

**Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Cuminum cyminum* contra
Haemonchus contortus de ovinos**

**In vitro activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* against
Haemonchus contortus of sheep**

DOI:10.34117/bjdv7n5-025

Recebimento dos originais: 07/04/2021

Aceitação para publicação: 03/05/2021

Leonardo Mortagua de Castro

Doutorado em Veterinária

Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia, CEP
96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil

E-mail: leonardomortagua@gmail.com

Natália Berne Pinto

Doutorado em Parasitologia

Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia, CEP
96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil

E-mail: nbernevet@gmail.com

Micaele Quintana de Moura

Pós-Doutorado em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia, CEP
96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil

E-mail: micaele_m@yahoo.com.br

Rogério Antonio Freitag

Doutorado em Química

Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Química e
Geociências, CEP 96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil

E-mail: rafreitag@gmail.com

Gabriela de Almeida Capella

Mestrado em Veterinária

Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia, CEP
96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil

E-mail: gabicapella@gmail.com

Tairan Ourique Motta

Graduado em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia, CEP
96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil
E-mail: tairanourique@gmail.com

Marcos Marreiro Villela

Doutorado em Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia, CEP
96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil
E-mail: marcosmvillela@bol.com.br

Maria Elisabeth Aires Berne

Doutorado em Parasitologia
Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia, CEP
96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil
E-mail: bernemea@gmail.com

RESUMO

A maior dificuldade encontrada por criadores de ovinos é o controle dos nematódeos gastrintestinais, estes constituem uma das principais causas de perdas na produção. A utilização intensa, há décadas, de anti-helmínticos, induziu a instalação de resistência a praticamente todos os princípios ativos disponíveis. Existe a necessidade de novas propostas de controle, visando isto, o objetivo deste estudo foi avaliar o óleo essencial de *Cuminum cyminum*, *in vitro*, contra ovos, larvas de primeiro estágio e larvas de terceiro estágio de *Haemonchus contortus*, descrever os principais constituintes e a CI 50. O óleo foi extraído de sementes através do aparelho de clewenger e para determinar os principais constituintes foi realizada a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os ovos e larvas foram obtidos através da coleta de fezes de ovinos infectados. Foram realizados os testes de inibição da eclosão de ovos, inibição da migração larval e inibição do desenvolvimento larval. As concentrações utilizadas do óleo foram: 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58 mg/mL, todos os testes acompanhados de controle positivo anti-helmíntico comercial, controle negativo água destilada e controle com tween. Os resultados obtidos na maior concentração do óleo (9,4mg/mL) foram de 98,62% para inibição da eclosão, 69,12% para inibição do desenvolvimento e 23,45% para inibição da migração. Podemos concluir que o óleo essencial apresentou resultados promissores, que podem acrescentar futuramente no controle destes parasitos.

Palavras-chave: parasitose, cominho, anti-helmíntico, plantas, bioprospecção.

ABSTRACT

The greatest difficulty found by sheep farmers is the control of gastrointestinal nematodes, which are one of the main causes of production losses. The intense use of anthelmintics for decades has led to the installation of resistance to practically all available active principles. The objective of this study was to evaluate the essential oil of *Cuminum cyminum* *in vitro* against eggs, first stage larvae and third stage larvae of *Haemonchus contortus*, to describe the main constituents, CI 50 and the degree of cytotoxicity of the oil to the MDBK cells. The oil was extracted from seeds through the clewenger apparatus and to determine the main constituents was performed the gas

chromatography coupled to mass spectrometry. Eggs and larvae were obtained by collecting feces from infected sheep. Egg hatching inhibition tests, inhibition of larval migration and inhibition of larval development were performed. The used concentrations of the oil were: 9.4; 4.7; 2.35; 1.17; 0.58 mg / mL, all tests followed by commercial anthelmintic positive control, negative control distilled water and control with tween. The results obtained in the highest oil concentration (9.4 mg / mL) were 98.62% for hatching inhibition, 69.12% for inhibition of development and 23.45% for inhibition of migration. We can conclude that the essential oil presented promising results, which may add in the future control of these parasites.

Keywords: parasitosis, cumin, anthelmintic, plants, bioprospecting.

1 INTRODUÇÃO

Os nematódeos gastrintestinais são conhecidos mundialmente como os maiores determinantes de prejuízo econômico na produção de pequenos ruminantes (COOP&KYRIAZAKIS 2001; CALVETE et al., 2014), sendo o nematódeo *Haemonchus contortus*, parasito hematófago, a principal espécie que acomete ovinos. (AMARANTE et al., 1992; KUMARASINGHA et al., 2016),

O controle destes parasitos se fundamenta na utilização de anti-helmínticos comerciais, aos quais, devido ao uso intenso já não possuem a ação esperada, com uma ampla presença de resistência a estes fármacos em rebanhos ovinos (Ramos et al., 2002). Este problema encontrado no controle dos nematódeos gastrintestinais de ovinos, aliados a exigência cada vez maior de produzir produtos sem resíduos químicos, mostra a necessidade de novas alternativas a serem incorporadas contra estes parasitos. Dentre essas novas alternativas, destacam-se os estudos com fitoterápicos (de Faria et al., 2021) e dentre estes os óleos essenciais (O.E.), que são produtos do metabolismo secundário e caracterizando-se por misturas complexas, derivados terpenóides, sendo os monoterpenos, os sesquiterpenos, os principais compostos responsáveis pelas atividades biológicas destes óleos (SANTOS, 2010). (MARTINEZ - VELASQUEZ et al., 2012).

Estudos com óleos essenciais de diferentes plantas têm indicado atividades anti-helmínticas sobre distintas fases de desenvolvimento de *H. contortus*, como frente ao *Rosmarinus officinalis* (PINTO et al., 2019), *Opuntia ficus-indica* (FÉBOLI et al., 2016); *Eucalyptus globulus* (MACEDO et al., 2009); *Ocimum basilicum* (CASTRO et al., 2017) e *Melaleuca alternifolia* (GRANDO et al., 2016). Entretanto, na literatura investigada não há registro de atividade nematicida de O.E de *C. cyminum* contra *H. contortus*.

A planta *Cuminum cyminum* pertence à família Apiaceae (Umbelíferas) de caule e ramos estriados, que apresentam folhas alternas, verde-escuras e flores alvas em umbrelas terminais. Os seus frutos também são denominados de sementes (frutos secos contendo a semente), com aproximadamente meio centímetro de comprimento de coloração cinza-amarelados e cobertos por uma fina penugem de onde é extraído o óleo essencial (VIEIRA, 1992). O óleo essencial de *C. cyminum* possui atividade biológica com ação sobre bactérias, fungos, insetos e ácaros (LACOBELLIS et al., 2002; MOHAMMADPOUR et al. 2012; HWA-JEONG et al., 2012; VILLARREAL et al., 2017), respectivamente. Estes resultados motivaram o desenvolvimento deste estudo, que teve como objetivo avaliar a ação *in vitro* do óleo essencial de *C. cyminum* sobre ovos e larvas de *H. contortus*, bem como determinar seus principais constituintes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

Foram utilizadas no experimento, sementes de *Cuminum cyminum* (cominho), adquirida de distribuidor comercial (Luar Sul®) com certificação de qualidade e origem. As sementes foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger, durante 4h. Após, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro P.A., armazenado em frasco âmbar e mantido a -18°C até a utilização. Foi realizada a análise química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

OBTENÇÃO DOS OVOS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS

Ovinos infectados, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, foram utilizados para coleta de fezes diretamente da ampola retal destes animais. Foi quantificada a infecção parasitária com a utilização da técnica de Gordon & Whitlock (1939). Amostras de fezes acima de 2000 ovos por grama de fezes foram processadas para separação dos ovos das sujidades do material fecal através da técnica de Hubert e Kerboeuf (1992), com modificações.

OBTENÇÃO DE LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS

Para a realização do teste de desenvolvimento larval foram utilizadas larvas de primeiro estágio (L1), as quais foram recuperadas a partir da incubação por 24h em estufa B.O.D com temperatura de 28°C e umidade relativa de 80%, dos ovos obtidos nas

amostras positivas. Já no teste de inibição da migração larval foram utilizadas L3, obtidas através da técnica de Roberts e O'Sullivan (1950).

TESTE DE INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE

Foi realizado através da metodologia descrita por Coles et al. (1992), utilizando placas de microcultivo de 24 poços. Aproximadamente 150 de ovos foram adicionados em cada poço, juntamente com o O.E. de *C. cyminum*, nas concentrações (9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58 mg/mL), controle negativo foi água destilada, controle positivo Tiabendazol 0,025 mg/mL e o controle com Tween 80 (1% da solução final), para emulsificação do óleo nas diferentes diluições. Após 48 horas foi realizada a contagem de ovos e larvas, para isso foi acrescentado Lugol com o objetivo de interromper a eclosão. Todos os tratamentos foram realizados em 4 repetições. As médias da inibição da eclodibilidade foram determinadas conforme a equação descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007): % de Inibição da Eclodibilidade = número de larvas / número de larvas mais número de ovos X 100.

TESTE DE INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO LARVAL

Realizado conforme descrito por Roberts e O'Sullivan (1950) com modificações. Uma alíquota de 1 mL, contendo aproximadamente 250 L1, foi incubada durante seis dias com 2 g de fezes provenientes de um animal livre de nematoides gastrintestinais, juntamente com 1 mL do O.E. de *C. cyminum* nas concentrações de 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58 mg/mL. O controle negativo foi constituído pela cultura tratada com água destilada, controle com Tween 80 (1% da solução final) e o positivo por 0,02 mg/mL de Levamisol, todos em quatro repetições. A contagem das larvas de 3º estágio foi realizada após coleta das larvas da cultura, acrescido de Lugol, seguindo-se a visualização ao microscópio invertido. O percentual de inibição foi dado através da seguinte fórmula: % de inibição do desenvolvimento larval = (número de larvas no controle – número de larvas no tratamento) / número de larvas no controle) x 100.

TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAL

Primeiramente, larvas de 3º estágio de *H. contortus* viáveis foram colocadas em contato com solução de hipoclorito de sódio 0,6%, por aproximadamente 20min, para que houvesse o desembainhamento das larvas. Seguindo-se três lavagens através de centrifugação, a 3000rpm por 2min com água destilada e a adequação final para

concentração de 150 larvas em 100µL. Após, foram adicionadas, em placas de cultura de polietileno de 24 orifícios, 900µL do óleo essencial nas concentrações de 9,4; 4,7; 2,35; 1,17; 0,58 mg/mL, e mantidas por 24 horas em estufa a 28 °C. Foram utilizados controle negativo com água destilada, controle com Tween 80 (1% da solução final) e como positivo por 0,02 mg/mL de Levamisol. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço contendo L3 foi transferido para tamises com malha de abertura de 25µm e acondicionadas novamente em estufa a 28 °C por 24 horas. Após este período os tamises foram removidos e lavados com água destilada para retirar o conteúdo retido, seguindo-se a contagem em microscópio invertido das larvas que migraram e das larvas que ficaram retidas nos tamises. As médias de inibição da migração larval para cada tratamento foram calculadas através da equação: % inibição da migração larval = Número de larvas que não migraram / (Número de larvas que não migraram + Número de larvas que migraram) X 100.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística foi utilizado o software Statistix 9.0, ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Além disso, foi determinada a concentração inibitória 50 (CI50), concentração capaz de inibir 50% da eclosão, migração e desenvolvimento larval, foi determinada a partir da curva dose-resposta. Com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa GraphPad Prism para Windows, versão 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de plantas, como uma alternativa para o tratamento de nematódeos gastrintestinais de ovinos vem sendo relatado em diferentes regiões do mundo (RAJESWARI, 2014).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter de 20 a 60 compostos em diferentes concentrações, entretanto, geralmente os componentes majoritários podem determinar a ação biológica do óleo (SINTIM et al., 2015). A atividade anti-helmíntica de diferentes extratos de plantas em nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes tem sido relatada (GITHIORI et al., 2006; MACIEL et al., 2016; EGUALE & GIDAY, 2009 MORENO-GONZALO et al., 2013; ENGSTRÖM et al., 2016) Contudo, esta ação depende dos constituintes presentes na planta, os quais diferem conforme a família botânica da planta, proveniência, parte da planta, fase de crescimento.

A composição química foi verificada através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa do O.E. e mostrou como principal constituinte o Cumaldehyde, representando 27,39% (Tabela 1).

Tabela1: Constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *Cuminum cyminum* obtidos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Compostos	%
Beta pinene	10,75
Cymene	5,56
Gamma-terpinem	15,24
Cumaldehyde	27,39
2-Caren-10-al	3,76
1-Phenyl-1-butanol	19,47

No presente estudo, o óleo essencial dos frutos de *C. cyminum* mostrou rendimento de 2,5%, semelhante ao verificado por Chaudhry et al. (2012) e Rana et al. (2014), que obtiveram rendimento de 3%. Tendo como principal constituinte o cumaldehyde (27,39%), também relatado por, Hajlaoui et al. (2010), Wanner et al., (2010), Chaudhry et al., (2012) e Rihawy et al. (2014).

A eficácia do óleo essencial de *C. cyminum* nas diferentes metodologias utilizadas está apresentada na Tabela 2, sendo o teste de inibição da eclosão o que apresentou melhores resultados, com 98,62% de eficácia na concentração de 9,4 mg/mL, não diferindo estatisticamente do controle com anti-helmíntico.

Tabela 2: Porcentagem de eficácia do óleo essencial de *Cuminum cyminum* sobre ovos e larvas (L1 e L3) de *Haemonchus contortus*.

Tratamento	Inibição da eclosão	Inibição do desenvolvimento	Inibição da migração
Água	3,4 ^c	0 ^a	6,3 ^{bc}
Tween	7,05 ^c	2,12 ^a	10,8 ^{bc}
Anti-helmíntico	100 ^a	99,50 ^d	82,05 ^a
9,4 mg/mL	98,62 ^a	69,12 ^{bc}	23,45 ^b
4,7 mg/mL	94,27 ^b	54,57 ^{ab}	17,25 ^{bc}
2,35 mg/mL	97,22 ^{ab}	49,50 ^{bc}	15,55 ^{bc}
1,17 mg/mL	94,67 ^b	21,56 ^{ab}	11,1 ^{bc}
0,58 mg/mL	93,95 ^b	4,90 ^a	10,8 ^{bc}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (P < 0.05).

Neste estudo foi avaliada a ação anti-helmíntica in vitro do óleo essencial de *C. cyminum* sobre ovos e larvas de *H. contortus*, verificou-se que, independente da concentração do O.E, sua ação sempre foi maior sobre os ovos (98,62%), seguindo-se pelas larvas de primeiro (L1) (69,12%) e de terceiro estágio (L3) (23,45%). Provavelmente a maior atividade sobre os ovos esteja relacionada à constituição das

camadas que envolvem estes, a qual pode apresentar menor barreira à ação de seus constituintes. Do mesmo modo, Castro et al.(2017) encontraram resultados semelhantes ao deste estudo na inibição da eclosão dos ovos, quando utilizaram o óleo essencial de *Ocimum basilicum* que mostrou ação sobre os ovos em todas as concentrações avaliadas (0,25 mg/mL a 32 mg/mL). Também, Grando et al. (2015), ao testarem o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* obtiveram 100% no teste da inibição da eclosão, já na avaliação sobre a inibição da migração de larvas, alcançaram 88% de atividade somente na concentração de 56 mg/mL. Estes resultados indicam que, provavelmente, o O.E. de *C. cyminum* em maiores concentrações obteria maiores percentagens de inibição do desenvolvimento e da migração larval.

Os estudos da avaliação do O.E. de *C. cyminum* também mostraram resultados promissores sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com 100% de mortalidade de larvas em concentrações semelhantes a utilizadas no presente estudo, 20%, 10%, 5%, 2.5% e 1.25% (MARTINEZ VELAZQUEZ et al., 2011). Entretanto, este mesmo óleo quando avaliado em fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, somente obteve 100% de mortalidade na concentração de 200mg/mL (VILLARREAL et al., 2017). É provável que as fases mais desenvolvidas do parasito tenham maior capacidade de resistir as adversidades, o que leva a necessitarem de maiores concentrações do óleo para serem mortas. Embora, sejam grupos de parasitos distintos, a menor eficácia mostrada no presente estudo, frente às larvas infectantes de *H. contortus*, por estas apresentarem externamente uma cutícula mais complexa que dificulte a penetração dos compostos ativos do O.E. de *C. cyminum*.

A concentração inibitória 50% (CI 50%), que representa a dose do óleo essencial de *C. cyminum* capaz de inibir 50% dos parasitos, também foi um resultado obtido neste estudo, apresentando a necessidade de 0,0012 mg/mL sobre a inibição da eclodibilidade, 3,70 mg/mL para Inibição do desenvolvimento e 104,34 mg/mL para inibição da migração larval. A eficiência do óleo essencial é comprovada quando é comparada com outros estudos, como Castro (2017) que obteve bons resultados com *O. basilicum*, mas a CI50 para inibição da eclodibilidade (2123 mg/mL), uma dose 176 vezes maior do que a apresentada neste estudo, demonstrando o potencial anti-helmíntico do óleo essencial.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, mostram que óleo essencial de *C. cyminum* apresenta ação anti-helmíntica, sobretudo na inibição da eclosão dos ovos de *H. contortus*, estes dados são importantes, pois demonstram que o óleo essencial de *C. cyminum* e seus derivados, com o prosseguimento dos estudos *in vivo*, podem vir a ser utilizados no controle dos nematódeos gastrintestinais de ovinos.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G.; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 29: 31-38, 1992.

CALVETE, C.; FERRER, L. M.; LACASTA, D.; CALAVIA, R.; RAMOS, J. J.; RUIZ-DE-ARCAUTE, M.; URIARTE, J. Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. **Veterinary Parasitology**.16; 203(1-2):102-13. 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.002. Epub 2014 Mar 13.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T.; MACEDO, I. T.; OLIVEIRA, L. M.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3-4, p.288-294, 2007.

CASTRO, L. M; PINTO, N. B; MOTA, T. O; MOURA, M. Q; DIAS DE CASTRO, L. L; MADRID, I. M; FREITAG, R. A; BERNE, M. E. A. ATIVIDADE OVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Ocimum basilicum* SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS. **Science And Animal Health**. V.5 N.2 MAIO/AGO 2017 P. 138-150

CHAUDHRY AH, TANVEER A, SHAR A, AKHTAR, MS, SHAHID, MK, ASHFAQ KM, MALIK TA, SIDDIQUI RH. Physicochemical investigation and antimicrobial activity of essential oil of *Cuminum cyminum* L. **World Applied Sciences Journal** .19:330-333, 2012.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. 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.
COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **Trends in Parasitology**. 17 (7), 325–330, 2001.

DE FARIA, P. H. A.; LIMA FILHO, A. C. M.; GONÇALVES, C. A.; DE CARVALHO, F. S.; GALVÃO, G. M.; MARTINS, T. R. M.; ... & MACHADO, A. S. (2021). Fitoterápicos com potencial de ação antiparasitária presentes na baixada maranhense. **Brazilian Journal of Development**, 7(3), 27361-27376, 2021.

EGUALE, T.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*. **International Journal of Green Pharmacy**. 3(1): 29- 34. 2009. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-8258.49371>

ENGSTRÖM, M.T.; KARONEN, M.; AHERN, J. R.; BAERT, N.; PAYRÉ, B.; HOSTE, H.; SALMINEN, J. P. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching motility of *Haemonchus contortus* Nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 64, 840–851. 2016.

FÉBOLI, A.; LAURENTIZ, A. C.; SOARES, S. C.; AUGUSTO, J. G.; ANJOS, L. A.; MAGALHÃES, L. G.; FILARDI, R. S.; LAURENTIZ, R. S. Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**. 226:65-68. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.030>

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSDORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**. 139(4): 308-20, 2006. PMID:16725262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

GRANDO, T.H; AS, M.F; BALDISSERA, M.D; OLIVEIRA, C.B; SOUZA, M.E;RAFFI, 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** (2016) 90, 377–382 doi:10.1017/S0022149X15000401

HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; TRABELSI, N.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: a high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. **Food and Chemical Toxicology**; 48(8/9): 2186-2192, 2010.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D.A. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Research**, v.130, n.20, p.442-446, 1992.

KUMARASINGHA, R.; PRESTON, S.; YEO, T. C.; LIM, D. S. L.; TU, C. L.; PALOMBO, E. A.; SHAW, J. M.; GASSER, R. B.; BOAG, P. R. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, V9, P. 187-193, 2016.

LACOBELLIS, N. S.; CANTORE, P. L.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53:57-61, 2005.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇAVASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Atividade ovicida e larvicida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 18, 62–66. 2009.

MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇAVASCONCELOS, A. L. F.; COSTA, C. T. C.; CASTRO, C. M. S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. 140(1-2): 98-104. PMID:16621294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.007>. 2006.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; CASTILLO-HERRERA, G. A.; ROSARIO-CRUZ, R.; FLORES-FERNANDEZ, J. M.; LOPEZ-RAMIREZ, J.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; LUGO-CERVANTES, E. C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**.2011; 108(2): 481-487. PMID:20865426. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2069-6>.

MOHAMMADPOUR, H.; MOGHIMIPOUR, E.; RASOOLI, I.; FAKOOR, H. M.; ASTANEH, S. A.; MOOSAIE, S. S.; JALILI, Z. Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum* L. essential oil From Alborz Mountain against *Aspergillus* species. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**; 7:50-55, 2012.

MORENO-GONZALO, J.; MANOLARAKI, F.; FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; CELAYA, R.; OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L. M.; HOSTE, H.; FERRE, I. In vitro effect of heather (Ericaceae) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. 197, 235–243. 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

PINTO, N. B.; CASTRO, L. M. D.; AZAMBUJA, R. H. M.; CAPELLA, G. D. A.; MOURA, M. Q. D.; TERTO, W. D.; ... & LEITE, F. P. L.. Ovicidal and larvicidal potential of *Rosmarinus officinalis* to control gastrointestinal nematodes of sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 28(4), 807-811, 2019.

RAJESWARI, V. D. Anthelmintic activity of plants: a review. **Research Journal of Phytochemistry**.8, 57–63. 2014.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Ciência Rural**, v. 32, n.3, 2002.

RANA, V. S.; Chemical Composition of the Essential Oil of *Cuminum cyminum* L. Seeds from Western India. **Journal of Medicinal Plants and By-products**, 2 : 207-210, 2014.

RIHAWY, M. S.; BAKRAJI, E. H.; ODEH, A. PIXE and GC-MS investigation for the determination of the chemical composition of Syrian *Cuminum cyminum* L. **Applied Radiation and Isotopes**; 86:118-125 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 of Agricultural Research**, v.1, p.99-102, 1950.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.;P. MOYNA, P. Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sull. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, p. 154–159, 2010.

SINTIM, H. Y.; BURKHARDT, A.; GAWDE, A.; CANTRELL, C. L.; ASTATKIE, T.; OBOUR, A. E.; ZHELJAZKOV, V. D.; SCHLEGEL, V. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. **Industrial Crops and Products**, v. 63, n. 9, p. 190-196, 2015.

VIEIRA, L. S. Cominho. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das plantas Mediciniais** (A Farmácia de Deus). 2ª ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres L.T.D.A., 1992. 120 p.

VILLARREAL J. P. V.; SANTOS, P. R.; SILVA, M. A. M. P.; AZAMBUJA, R. H. M.; GONÇALVES, C. L.; ESCAREÑO, J. J. H.; SANTOS, T. R. B.; PEREIRA, C. M. P.; FREITAG, R. A.; SILVA NASCENTE, P. S. Evaluation of phytotherapy alternatives for controlling *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in vitro, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 299-306, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017052>

WANNER, J.; BAIL, S.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; GOCHEV, V.; GIROVA, T.; ATANASOVA, T.; STOYANOVA, A. Chemical composition and antimicrobial activity of cumin oil (*Cuminum cyminum*, Apiaceae). **Natural Product Communications**; 5(9): 1355-1358, 2010.

YEOM, H. J.; KANG, J. S.; KIM, G. H.; PARK, I. K. Insecticidal and Acetylcholine Esterase Inhibition Activity of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against Adults of German Cockroach (*Blattella germanica*) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., 2012, 60 (29), pp 7194–7203 DOI: 10.1021/jf302009w