitro* effects of Musa x paradisiaca extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, 96(1), 127-132. 2014.

MOLENTO, M. B., VERÍSSIMO, C. J., AMARANTE, A. T., VAN WYK, J., CHAGAS, A. C. S., DE ARAÚJO, J. V., & BORGES, F. A.. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 80(2), 253-263, 2013.

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: RBHSA**, 8(1), 159-171. 2014.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, London/Detroit, v. 65, n. 24, p. 3249-3254, 2004.

OKA, Y., NACAR, S., PUTIEVSKY, E., RAVID, U., YANIV, Z., & SPIEGEL, Y.. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, 90(7), 710-715. 2000.

OKOH, O. O., SADIMENKO, A. P., & AFOLAYAN, A. J.. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, 120(1), 308-312. 2010.

POWERS, K.G.; WOOD, I.B.; ECKART, J.; GIBSON, T.E.; SMITH, H.J.. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology** 10, 256–284. 1982.

RIBEIRO, A. R., DE ANDRADE, F. D., DE MEDEIROS, M. D. C., CAMBOIM, A. D. S., JÚNIOR, F. A. P., ATHAYDE, A. C., ... & SILVA, W. W. . Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.(Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(11), 1051-1055. 2014.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, S.P. Methods for egg counts and larvae cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**. V. 1, p. 99-102, 1950.

SALGADO, J. A., & SANTOS, C. D. P.. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 25(1), 3-17. 2016.

SANTOYO, S., CAVERO, S., JAIME, L., IBANEZ, E., SENORANS, F. J., & REGLERO, G.. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, 68(4), 790-795. 2005.

SINOTT, M.C.; CUNHA FILHO, N.A.; CASTRO, L.L.D.; LORENZON, L.B.; PINTO, N.B.; CAPELLA, G.A.; LEITE, F.P.L. *Bacillus* spp. Toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. **Experimental Parasitology**. 132, 103–108, [0014-4894], 2012.

TUNC, I., BERGER, B. M., ERLER, F., & DAĞLI, F.. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, 36(2), 161-168. 2000.

YESIL-CELIK TAS, O., NARTOP, P., GUREL, A., BEDIR, E., & VARDAR-SUKAN, F.. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*’ calli. **Journal of plant physiology**, 164(11), 1536-1542. 2007.

YOSHIHARA, E., MINHO, A. P., CARDIM, S. T., TABACOW, V. B. D., & YAMAMURA, M. H.. In vitro ovicidal and larvicidal activity of condensed tannins on gastrointestinal nematode infestations in sheep (*Ovis aries*). **Semina: Ciências Agrárias**, 35(6), 3173-3180. 2014.

Tabela 1. Compostos do óleo essencial *Rosmarinus officinalis* identificados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Cromatografia	
Eucalyptol (1.8-cineole)	42.11%
(+)-2-Bornanone	16.37%
alpha.-Pinene	14.76%
Isoborneol	5.73%
alpha.-Terpineol	5.40%
Camphene	3.87%
o-Cymene	2.69%
Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)	2.08%
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl	1.70%
beta.-Myrcene	1.38%
Terpinen-4-ol	1.23%
Bornyl acetate	0.84%
Caryophyllene	1.00%
gamma.-Terpinene	0.37%
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	0.19%
Humulene	0.15%
Methyleugenol	0.07%
Thymol	0.05%

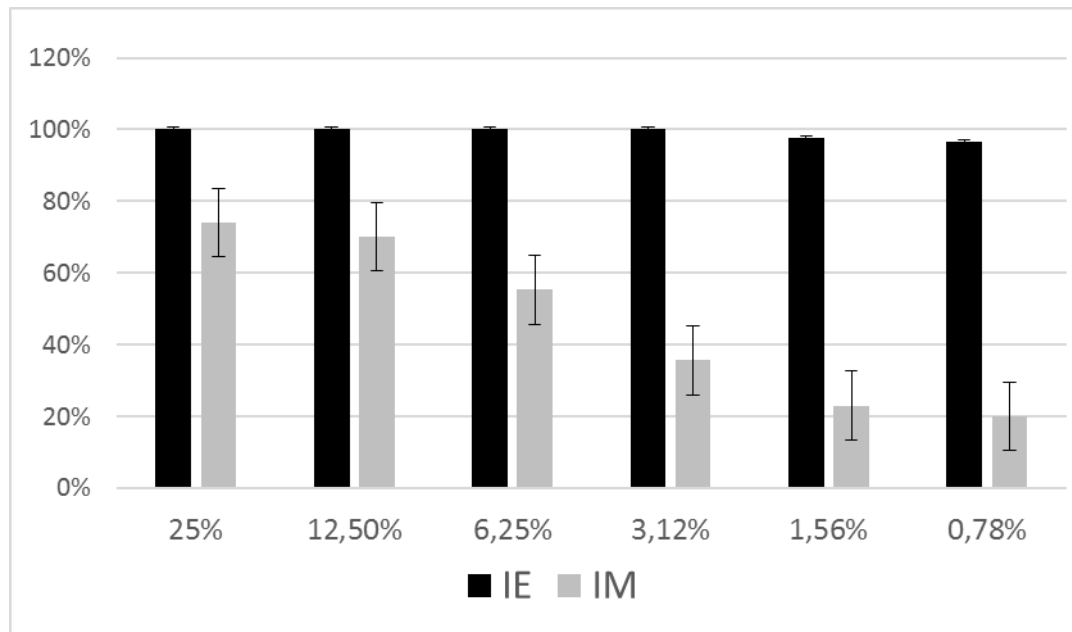


Figura 1: Eficácia do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em inibir a eclodibilidade (IE) e a migração das larvas (IM) de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

5 Considerações Finais

As parasitoses intestinais de ruminantes necessitam urgentemente de medidas integradas de controle, com ação sobre os NGI no hospedeiro e no ambiente, tornando mínimo o uso de anti-helmíntico. Resultados promissores apresentados aqui mostram perspectivas para o controle de nematódeos presentes no ambiente através da utilização de *Bacillus in vivo*, bem como a identificação de biomoléculas com ação nematicida.

Referências

ABBOTT, E. M.; PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v.38, p.6-13, 1985.

ALONSO-DIAZ, M.A., TORRES-ACOSTA, J.F.J., SANDOVAL-CASTRO, C.A., HOSTE, H., Tannins in tanniniferous tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? **Small Ruminant Research**. 89, 164–173, 2010.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 91-106, 2004.

AMARANTE, A.F.T.; SALES, R.O. Controle de Endoparasitoses dos Ovinos: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.01, p.14 – 36, 2007.

AMARANTE, A. F.. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**, 118(1), 56-62. 2014.

AMARANTE, A. F. T. D., RAGOZO, A., & SILVA, B. F. D.. Os parasitas de ovinos. São Paulo: **Editora Unesp Digital**, 2015.

ANGELO, E. A., VILAS-BÔAS, G. T., & CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.. *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. **Semina: Ciências Agrárias (Londrina)**, 31(4), 945-958, 2010.

ASSIS-BRASIL, N. D., MARCOLONGO-PEREIRA, C., HINNAH, F. L., LADEIRA, S. R., SALLIS, E. S., GRECCO, F. B., & SCHILD, A. L.. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(4), 423-430, 2013.

BAHIRATHAN, M.; MILLER, J. E.; BARRAS, S. R.; KEARNEY, M. T. Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongyle nematode infection. **Veterinary Parasitology**, v. 65, p. 259-268, 1996.

BEGUM, A., SANDHYA, S., SYED SHAFFATH, A., VINOD, K. R., SWAPNA, R., & BANJI, D.. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta scientiarum Polonorum Technologia alimentaria**, 12(1), 61-73, 2013.

BRASIL, IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=pecuaria2014>
(acessado em 23 de fevereiro de 2016).

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA),
<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao> 2016

BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA –
IBGE <http://censo2010.ibge.gov.br/pt/noticiascenso?view=noticia&id=1&idnoticia=2857&busca=1&t=2014-pib-varia-0-1-totaliza-r-5-52-trilhoes>, 2015.

BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA –
IBGE ftp://ftp.ibge.gov.br/Contas_Nacionais/Contas_Nacionais_Trimestrais/Comentarios/pib-vol-val_201501comentarios.pdf, 2015.

BRESCIANI, K.D.S.; NASCIMENTO, A.A.; COSTA, A.J.; AMARANTE, A.F.T.;
PERRI, S.H.V.; LIMA, L.G.F. Frequência e intensidade parasitária de helmintos
gastrointestinais em bovinos abatidos em frigorífico da região noroeste do Estado de
São Paulo, SP, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 93-97, 2001.

BRICARELLO, P.A.; GENNARI, S.M.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; VAZ,
C.M.S.L.; GONÇALVES DE GONÇALVES, I.; ECHEVARRIA, F.A.M.. Worm burden
and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following
natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**. 51 75–83.
2004.

BUZZULINI, C., SILVA SOBRINHO, A. G. D., COSTA, A. J. D., SANTOS, T. R. D.,
BORGES, F. D. A., & SOARES, V. E.. Eficácia anti-helmíntica comparativa da
associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em
ovinos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 42(6), 891-895, 2007.

CERQUEIRA, M. M. O. P., SOUZA, F. N., CUNHA, A. F., PICININ, L. C. A., LEITE,
M. O., PENNA, C. F. A. M., ... & FONSECA, L. M. Detection of antimicrobial and
anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas
Gerais State-Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia**, 66(2), 621-625, 2014.

CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2083-2091, Oct. 2008.

CHAPARRO, M. A. E., CANZIANI, G. A., & FIEL, C. A.. Parasitic stage of *Ostertagia ostertagi*: A mathematical model for the livestock production region of Argentina. **Ecological Modelling**, 265, 56-63, 2013.

COOPER, K. M.; WHELAN, M.; KENNEDY, D. G.; TRIGUEROS, G.; CANNAVAN, A.; BOON, P. E.; WAPPEROM, D.; DANAHER, M.. Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. **Food Additives and Contaminants**, V. 29, n. 5, p. 746–760, 2012.

COSTA, F. S. M. Dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais de bovinos na região do vale do Mucuri, MG.. **Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**. 128 f, 2007.

DEGENKOLB, T., & VILCINSKAS, A.. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, 100(9), 3813-3824. 2016.

DERWICH E., BENZIANE Z., CHABIR R., TAOUIL R.. *In Vitro* antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 3, 3, 89-95, 2011.

DIAS DE CASTRO, L. L. ; MADRID, I. M. ; AGUIAR, C. ; CASTRO, L. M. ; CLEFF, M. ; BERNE, M. E. A. ; LEITE, F. P. L. . Potencial ovicida de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) em nematódeos gastrintestinal de bovinos. **Ciência Animal Brasileira** (Online), v. 14, p. 04, 2013.

ERZEN, N.K; KOLAR, L.; FLAJS, V.C.; KUZNER, J.; MARC, I.; POGACNIK, M. Degradation of abamectin and doramectin on sheep grazed pasture. **Ecotoxicity**, v. 14, p. 627-635, 2005.

FAWZI, E.M., et al. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. **International Parasitology**, 2014.

GAMBLE, H. R. & ZAJAC, A. M. Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. **Veterinary Parasitology**. 41: 211-225, 1992.

GASBARRE, L.C. et al. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**. 166, 281–285, 2009.

GETACHEW, T., ALEMU, B., SÖLKNER, J., GIZAW, S., HAILE, A., GOSHEME, S., & NOTTER, D. R. Relative resistance of Menz and Washera sheep breeds to artificial infection with *Haemonchus contortus* in the highlands of Ethiopia. **Tropical animal health and production**, 47(5), 961-968, 2015.

GOLDBERG, L. H. & MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**. 37, 355-358, 1977.

HOSTE, H., & TORRES-ACOSTA, J. F. J.. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, 180(1), 144-154, 2011.

IDRIS, A., MOORS, E., SOHNREY, B., & GAULY, M.. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. **Parasitology Research**, 110(4), 1453-1459, 2012.

KAMINSKY, R.; GAUVRY, N.; SCHORDERET WEBER, S.; SKRIPSKY, T.; BOUVIER, J.; WENGER, A.; SCHROEDER, F.; DESAULES, Y.; HOTZ, R.; GOEBEL, T.; HOSKING, B. C.; PAUTRAT, F.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; DUCRAY, P. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, v.103, p.931–939, 2008a.

KHAN, W. I., RICHARD, M., AKIHO, H., BLENNERHASSET, P. A., HUMPHREYS, N. E., GRENCIS, R. K., ... & COLLINS, S. M.. Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. **Infection and Immunity**, 71(5), 2430-2438, 2003.

LARA, A.P.D.S.S., LORENZON, L.B., VIANNA, A.M., SANTOS, F.D.S., PINTO, L.S., AIRES BERNE, M.E. and LEITE, F.P.L.. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*, **Parasitology**, 143(12), pp. 1665–1671. doi: 10.1017/S0031182016001451, 2016.

LEATHWICK, D. M., & BESIER, R. B.. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—strategies and experiences. **Veterinary Parasitology**, 204(1), 44-54. 2014.

Leland S.E.Jr., Drudge J.H., Wyant Z.N., Elam G.W.. Strain variation in the response of sheep nematodes to action of phenothiazine. III. Field observations. **American Journal of Veterinary Research** 18, 851-860. 1957.

MACIEL, W. G., FELIPPELLI, G., ZANETTI LOPES, W. D., PIRES TEIXEIRA, W. F., CRUZ, B. C., SANTOS, T. R. D., ... & COSTA, A. J. D.. Fauna helmintológica de ovinos provenientes da microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, 492-497, 2014.

MACKINNON, M. J., MEYER, K., & HETZEL, D. J. S.. Genetic variation and covariation for growth, parasite resistance and heat tolerance in tropical cattle. **Livestock Production Science**, 27(2-3), 105-122, 1991.

MARGALIT, J. & DEAN, D.. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.). **Journal of the American Mosquito Control Association**. 1, 1-7, 1985.

MCRAE, K. M., MCEWAN, J. C., DODDS, K. G., & GEMMELL, N. J.. Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. **BMC genomics**, 15(1), 1, 2014.

MEDEROS, A. E., RAMOS, Z., & BANCHERO, G. E.. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & vectors**, 7(1), 1. 2014.

MEJÍA, M.E. et al. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? **Veterinary Research**, v.34, p.461-467, 2003.

MOLENTO, M. B., VERÍSSIMO, C. J., AMARANTE, A. T., VAN WYK, J., CHAGAS, A. C. S., DE ARAÚJO, J. V., & BORGES, F. A.. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**., São Paulo, 80(2), 253-263, 2013.

MOREIRA, F. M. DE S.; SIQUEIRA, J. O.. Microbiologia e Bioquímica do Solo, 2ª Edição atualizada e ampliada. **Editora UFLA**. Páginas 729, 2006.

MORGAN, E. R., CHARLIER, J., HENDRICKX, G., BIGGERI, A., CATALAN, D., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., ... & SKUCE, P.. Global change and helminth infections in grazing ruminants in Europe: impacts, trends and sustainable solutions. **Agriculture**, 3(3), 484-502. 2013.

MUNN, E. A.; SMITH, T. S.; GRAHAM, M.; TAVERNOR, A. S.; GREENWOOD, C. A. The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v.23, n.2, p.261-269, 1993a.

NAKAMURA, L. K., & SWEZEY, J.. Taxonomy of *Bacillus circulans* Jordan 1890: base composition and reassociation of deoxyribonucleic acid. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 33(1), 46-52, 1983.

NERY, P. S., NOGUEIRA, F. A., MARTINS, E. R., & DUARTE, E. R.. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Veterinary Parasitology**, 171(3), 361-364, 2010.

NOQUEIRA DE MELO G.A., GRESPAN R., FONSECA T.O., SILVA E.L., ROMERO A.L., BERSANI-AMADO C.A., CUMAN R.K.. *Rosmarinus offi cinalis* L. essential oil inhibits *in vivo* and *in vitro* leukocyte migration. **Journal Medicine Food**. 14, 9, 944-946, 2011.

OKA, Y., NACAR, S., PUTIEVSKY, E., RAVID, U., YANIV, Z., & SPIEGEL, Y.. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, 90(7), 710-715, 2000.

OLIVEIRA, M. S., NASCIMENTO, M. A., CAVADOS, C. F., CHAVES, J. Q., RABINOVITCH, L., LIMA, M. M., & QUEIROZ, M.. Biological activity of *Bacillus thuringiensis* strains against larvae of the blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae). **Neotropical entomology**, 35(6), 849-852, 2006.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G., AMARANTE, A. F. T. Parasitologia animal de animais de produção. Rio de Janeiro: **Editora de Publicações Biomédicas**, 2002.

PACHECO-SILVA, E., SOUZA, J., & CALDAS, E. D.. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química nova**, 37(1), 111-122, 2014.

PENG, D., LIN, J., HUANG, Q., ZHENG, W., LIU, G., ZHENG, J., ... & SUN, M.. A Novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. **Environmental microbiology**, 2016.

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 54, p.259-268, 1994.

RICHARD, M., GRENCIS, R. K., HUMPHREYS, N. E., RENAULD, J. C., & VAN SNICK, J.. Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97(2), 767-772, 2000.

SAKONG, B. M., ADAMU, M., ELOFF, J. N., AHMED, A. S., NAIDOO, V., & MCGAW, L. J.. Pharmacological investigations of six medicinal plants used traditionally in southern Africa to treat gastrointestinal nematode infections of small ruminants. **Planta Medica**, 81(S 01), P992, 2016.

SANTOS A.C.B., SILVA M.A.P., SANTOS M.A.F. & LEITE T.R.. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 15(3):442-458, 2013.

SANTOS, P., BAPTISTA, A., LEAL, L., MOLETTA, J., & ROCHA, R. Nematódeos gastrintestinais de bovinos—revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 24, 2015.

SANTOS, T. R. D., LOPES, W. D. Z., BUZULINI, C., BORGES, F. D. A., SAKAMOTO, C. A. M., LIMA, R. C. D. A., ... & COSTA, A. J. D.. Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. **Ciência Rural**, 40(4), 934-938, 2010.

SANTOS V.T. & GONÇALVES P.C.. Verificação de estirpes de *Haemonchus contortus* resistentes ao Thiabendazole no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Faculdade. Agronomia e Veterinária UFRGS** 9:201-211, 1967/68.

SCZESNY-MORAES, EURICO A., BIANCHIN, IVO, SILVA, KARINA F. DA, CATTO, JOÃO BATISTA, HONER, MICHAEL ROBIN, & PAIVA, FERNANDO.. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(3), 229-236, 2010.

SILVA, J. B. D., RANGEL, C. P., FONSECA, A. H. D., & SOARES, J. P. G.. Gastrointestinal helminths in calves and cows in an organic milk production system. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 21(2), 87-91. 2012.

SILVA, M. E. DA, BRAGA, F. R., GIVES, P. M. D., URIOSTEGUI, M. A. M., REYES, M., SOARES, F. E. D. F., ... & ARAÚJO, J. V. D.. Efficacy of *Clonostachys rosea* and *Duddingtonia flagrans* in Reducing the *Haemonchus contortus* Infective Larvae. **BioMed Research International**, 2015.

SILVA, M. R. L., AMARANTE, M. R. V., BRESCIANI, K. D. S., & AMARANTE, A. F. T.. Host-specificity and morphometrics of female *Haemonchus contortus*, *H. placei* and *H. similis* (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle and sheep from shared pastures in São Paulo State, Brazil. **Journal of Helminthology**, 89(03), 302-306, 2015.

SINOTT, M.C.; CUNHA FILHO, N.A.; CASTRO, L.L.D.; LORENZON, L.B.; PINTO, N.B.; CAPELLA, G.A.; LEITE, F.P.L. *Bacillus* spp. Toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. **Experimental Parasitology**. 132, 103–108, [0014-4894], 2012.

SINOTT, M.C.; DIAS DE CASTRO, L.L.; LEITE, F.L.L.; T. GALLINA, M.T. DE-SOUZA, D.F.L. SANTOS AND F.P.L. LEITE. Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep. **Journal of Helminthology**, v. 1, p. 1-6, 2014.

SOBERÓN, M., MONNERAT, R., & BRAVO, A.. Mode of Action of Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis* and Resistance Mechanisms, **Microbial Toxins**. 2016.

SORGE, U. S., MOON, R. D., STROMBERG, B. E., SCHROTH, S. L., MICHELS, L., WOLFF, L. J., ... & HEINS, B. J.. Parasites and parasite management practices of organic and conventional dairy herds in Minnesota. **Journal of dairy science**, 98(5), 3143-3151. 2015.

SOUTELLO, R.G et al. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.360-364, 2007.

SPRENGER, L. K., RISOLIA, L. W., GABARDO, L. B., MOLENTO, M. B., DA SILVA, A. W. C., & DE SOUSA, R. S.. Doenças de ruminantes domésticos diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná: 1075 casos. **Archives of Veterinary Science**, 20(4), 2016.

STIVARI, T.S.S.; MONTEIRO, A.L.G.; GAMEIRO, A.H.; CHEN, R.F.F.; SILVA, C.J.A.; PAULA, E.F.E.; PRADO, O. R. Financial-economic feasibility of notweaned grazing lambs supplemented in privative trough or with pasture. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 14(3), 396-405, 2013.

STROMBERG, B. E.; GASBARRE, L. C.; WAITE, A.; BECHTOL, D. T.; BROWN, M. S.; ROBINSON, N. A.; OLSON, E. J.; NEWCOMB, H.. *Cooperia punctata*: effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 284- 291, 2012.

STROMBERG, B. E., GASBARRE, L. C., BALLWEBER, L. R., DARGATZ, D. A., RODRIGUEZ, J. M., KOPRAL, C. A., & ZARLENGA, D. S.. Prevalence of internal parasites in beef cows in the United States: Results of the National Animal Health Monitoring System's (NAHMS) beef study, 2007-2008. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 79(4), 290-295, 2015.

SUAREZ, V. H., BUSETTI, M. R., & LORENZO, R. M.. Comparative effects of nematode infection on *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred calves grazing on Argentina's Western Pampas. **Veterinary parasitology**, 58(3), 263-271, 1995.

SUTHERLAND, I. A., & LEATHWICK, D. M.. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?. **Trends in parasitology**, 27(4), 176-181, 2011.

TORRES-ACOSTA, J. F. J., MENDOZA-DE-GIVES, P., AGUILAR-CABALLERO, A. J., & CUÉLLAR-ORDAZ, J. A.. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. **Veterinary parasitology**, 189(1), 89-96, 2012.

URBAN, JR., J. F.; HU Y., MILLER M. M., SCHEIB U., YIU Y. Y., AROIAN R. V. *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B Has Potent Anthelmintic Activity against *Ascaris suum*. **PLOS Neglected Tropical Diseases** Volume 7, June e2263. doi:10.1371/journal.pntd.0002263, 2013.

WALLER, P.J. Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. In: FAO. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. Final proceedings... Rome, Italy: FAO,. **FAO Animal Production and Health Paper**. 104p, 2002.

WALLER, P. J., & THAMSBORG, S. M.. Nematode control in 'green' ruminant production systems. **Trends in parasitology**, 20(10), 493-497. 2004.

WALLER, S. B.; CLEFF, M. B.; SERRA, E. F.; SILVA, A. L.; GOMES, A. R.; DE MELLO, J. R. B.; DE FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. . Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in human and veterinary medicine. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 232-237, 2017.

WHITLEY, N. C., OH, S. H., LEE, S. J., SCHOENIAN, S., KAPLAN, R. M., STOREY, B., ... & PERDUE, M. A.. Impact of integrated gastrointestinal nematode management training for US goat and sheep producers. **Veterinary Parasitology**, 200(3), 271-275. 2014.

YOSHIHARA, E., MINHO, A. P., CARDIM, S. T., TABACOW, V. B. D., & YAMAMURA, M. H.. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of condensed tannins on gastrointestinal nematode infestations in sheep (*Ovis aries*). **Semina: Ciências Agrárias**, 35(6), 3173-3180, 2014.

ZAROS L.G., NEVES M.R.M., BENVENUTI C.L., NAVARRO A.M.C., SIDER L.H., COUTINHO L.L. & VIEIRA L.S.. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research** 113(3):1155-1161, 2014.

ZENG, L., JIN, H., LU, D., YANG, X., PAN, L., CUI, H., ... & QIN, B.. Isolation and identification of chemical constituents from the bacterium *Bacillus* sp. and their nematicidal activities. **Journal of Basic Microbiology**, 55(10), 1239-1244. 2015.

ZHENG, Z., ZHENG, J., ZHANG, Z., PENG, D., & SUN, M. Nematicidal spore-forming *Bacilli* share similar virulence factors and mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

Anexos



Pelotas, 18 de dezembro de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Professor Fábio Pereira Leivas Leite

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: "**Avaliação de toxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em nematódeos de importância Médico Veterinário**", processo nº23110.009118/2012-01, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitação: 32 ovinos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer e assiná-lo, reenviar o processo à CEEA. Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9118).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

COCEPE OK

Ciente em: 22 / 01 / 2013

Assinatura do Professor Responsável:

Fábio Pereira Leivas Leite
Médico Veterinário Ph.D.
CRMV-RS 2627 CPF 207326600-25