



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO-UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS-CCAA
CURSO: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



ELINALVA DA SILVA MORAES

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* E MONOTERPENO CARVACROL EM OOCISTOS DE *EIMERIA* SPP.
ISOLADAS DE PEQUENOS RUMINANTES**

CHAPADINHA-MA

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

da Silva Moraes, Elinalva.

Identificação de espécies e avaliação do óleo essencial de *Lippia gracilis* e monoterpeno carvacrol em oocistos de *Eimeria* spp. de pequenos ruminantes / Elinalva da Silva Moraes. - 2017.

42 f.

Orientador(a): Ivo Alexandre Leme da Cunha.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha-MA, 2017.

1. Baixo Parnaíba. 2. Compostos bioativos. 3. Eimeriose. 4. Resistência. I. Leme da Cunha, Ivo Alexandre. II. Título.

ELINALVA DA SILVA MORAES

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* E MONOTERPENO CARVACROL EM OOCISTOS DE *EIMERIA* SPP. ISOLADAS DE PEQUENOS RUMINANTES

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Bacharel/Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha

**CHAPADINHA-MA
2017**

ELINALVA DA SILVA MORAES

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* E MONOTERPENO CARVACROL EM OOCISTOS DE *EIMERIA* SPP.
ISOLADAS DE PEQUENOS RUMINANTES**

Aprovada em: 02/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha
Universidade Federal do Maranhão-UFMA
Orientador

Msc. Aldilene da Silva Lima
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Cláudio Gonçalves da Silva
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Aos meus pais José Abreu, Maria das Graças e Satílio
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso Criador dos céus, Terra, Mar e tudo o que neles há. Ao seu Filho Jesus Cristo, que deu sua vida por nós, e pelo Espírito Santo, que mantêm toda a criação.

Aos meus pais, José Costa de Abreu, Maria das Graças Araújo de Abreu e Satílio José Bezerra Moraes, por sempre estarem do sempre meu lado e principalmente durante estes quatro anos da minha graduação, me aconselhando e incentivando a nunca desistir dos meus objetivos. Amores da minha vida!

As meus irmãos Hélio Abreu, Léo Abreu, Josenildo Abreu que mesmo estando longe sempre me ajudou com incentivo. A minha irmã Eliane Araújo de Abreu, meu cunhado Antônio José e minhas sobrinhas Thaynara Carvalho e Tamyres Carvalho, a esta família que não mediu esforços para me acolher durante quase nove anos em que moro com eles. Amo muito vocês!

Ao meu orientador professor Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha pelo apoio, conselhos, oportunidades e pelo ensino a mim dado.

Ao professor Dr. Lívio Martins Costa Júnior em permitir que fizesse parte do seu grupo de pesquisa e pelas as primeiras oportunidades a mim concedidas.

Ao professor Dr. Cláudio Gonçalves da Silva por aceitar o convite para participar da banca.

Aos meus colegas de laboratório: Yara, Lavínia, Helena, Arlan, Aline, José Gracione e principalmente a Nathalie Silva que não mediu esforços para me ajudar nos trabalhos do laboratório quando eu estava precisando e por ficar até mais tarde no laboratório comigo, pela amizade. De forma especial, quero agradecer à Msc. Aldilene Silva Lima por quem tenho uma admiração e com quem tive a oportunidade de trabalhar no meu primeiro projeto de Iniciação Científica. Muito obrigada pela paciência e dedicação.

As minhas amigas lindas que conquistei durante a graduação Flávia Zizeth, Norma Mesquita, Jéssica Garreto, Vanda Santos, e Raissa Costa, pela a amizade e por todas confraternizações em que tivemos, que por sinal foram inesquecíveis.

A minha amiga Karoline Oliveira pela amizade, carinho e pelo o acolhimento na sua casa em São Luís nas várias vezes em que estava a trabalhar na faculdade.

Aos meus dois grandes amigos Romério Rodrigues e Ivanilda Pereira por toda a amizade verdadeira que conquistamos. Romério, por ser uma pessoa maravilhosa, inteligente, conselheiro e por não medir esforços em me ajudar em todos os momentos em que precisei, pelo o apoio constante, por me fazer sorrir em momentos em que não merecia sorrisos, por me fazer chorar quando era preciso, e por me acompanhar em todos os momentos da minha vida e não diferente nesta última etapa da minha graduação. Ivanilda, amiga linda em que tenho uma pura admiração por ser uma pessoa dedicada no que faz, pelo caráter e bondade, pelo o total apoio e conselhos, pelos os momentos em que sempre esteve ao meu lado, sei que sempre posso contar com você. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Ezequias, que sempre esteve ao meu lado, pelo o amor e por compreender minha ausência nessa etapa importante da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA por todo o apoio financeiro e ao FINEP por todo amparo para realização desse trabalho.

Muito obrigada!

Isso é bom e agradável perante Deus, o nosso salvador que deseja que todos os homens sejam salvos e cheguem ao conhecimento da verdade.

1 Timóteo 2.3-4.

RESUMO

A Eimeriose é um dos principais problemas para a caprinocultura. O controle deste parasito é feito com produtos sintéticos adquiridos comercialmente, o seu uso constante e inadequado pode ocasionar contaminação da carne e do leite, além de acelerar uma resistência a estes parasitos. Compostos bioativos de plantas pode ser uma alternativa para o controle deste parasito. Tendo em vista trabalhos relacionados a extratos vegetais para o controle de *Eimeria*, este trabalho teve por objetivos, a identificação de espécies e avaliação do efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* e monoterpene carvacrol em oocistos de *Eimeria* spp. isolados de pequenos ruminantes. Diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia gracilis* (10; 7,0; 4,9; 3,43; 2,40; 1,68; 1,17 e 0,82 mg/ml) e do monoterpene carvacrol foram testadas (2,4; 1,2; 0,6; e 0,1 mg/ml) em oocistos de *Eimeria* spp. no intuito de determinar as concentrações letal e de inibição na esporulação para oocistos. Além dos testes de inibição da esporulação e destruição dos oocistos, houve previamente a identificação das espécies de *Eimeria* spp. prevalentes em pequenos ruminantes. Desse modo, este estudo fornece dados importantes relacionados a *Eimeria* spp. de pequenos ruminantes, bem como testar produtos naturais que venham a contribuir para o controle deste parasito. Das amostras analisadas neste trabalho, foram identificadas oito espécies de *Eimeria* spp. em pequenos ruminantes. Em relação a análise da destruição dos oocistos, o óleo de *Lippia gracilis* demonstrou a sua eficiência com a concentração letal de 4,56 mg/ml. O monoterpene carvacrol testado na inibição dos oocistos, demonstrou sua atividade coccidicida na concentração inibitória de 0,42 mg/ml. Desta maneira, o presente estudo comprovou que ação do óleo essencial e monoterpene sobre oocistos de *Eimeria* spp. isoladas de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: Eimeriose; Resistência; Baixo Parnaíba; Compostos bioativos.

ABSTRACT

Eimeriosis is one of the main problems for goat breeding. The control of this parasite is made with commercially acquired synthetic products, its constant and inadequate use can cause contamination of meat and milk, besides accelerating the resistance to these parasites. Bioactive plant compounds may be an alternative to the control of this parasite. The objective of this work was to identify species and evaluate the effect of the essential oil of *Lippia gracilis* and monoterpeno carvacrol on *Eimeria* spp. Oocysts. Isolated from small ruminants. Different concentrations of *Lippia gracilis* essential oil (10, 7.0, 4.9, 3.43, 2.40, 1.68, 1.17 and 0.82 mg/ml) and monoterpene carvacrol were tested (2, 4, 1.2, 0.6, and 0.1 mg ml) in oocysts of *Eimeria* spp. In order to determine lethal and inhibitory concentrations in oocyst sporulation. In addition to the tests for inhibition of sporulation and destruction of oocysts, the species of *Eimeria* spp. Prevalent in small ruminants. Thus, this study provides important data related to *Eimeria* spp. Of small ruminants, as well as to natural test products that will contribute to the control of this parasite. From the samples analyzed in this work, eight species of *Eimeria* spp. In small ruminants. Regarding the analysis of oocyst destruction, *Lippia gracilis* oil demonstrated its efficiency with a concentration of 4.56 mg / ml. The monoterpene carvacrol tested on inhibition of oocysts, demonstrated its coccidioid activity at the inhibitory concentration of 0.42 mg/ml. In this way, the present study proved that the action of essential oil and monoterpene on oocysts of *Eimeria* spp. Isolated from small ruminants.

Key words: Eimeriosis; Resistance; Low Parnaíba; Bioactive compounds.

LISTA DE QUADRO

pág.

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Espécies de extratos vegetais analisados em ensaios para o controle de coccídios gastrointestinais..... | 19 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

pág.

Tabela 1. Identificação dos principais componentes químicos presentes no genótipo 201 do óleo essencial de *Lippia gracilis*.....28

Tabela 2. Concentrações letais (50%) para óleo essencial de *L. gracilis* e Carvacrol para oocistos de *Eimeria* spp, com intervalo de confiança de 95%.....29

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Estrutura molecular (a) timol e (b) carvacrol (PEIXOTO-NEVES et al., 2010)....22

Figura 2. Efeito das concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* no número de oocistos.....29

Figura 3. Efeito das concentrações de Carvacrol na inibição dos oocistos de *Eimeria* spp.....32

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 Caprinocultura | 15 |
| 2.2 <i>Eimeria</i> spp. | 15 |
| 2.3 Ciclo biológico..... | 17 |
| 2.4 Formas de controle..... | 18 |
| 2.5 Controle alternativo | 19 |
| 2.6 Óleos essenciais e monoterpenos..... | 21 |
| 2.7 Características gerais timol e carvacrol | 22 |
| 3. OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 Geral..... | 23 |
| 3.2 Específicos | 23 |
| 4. METODOLOGIA | 23 |
| 4.1 Obtenção e análise dos óleos essenciais | 23 |
| 4.2 Obtenção dos oocistos de <i>Eimeria</i> spp. | 24 |
| 4.3 Análise qualitativa e quantitativa das amostras | 24 |
| 4.4 Isolamento de oocisto de <i>Eimeria</i> spp. | 24 |
| 4.5 Identificações dos oocistos isolados | 25 |
| 4.6 Testes <i>in vitro</i> | 25 |
| 4.7 Análise da destruição dos oocistos de <i>Eimeria</i> spp. | 25 |
| 4.8 Análise da inibição da esporulação dos oocistos de <i>Eimeria</i> spp..... | 26 |
| 4.9 Análise estatística dos testes <i>in vitro</i> | 26 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 6 CONCLUSÃO | 33 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a caprinocultura é uma atividade de grande importância econômica devido à exportação de carne com alto teor de proteínas e leite nutritivo (AMANCIO & PEREIRA, 2014) e esta atividade ocorre principalmente no Nordeste do Brasil onde estão concentrados 91% do rebanho caprino, devido à oferta de alimentos e o clima favorável aos pequenos ruminantes (IBGE, 2011).

No entanto, as endoparasitoses gastrointestinais, destacando o gênero *Eimeria* spp. sendo responsável por perdas na produção e mortalidade no rebanho de caprinos e ovinos vem se destacando como um dos principais desafios a produção (VIEIRA, 2005). Protozoários do gênero *Eimeria* spp. ao infectar o hospedeiro, provoca alterações gastrointestinais, diminuição do apetite e redução no ganho de peso (VIEIRA, 2000; LIMA, 2004) limitando a produtividade e exigindo medidas de controle urgentes, uma vez que determinam prejuízos econômicos que se refletem, principalmente, no aumento de índice de mortalidade entre animais jovens (VIEIRA, 1996) devido às infecções subclínicas responsáveis por atrasos no crescimento e maus desempenhos produtivos.

A principal forma de tratamento dos animais infectados é realizada com medicamentos coccidiostáticos, porém o uso constante e inadequado dessas drogas podem ter efeitos indesejáveis, como resíduos da droga no animal, na carne e no leite e uma possível resistência do protozoário aos coccidiostáticos (MC EVOY, 2002; PEEK & LANDMAN, 2003). Sendo assim, estudos que visam buscar alternativas de controle são cruciais, a fim de buscar novos compostos que apresentem efeito anticoccídicos sobre protozoários gastrintestinais e consequentemente minimizar os prejuízos econômicos.

A utilização de compostos bioativos pode se tornar uma alternativa eficiente no controle de *Eimeria* spp. e outros parasitos. O uso de plantas do gênero *Lippia* spp. pode ser uma alternativa economicamente viável devido ao potencial dos constituintes bioativos presentes e baixa toxicidade (SOARES & DIAS, 2013). *Lippia gracilis* conhecida popularmente como alecrim-da-chapada onde em suas folhas e flores aromáticas são extraídos óleos essenciais (PASCUAL et al., 2001) sendo destacados os principais compostos: Carvacrol (48%) e Timol (59,26%) os quais estão presente, no óleo essencial (CRUZ et al., 2013). Os óleos essenciais extraídos a partir de folhas, caules, raízes e frutos podem ser alternativas para prevenção de coccidiose devido a à sua atividade antimicrobiana (ALI et al., 2015).

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura

A caprinocultura é uma das práticas pecuárias mais antigas do Brasil, cuja origem remonta aos tempos da ocupação portuguesa. Ocorre em todas as cinco grandes regiões do país, mas é na região do Nordeste que está mais concentrada a população destes animais, no qual corresponde a aproximadamente 91% do rebanho efetivo nacional, com cerca 8,5 milhões animais (IBGE, 2010). A criação de caprinos na região Nordeste assume um papel relevante na economia do país, pela facilidade de adaptação dos animais aos agro ecossistemas do semiárido, comparados a outras espécies (EMBRAPA, 2005).

Entre outros fatores favoráveis à caprinocultura no Nordeste, estão a baixa necessidade de capital inicial, a capacidade de acumulação de renda em pequena escala, o elevado potencial de geração de ocupações produtivas, a fácil apropriação sociocultural, e, a oferta de produtos com grande apelo em novos mercados (HOLLANDA JÚNIOR; MARTINS, 2008).

Para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento a exploração caprina no Brasil tem como finalidade principal a produção de leite, onde a relação caprinos leiteiros e caprinos de corte é bem maior, embora os animais seja na sua maioria de dupla aptidão (MAPA, 2005).

Por mais que o mercado esteja em expansão e que novos investimentos estejam sendo feitos para a melhoria no aproveitamento de carne e leite destes animais, existem algumas barreiras que impedem o desenvolvimento, entre elas as infecções gastrointestinais parasitárias, que são um dos principais fatores limitantes na expansão deste setor no Brasil (RIET-CORREA et al., 2013).

2.2 *Eimeria* spp.

Coccidiose ou eimeriose é uma doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Eimeria* spp. que são parasitos intracelulares obrigatórios (VIEIRA et al., 2004), de ocorrência mundial e com uma ampla distribuição no Brasil (LIMA, 2004; MENEZES; HASSUM, 2005; BRITO et al., 2009), afeta frangos de corte e pequenos ruminantes de todas as idades, porém é mais comum em animais jovens e recém-desmamados e submetidos a diferentes sistemas de manejo, devido à contaminação do ambiente que proporciona

condições favoráveis para que os oocistos esporulem e sobrevivam, reforçando assim a sua importância para o rebanho leiteiro (FOREYT, 1990; REBOUÇAS et al., 1992; PLATZER et al., 2005).

A forma aguda da doença afeta principalmente os animais mais jovens, com idade entre três semanas e cinco meses criados em qualquer sistema de produção (ROSA, 1996), e causa uma intensa diarreia nestes animais (SMITH & SHERMAN, 1994) uma vez que a imunidade destes animais é baixa considerado a um animal adulto, tornando-se um fator limitante no ganho de peso e conseqüentemente no crescimento do animal (KOUDELA & BOKOVA, 1998; LIMA, 2004; SAHINDURAN, 2012).

Para Foreyt, (1990) comumente a infecção por esses protozoários intestinais é multiespecífica, e embora haja semelhança morfológica dos oocistos das espécies parasitas de caprinos e ovinos, existe uma estreita especificidade pelo hospedeiro, ou seja, as espécies pertencentes ao gênero *Eimeria* spp. são específicas para cada espécie de hospedeiro (SHAPIRO, 2010). Patogenicidade também varia de acordo com a espécie de *Eimeria* spp., onde umas são consideradas mais patogênicas a ponto de apresentar sinais clínicos, enquanto outras não capazes de apresentarem sinais (VIEIRA et al., 2004).

Lima (2004) apresentou as espécies mais patogênicas em quatro grupos de animais, em bovinos foram identificadas *Eimeria bovis* e *E. zuernii*, em búfalos *E. ahsta*, e *E. bakuensis* e *E. ovinoidalis* em ovinos, *E. arloingi*, *E. alijevi*, *E. hirci*, *E. christenseni* e *E. ninakolhyakimovae* em caprinos. Smith e Sherman (1994), verificaram que cerca de 16 espécies de *Eimeria* podem parasitar caprinos, mas apenas três tem uma patogenicidade moderada a severa *E. arloingi*, *E. caprina*, *E. christenseni* e, apenas uma é considerada patogênica severa *Eimeria ninakolhyakimovae* concordando com Lima (2004). Enquanto Mancebo (2002) das 16 espécies, considera três *E. arloingi*, *E. christenseni* e *E. ninakohlyakimovae* com patogenicidade severa que podem levar até a morte do animal.

Quando ocorre a infecção por *Eimeria*, os animais podem apresentar como sinais clínicos, fezes diarreicas de coloração escura, às vezes com presença de muco e sangue, desidratação, perda de apetite e conseqüentemente perda de peso (LIMA, 2004), fatores estes que limitam consideravelmente a caprinocultura.

2.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *Eimeria* é monoxeno, isso consiste em que todas as suas formas evolutivas ocorre em um único hospedeiro e em duas fases, uma exógena e uma endógena. O oocisto que é a forma infectante da *Eimeria* é eliminado para o ambiente junto com as fezes, neste momento o oocisto não esporulado, devido suas características morfológicas é chamado de esporoblasto. Este possui um esporonte, cuja localização é central e, após a esporulação, apresentam quatro esporocistos, cada um com dois esporozoítos (VIEIRA, 2002; MONTEIRO, 2011).

A infecção do animal ocorre quando ele ingere água ou alimentos contaminado com oocistos esporulados começando a fase endógena. Ao chegarem ao aparelho digestivo do animal há a ruptura dos oocistos por ação das enzimas digestivas, liberando os esporozoítos no lúmen intestinal, causando leões que interferem no processo digestivo do hospedeiro; (VIEIRA, 2002; LIMA, 2004; DENIZ, 2009).

Estes esporozoítos penetram nas células da mucosa intestinal, reproduzindo-se de forma assexuada por um processo de esquizogonia originando os esquizontes (MONTEIRO, 2011). A célula hospedeira se rompe e libera os merozoítas, que penetram em novas células intestinais produzindo novas divisões esquizogônicas, originando assim os esquizontes de segunda geração (SEQUEIRA & AMARANTE, 2001), após este estágio a célula se rompe originando merozoítos de segunda geração, sucessivamente ocorre o rompimento de novas células intestinais, onde alguns merozoítos podem invadir novas células e formar esquizontes de terceira geração, mas em sua maioria invadem novas células íntegras do epitélio e forma a gametogonia, fase sexuada do ciclo (LEVINE, 1963; MONTEIRO, 2011).

Na última etapa do ciclo os merozoítos mudam para trofozoítos, sendo que estes se diferenciam em macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Os microgametas rompem uma célula contendo um macrogameta onde ocorre a fertilização formando o zigoto que, ao produzir sua parede, forma o oocisto. Os oocistos produzidos rompem a célula hospedeira e são eliminados nas fezes na forma de oocisto não esporulado, continuando o ciclo (SERQUEIRA e AMARANTE, 2001). Já no ambiente, o oocisto divide-se em esporogonia tornando-se infectante. A esporogonia origina quatro esporocistos, contendo dois esporozoítos em cada esporocisto, totalizando oito esporozoítos por oocisto. Para que ocorra a esporulação do oocisto é necessário a presença de oxigênio, umidade, e temperaturas

adequadas. O oocisto eliminado junto com as fezes apresenta uma parede que proporcionará proteção quando estiver no ambiente ou fase de latência, é a forma inativa do oocisto (LIMA, 2004).

Gregory & Cachoptole (1990), revela que com a constante lesão do tecido epitelial do intestinal provoca uma diminuição na capacidade de absorção dos nutrientes (lipídios, proteínas, glicídios, vitaminas e minerais) de forma irreversível que leva também a perda de água e sangue. Para Foreyt (1990) mesmo que não haja a destruição total do tecido a recuperação é lenta, o que causa uma desidratação e pode levar a morte do animal.

2.4 Formas de controle

O controle da Eimeriose tem se realizado com adoção de medidas sanitárias e de manejo, o tratamento dos animais infectados e pela administração dos quimioterápicos que juntos objetivam diminuir o número de animais infectados. As medidas sanitárias como a limpeza diariamente das instalações visam impedir ou diminuir a ingestão dos oocistos esporulados (LIMA, 2004; MONTEIRO, 2011).

O tratamento com a utilização dos quimioterápicos é realizado para animais infectados pela Eimeriose, é feito após os primeiros sinais clínicos como a diarreia e desidratação (LIMA, 2004), e tem um bom resultado se feito no início da infecção. Existem dois tipos de antiparasitários para o tratamento da eimeriose, os coccidiostáticos que atuam na fase assexuada impedindo a reprodução do parasito, onde os mais utilizados são as aureomicina, monensina, salinomina, lasalocid decoquinato, triazinonas e amprolio (GRILO & CARVALHO, 2014). E atuando já com os sinais clínicos eliminando todas as fases evolutivas do parasito são utilizados os coccidíidas que inclui as sulfamidas isoladas ou combinadas e nitrofuranos, devido a preocupações com a carcinogenicidade, os nitrofuranos atualmente são proibidos no Brasil (BRASIL, 2003; ORDAZ, 2011). O princípio ativo atualmente é o do Toltrazuril utilizado principalmente para o controle da eimeriose, com redução significativa dos sinais clínicos (GRILO & CARVALHO, 2014). Porém, Lima (1980) destaca que, nenhuma droga não é capaz de controlar a Eimeriose, isso por que já houve destruição total dos tecidos e estes quimioterápicos não tem nenhuma capacidade de regenerá-los.

Falha no tratamento, ou o uso constante e incorreto destas drogas podem resultar em consequências danosas, como resíduos da droga na carne e no leite do animal e uma possível

resistência do protozoário aos antiparasitários, poluição ambiental causado por tais drogas (HIDALGO ARGUELLO & CORDERO DEL CAMPILLO, 1999; MC EVOY, 2002; PEEK & LANDMAN, 2003; SOARES & DIAS, 2013), além de aumentos nos custos de produção (ABBAS et al., 2011).

Esses elementos citados indicam a necessidade do desenvolvimento de estratégias de controles alternativos.

2.5 Controle alternativo

Diante desse problema na cadeia produtiva da caprinocultura, o controle de parasitos gastrintestinais por meio da utilização de produtos naturais apresenta uma alternativa viável (SANTOS et al., 2012). Pesquisas com compostos bioativos voltados para aplicação em animais ainda é pouco explorada, considerando a grande variedade de espécies encontradas em todo o Brasil. Até o momento não há fitoterápicos validados cientificamente contra coccidiose em pequenos ruminantes. O desenvolvimento de pesquisas nessa área é de grande importância, visto que cada vez mais têm surgido metodologias e técnicas que possibilitam o rastreamento de substâncias e de genes de interesse (CAVALCANTE et al., 2009).

Com cerca de 175 gêneros e 2.800 espécies, a família Verbenaceae apresenta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas regiões temperadas do Hemisfério Norte (BARROSO, 1991). O gênero *Lippia* possui muitas espécies de interesse medicinal e reúne cerca de 200 espécies arbustivas com distribuição pantropical e cerca de 150 espécies que estão distribuídos por campos rupestres e cerrados no Brasil (SALIMENA, 2002).

Lippia gracilis é conhecida popularmente como alecrim-da-chapada, e seu óleo essencial apresenta atividade antimicrobiana, sendo utilizado para o tratamento de doenças cutâneas, queimaduras, feridas, e úlceras (PASCUAL et al., 2001). Cruz et al., (2013) constatou que Carvacrol e Timol são os principais constituintes majoritários do óleo e estes tem potencial acaricida (COSTA-JÚNIOR, 2016).

Estudos tem mostrado aos poucos a utilização de produtos naturais para o controle de *Eimeria*, Remmal et al., (2011) verificaram a ação de óleos essenciais de várias espécies vegetais na destruição de oocistos de *Eimeria* em frangos de corte, no qual o óleo essencial de orégano (*Oreganum compactum*) tem como principais componentes majoritários o carvacrol (30,5%) e timol (27,5%) que obtiveram resultados significativos na destruição dos oocistos.

Não foi encontrado na literatura, trabalhos científicos que reportam atividade anticoccídico de óleos essenciais de *L. gracilis* e do monoterpene carvacrol sobre *Eimeria* de caprinos.

Existem estudos *in vitro* e *in vivo* com a utilização óleos essenciais com *Eimeria* spp. de frangos de corte (Quadro 1) que ao decorrer dos anos tem demonstrado resultados satisfatórios para o controle deste parasita.

Quadro 1. Óleos essenciais analisados em ensaios para o controle de coccídios gastrointestinais.

| Espécie | Parte | Extrato | Componente majoritário | Animal | Teste | Eficiência | Referência bibliográfica |
|-----------------------------|--------|-----------------------------------|---|-----------------|--|--|---|
| <i>Origanum compactum</i> | NA | Óleo essencial | Carvacrol:30,5% Timol:27,5%; Gamaterpineno: 18,2% | Frango de corte | <i>In vitro</i> | Destruição dos oocistos | Remmal et al.,2011. |
| <i>Artemisia absinthium</i> | NA | Óleo essencial | P-tuiona: 64%; 1,8 cineol: 18%; P-cimeno: 9,6%; Sabinene: 7,8% | Frango de corte | <i>In vitro</i> | Reduziu em aproximadamente em 70% o número de oocisto | Remmal et al.,2011 |
| <i>Eschinacea purpurea</i> | NA | Extrato puro (pó) | NA | Frango de corte | <i>In vitro</i> | Ocorreu a diminuição da invasão dos esporozoítos em células epiteliais | Burt et al., 2013 |
| <i>Origanum vulgare</i> | Casca | 5 % óleo essencial em forma de pó | Timol: 82% Carvacrol:78% | Frango de corte | <i>In vivo</i> . Suplementação do óleo na ração | Efeito na prevenção da coccidiose | Mohiti-Asli & Ghanaatparast-Rashti, 2015. |
| <i>Pandurata boesenbe</i> | Folhas | Óleo essencial | Tras-b-ocimeno:26,81% Cânfora: 23,17% | Frango de corte | <i>In vitro</i> | Com 70% de inibição da | Jitviriyanon et al., 2016 |

| | | | | | | | |
|-------------|--|--|-----------------------|--|--|-------------|--|
| <i>rgia</i> | | | 1,8-cineol: 16,92% | | | esporulação | |
|-------------|--|--|-----------------------|--|--|-------------|--|

*NA: Não avaliado

No entanto, não há trabalhos envolvendo o controle de *Eimeria* spp. de pequenos ruminantes com óleos essenciais. Na literatura mundial constam apenas alguns estudos com taninos, tornando assim importante estudo com óleos essenciais em *Eimeria* de pequenos ruminantes.

2.6 Óleos essenciais e monoterpenos

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, lipofílicas, odoríficas e líquidas, conhecidas de maneira geral como óleos voláteis (SIMÕES et al., 2000). Os óleos essenciais são constituídos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos (PEREIRA, 1996). Os monoterpenos se destacam, já que podem causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas dos parasitas (BRATTSTEN, 1998), apresentando a vantagem que a maioria é pouco tóxica para os mamíferos (KLOCKE et al., 1987; RICE & COATS, 1994).

Os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, atividade antioxidante, (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória, (MENDES et al., 2010), fungicida, (CARMO et al., 2008) atividade antitumoral. (SILVA, 2008), carrapaticida (COSTA-JÚNIOR, 2016) podendo também ser anticoccídico (REMMAL, et al., 2011).

Dentre os compostos que podem estar presentes na composição dos óleos essenciais, o timol e o carvacrol se destacam devido suas pronunciadas atividades antimicrobiana. Estes monoterpenos aromáticos são os constituintes principais dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanium compactum* (Labiatae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae), *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (PEIXOTO-NEVES et al., 2010) e *Lippia gracilis*.

Os diferentes óleos essenciais e monoterpenos majoritários são uma importante ferramenta para pesquisas que visam desenvolvimento de uma droga para o controle de parasitas que causam grande impacto na economia do país.

2.7 Características gerais timol e carvacrol

Carvacrol 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol e seu isômero timol 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol são monoterpenos encontrados em diversas plantas aromáticas sendo biossintetizados a partir do γ -terpineno e do ρ -cimeno (NOSTRO & PAPALIA, 2012). O timol foi sintetizado pela primeira vez por Caspar Neumann em 1719 (FRIEDRICH, 2014), sendo estruturalmente muito semelhante ao carvacrol variando apenas a posição do grupo hidroxila no anel fenólico, como pode ser visto na Figura 1 (LAMBERT et al., 2001).

O carvacrol também é conhecido como isopropil-o-cresol, ρ -cimeno-2-ol, 5-isopropil-2-timol ou iso-timol (DE VINCENZI et al., 2004). Ambos possuem fórmulas moleculares iguais a $C_{10}H_{14}O$ e pesos moleculares de $150,22 \text{ g mol}^{-1}$. No entanto, o carvacrol apresenta-se na forma líquida em temperatura ambiente cuja solubilidade em água é de $830 \pm 10 \text{ ppm}$ (NOSTRO & PAPALIA, 2012). Em contrapartida o timol em temperatura ambiente encontra-se na forma de cristais (HOLLAND et al., 2014).

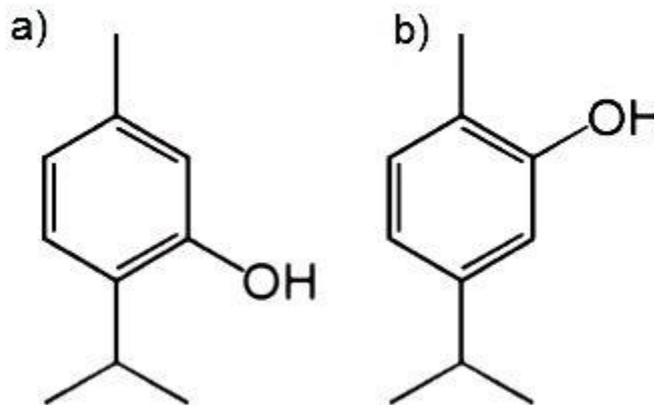


Figura 1: Estrutura molecular (a) timol e (b) carvacrol, extraído de: (PEIXOTO-NEVES et al., 2010,).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar espécies e avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* e o monoterpeno carvacrol sobre oocistos de *Eimeria* spp. isoladas de pequenos ruminantes.

3.2 Específicos

- ✓ Identificar as espécies de *Eimeria* spp. isoladas de pequenos ruminantes.
- ✓ Avaliar a atividade coccídea *in vitro* do óleo essencial de *L. gracilis* e monoterpeno carvacrol sobre oocistos de *Eimeria* spp.;
- ✓ Determinar a concentração letal de destruição e de inibição na esporulação para oocistos de *Eimeria* spp. dos compostos testados.

4.0 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e análise dos óleos essenciais

O óleo essencial e o genótipo de *Lippia gracilis*, foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Lívio Martins Costa-Junior da Universidade Federal do Maranhão.

Para obtenção do óleo essencial e do genótipo 201 de *Lippia gracilis* foram mantidos no banco ativo de germoplasma (BAG) de plantas medicinais da Universidade Federal de Sergipe (UFS). O óleo essencial de *L. gracilis* foi obtido por hidrodestilação das folhas utilizando o aparelho Clevenger por 3 horas (GUENTHER, 1972).

A análise da composição química do óleo essencial foi feita através da cromatografia gasosa (Shimadzu, modelo QP5050A) acoplada a um espectrômetro de massa (GC-MS). A análise quantitativa dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia de gás de ionização de chama (FID), utilizando um Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os componentes do óleo essencial foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com os espectros disponíveis na base de dados de (NIST05 e WILEY8) (CRUZ et al., 2013).

Além disso, foi utilizado também o monoterpeno carvacrol isolado e adquirido de empresa fabricante SIGMA-ALDRICH®.

4.2 Obtenção dos oocistos de *Eimeria* spp.

Os oocistos utilizados no presente estudo foram provenientes de fezes de caprinos da Região de Chapadinha e Baixo Parnaíba, trazidas até o Laboratório de Parasitologia Aplicada da Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, pelos produtores rurais dessas regiões, quando realizam análises coproparasitológicas de rotina dos caprinos de suas propriedades, pelo serviço oferecido por esse laboratório.

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, armazenadas em envelopes plásticos e acondicionadas em caixas térmicas com gelo (4-8°C).

4.3 Análise qualitativa e quantitativa das amostras

As amostras foram utilizadas para pesquisa qualitativa e quantitativa de oocistos de *Eimeria* spp. pelos métodos de Gordon & Whitlock (1939) e Ueno e Gonçalves (1998).

De cada animal foram utilizadas 2 g de fezes, estas foram diluídas em 28 ml solução saturada de NaCl, procedida a filtração em quatro camadas de gazes, e realizada a leitura dos oocistos em câmara de McMaster.

Posteriormente foram calculadas a quantidade de oocistos por grama de fezes (OoPG), multiplicando-se os oocistos encontrados por 50. Além disso, foram procedidas as análises qualitativas dos oocistos para saber se já estavam ou não esporulados.

As amostras que continham quantidades maiores de oocistos, com valores \geq a 7000 OoPG, em sua maioria não esporulados, foram selecionadas para o isolamento.

4.4 Isolamento de oocisto de *Eimeria* spp.

Após a análise quantitativa das amostras, o isolamento dos oocistos nessas amostras fecais foi realizado utilizando método de centrífugo-flutuação em solução de sacarose saturada (SHEATHER, 1923). As amostras positivas (aproximadamente 1,5 gramas por isolamento) foram lavadas em solução fisiológica (NaCl 0,09%) e filtradas através de peneiras com quatro camadas de gaze e centrifugadas a 1000 x g por 10 min a 4°C.

Posteriormente, o sedimento foi suspenso em 50 ml de solução saturada de sacarose, e centrifugado a 250 x g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante superior (aproximadamente 10 ml) foi coletado e diluído em 40 ml de solução fisiológica, totalizando 50 ml de solução.

Esse conteúdo foi centrifugado a 2000 x g por 10 min a 4°C. O sedimento foi recuperado e suspenso em 500µl de solução NaCl 0,09%.

Esse procedimento foi realizado por várias vezes até obter o número necessário de oocistos para análise, ou seja, 5×10^5 oocistos, averiguados em câmara hematocimétrica de Neubauer. O material analisado foi armazenado em refrigeração a 4°C até a análise.

4.5 Identificações dos oocistos isolados

Uma alíquota contendo 2000 oocistos foi coletada do material isolado utilizada para identificação das espécies em oocistos esporulados. Essa alíquota foi incubada em dicromato de potássio a 2,5% por 48 horas em volume final de 2 ml. As espécies foram identificadas tendo por base a morfologia dos oocistos descritos por Levine (1985) e medidas de diâmetro polar e equatorial, bem como o índice morfométrico representado pela razão entre diâmetro maior e menor dos oocistos e esporocistos, de acordo com descrição de Lima (1979), Alyousif et al. (1992), Cavalcante (1996) e Barra (2000).

4.6 Testes *in vitro*

Para os testes *in vitro*, foram realizadas as análises da destruição dos oocistos e de inibição da esporulação de oocistos de *Eimeria* spp, seguindo metodologia descritas por Remmal et al. (2011) e Jitviriyanon et al. (2016), com algumas adaptações descritas a seguir.

4.7 Análise da destruição dos oocistos de *Eimeria* spp.

A análise da destruição dos oocistos foi realizada com óleo essencial de *Lippia gracilis*. (Genótipo 201). Foram utilizadas concentrações iniciais de 10,0; 7,0; 4,9; 3,43; 2,40; 1,68; 1,17; 0,82 mg/ml, em triplicata, diluídas em Triton X-100 a 1%. Os controles foram diluídos em Triton X-100 a 1% em triplicata. Foi considerada a concentração do óleo essencial de 98%. As soluções seriadas foram preparadas em tubos de ensaio em volume final de 10 ml, e transferidos 1 ml de cada diluição, para microtubos de 2 ml.

Posteriormente, foram adicionados 500µl de suspensão de oocistos isolados (item 4.4) contendo aproximadamente 1500 oocistos, verificados em câmara hematocimétrica de Neubauer. Desse modo, obtivemos um total de 1500µl de solução de óleo essencial, e os controles em 1% de Triton X-100, contendo 1500 oocistos.

As diluições foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período o material foi centrifugado a 2000 x g por 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi retirado e armazenado para análises futuras.

O sedimento foi suspenso em microtubos contendo dicromato de potássio a 2,5% em volume final de 1500 µl e mantidos em presença de oxigênio, a temperatura ambiente por 48 horas.

Após esse período os oocistos foram quantificados de acordo com Gordon & Whitlock (1939), com algumas adaptações, e analisados quanto a sua esporulação. As adaptações versaram principalmente na diluição onde foram utilizadas 50µl da suspensão de oocistos para cada 750µl de solução saturada de NaCl, em duplicata, para ser procedida a contagem e mensuração dos oocistos. Basicamente, por ser uma técnica de flutuação, essa técnica permite a análise criteriosa da presença dos oocistos viáveis esporulados e não esporulados, pois oocistos destruídos e inviáveis não podem ser visíveis.

O teste realizado nesse trabalho, Gordon: Withlock (1939), descrito anteriormente, permite visualizar apenas os oocistos íntegros que possuem densidade. Assim, todos os oocistos deformados, destruídos ou degenerados, perdem a sua conformação e conseqüentemente sua densidade impedindo sua flutuação. Nesse sentido, em todas as diluições os oocistos viáveis podem ser quantificados e comparados com o controle, de modo que seja possível analisar a porcentagem real dos oocistos que foram destruídos nesse processo.

4.8 Análise da inibição da esporulação dos oocistos de *Eimeria* spp.

A análise da inibição da esporulação dos oocistos foi realizada com carvacrol (SIGMA-ALDRICH®). Foram utilizadas concentrações iniciais de 4,8; 2,4; 1,2; 0,6; 0,3 e 0,15 mg/ml, em triplicata, diluídas em Triton X-100 a 1%. Os controles foram diluídos em Triton X-100 a 1% em triplicata. Todos os procedimentos adicionais segue metodologia descrita no item (4.7).

4.9 Análise estatística dos testes *in vitro*

Após a incubação final, a porcentagem de oocistos viáveis foi calculada em comparação ao controle segundo a fórmula: (média de oocistos expostos/média de oocistos controle) x 100, e a porcentagem dos oocistos esporulados e não esporulados foram determinadas para cada concentração dos materiais avaliados. As concentrações letais (CL₅₀) e inibitórias (IC₅₀) para 50% da população foram calculadas após transformação logarítmica dos valores das diluições, empregando o programa Graph Pad Prism Versão 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total das amostras analisadas, 89,4% apresentaram oocistos de *Eimeria* spp., resultando semelhante ao de Cavalcante (1996) que encontrou 91,17% de positividade de caprinos leiteiros na microrregião de Sobral - CE. E, foram identificadas oito espécies de *Eimeria* spp. dos caprinos sendo estas *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. joichijevi*, *E. hirci*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. caprovina*, *E. apsheronica*, e *E. ninakohlyakimovae*. Nove espécies de *Eimeria* são comumente citadas na literatura parasitando caprinos: *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. alije*, *E. hirci*, *E. caprina*, *E. apsheronica*, *E. jolchijevi* e *E. caprovina* (CAVALCANTE et al., 2012).

Segundo Lima (2004), existem espécies mais patogênicas do que outras, sendo a *E. ninakohlyakimovae* e *E. caprina* consideradas as mais patogênicas para caprinos. Cunha et al., (2016) realizando estudo de identificação das espécies de *Eimeria* spp. de caprinos da região de Chapadinha encontrou as espécies descritas nesse trabalho adicionada da *E. alije* e Brito et al., (2009) detectou que 41,16% dos caprinos estudados estavam infectados com coccídeos, mas não procedeu a identificação das espécies, sendo esses dois últimos estudos os únicos realizados no estado do Maranhão, relacionados a coccidioses em caprinos, o que justifica a importância da identificação dessas espécies.

A avaliação do óleo essencial de *Lippia gracilis*, de Genótipo 201, apresentou como composto majoritário o monoterpene carvacrol. Na tabela 1, consta a composição dos principais componentes químicos presentes genótipo 201 do óleo essencial de *Lippia gracilis*. Dentre os constituintes principais dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanum compactum* (Labiatae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae), *Lippia sidoides* (Verbenaceae), o carvacrol demonstrou ser o composto majoritário (PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

Tabela 1. Identificação dos principais componentes químicos presentes no genótipo 201 do óleo essencial de *Lippia gracilis*.

| Constituinte | LGRA-201 |
|--------------------------------|----------|
| Mirceno | 3.20 |
| α -Terpineno | 3.01 |
| p-Cimeno | 13.74 |
| γ -Terpineno | 21.11 |
| Timol | 5.78 |
| Carvacrol | 35.28 |
| β -Carofileno | 6.26 |
| Monoterpenos (%) | 87.04 |
| Sesquiterpenos (%) | 9.82 |
| Total (%) | 92.02 |
| Conteúdo de óleo essencial (%) | 2.37 |

Em relação à ação do óleo essencial de *Lippia gracilis* sobre a destruição dos oocistos, os resultados demonstraram que o óleo essencial citado tem alta capacidade de interferir na viabilidade dos oocistos apresentando eficiente atividade coccidicida. A partir da concentração de 2,4 mg/ml de óleo essencial de *Lippia gracilis* nota-se ligeira diminuição na viabilidade dos oocistos (Figura 2). Essa diminuição se intensifica até a total destruição dos oocistos na concentração de 7,0 mg/ml, apresentando concentração letal (CL₅₀) de 4,56 mg/ml (Tabela 2).

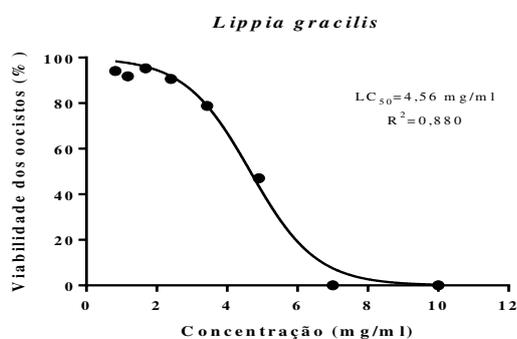


Figura 2. Viabilidade dos oocistos sob efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis*.

Tabela 2. Concentrações letal de destruição e inibitória (50%) para óleo essencial de *L. gracilis* e carvacrol para oocistos de *Eimeria* spp., com intervalo de confiança de 95%.

| Material analisado | Concentrações letais ou inibitórias (mg/ml) | IC (95%) | R² |
|--|--|-----------------|----------------------|
| <i>Lippia gracilis</i> (Genótipo LGRA-201) – óleo essencial | 4,56 (CL ₅₀) | 4,07 - 5,11 | 0,880 |
| Carvacrol 98% (SIGMA-ALDRICH®) | 0,42 (CI ₅₀) | 0,35 - 0,50 | 0,970 |

Em estudos envolvendo atividade antibacteriana apresentada pelos óleos essenciais indicam que essa atividade pode ter relação não apenas com um dos seus principais constituintes químicos, mas também das interações entre eles. Alguns testes realizados por Michiels et al., (2007) relataram atividades antimicrobianas sinérgicas da combinação carvacrol + timol quando testados em simulações de fermentação *in vitro* no tubo digestivo dos suínos, demonstrando que a combinação carvacrol + timol possui um maior efeito antibacteriano que a soma dos efeitos de cada agente separado contra *E. coli* e *Lactobacillus* spp. García-García et al., (2011) também observaram sinergismo entre carvacrol e timol frente a *Listeria innocua*, atribuídos a uma maior interação entre os compostos e a membrana plasmática do microrganismo, ocasionando um aumento significativo da permeabilidade da membrana e consequentemente, a perda de lipopolissacarídeos essenciais para o funcionamento celular do microrganismo.

Em relação à atividade fungicida, Rao et al., (2010) também avaliaram os mecanismos de ação antifúngica dos compostos, timol e carvacrol frente ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, observando que além destes compostos possuem a capacidade em facilitar a troca de íons no meio celular dos fungos, como a entrada de H⁺ e K⁺, aumentando assim a permeabilidade da membrana e dificultando a sobrevivência da célula por atrapalhar os processos essenciais como o transporte de elétrons, estes também impedem o influxo de Ca²⁺ nos compartimentos celulares.

Em relação à ação sobre os oocistos, o hidróxido de amônio em alta concentração (5%) é relatado como sendo um desinfetante eficaz contra oocistos de coccídios de aves (SAMAH et al., 2013), resultantes da capacidade da ligação entre íons hidroxila e lipídio na membrana celular, onde a saponificação do lipídio leva à disfunção da membrana celular e a

morte celular (MARIS, 1995). Pela sua eficiente ação coccidicida, ele é muito utilizado nas granjas avícolas (WILLIAMS, 1997).

Óleos essenciais podem ter alta atividade coccidicida devido às suas propriedades hidrofóbicas e baixo peso molecular que desintegram a membrana externa permeável da célula (BOYOM et al., 2003), provocando a liberação de lipopolissacarídeos, porinas, proteínas, ácida graxa e vazamento de metabólitos e enzimas como aminoácidos aromáticos e nucleotídeos, resultando na permeabilidade crescente da membrana citoplasmática (REMMAL et al. 2011). Adicionalmente, a característica hidrofóbica dos óleos essenciais resultam no aumento da permeabilidade da membrana (BOYOM et al., 2003) tendo como consequência a degeneração dos oocistos.

Nesse sentido os óleos essenciais têm propriedades anti-coccidicas por difusão através das membranas celulares desses parasitas, aumento da permeabilidade das membranas celulares e por interferirem no metabolismo celular levando à morte celular (ALLEN et al., 1997).

O genótipo 201 do óleo essencial de *Lippia gracilis* apresentou como composto majoritário o carvacrol 35,28%, este com a concentração de destruição CL₅₀ de 4,56 mg/ml demonstrou atividade coccidicida (Tabela 2). O monoterpeno carvacrol testado, apresentou uma porcentagem de inibição de esporulação dos oocistos em uma concentração de inibição CI₅₀ de 0,42 mg/ml,

De acordo com a figura 2, o número de oocistos viáveis diminuiu consideravelmente a medida que havia o aumento da concentração do óleo essencial de *L. gracilis*, considerando assim o sua eficácia na destruição dos oocistos de *Eimeria*. Quando expressa em relação a concentração letal 50% (CL₅₀), os nossos resultados mostram que a concentração do óleo essencial de *Lippia gracilis* tem sua eficiência em 4,56 mg/ml, isso significa que nesta concentração foi possível a destruição de 50% dos oocistos de *Eimeria* spp.

Como já descrito, o CL₅₀ encontrado em nosso estudo para avaliação da viabilidade dos oocistos expostos em óleo essencial de *L. gracilis* foi de 4,56 mg/ml. Considerando que a concentração de Carvacrol nesse óleo essencial é de 35, 28%, a concentração do Carvacrol dentro da LC₅₀ encontrada nesse estudo foi de 1,61 mg/ml, ou seja, apenas 1,61 mg/ml de carvacrol atuou na destruição dos oocistos. Esse resultado é similar ao descrito por Remmal et

al. (2011), que encontrou uma LC_{50} de 3.733 mg/ml para destruição de oocistos de *Eimeria* spp. de aves, quando avaliou óleo essencial de orégano (*Origanum compactum*), que possuía em sua composição, 30,5% de Carvacrol.

Da mesma forma, a quantidade de Carvacrol presente no óleo essencial de orégano (*Origanum compactum*), avaliada por Remmal et al. (2011), foi de 1,14 mg/ml, valor próximo, mas ligeiramente abaixo do encontrado em nosso estudo. Isso pode ter relação com o sinergismo, principalmente relacionado ao Timol, já que no óleo essencial de orégano estudado por Remmal et al. (2011), o timol representa 27,5% e no óleo essencial de *L. gracilis* corresponde a 5,78%.

Em nosso estudo os testes realizados para avaliar os efeitos da inibição da esporulação dos oocistos pelo efeito do carvacrol nas seguintes concentrações, mostraram resultados satisfatórios. Foram procedidas cinco diluições (4,8; 2,4; 1,2; 0,6; 0,3 e 0,15 mg/ml), no entanto, somente foi possível a verificação da esporulação dos oocistos nas diluições de 2,4; 1,2; 0,6 e 0,15 mg/ml de carvacrol, pois na concentrações 4,8 e 0,3 mg/ml houve alguns problemas laboratoriais (Figura 3). Em nosso estudo, em concentrações acima de 1,2 mg/ml, somente 20%, aproximadamente, dos oocistos esporularam, indicando ação coccidiostática ou inibitória, e a concentração inibitória (CI_{50}) detectada foi de 0,42 mg/ml, concentração esta que foi responsável pela inibição da esporulação de 50% dos oocistos de *Eimeria* (Figura 3).

Nesse sentido, tanto nesse estudo com *L. gracilis* dentro da LC_{50} referente ao Carvacrol 1,61 mg/ml, quanto no estudo realizado por Remmal et al. (2011) que detectou LC_{50} referente ao Carvacrol de 1,14 mg/ml, o carvacrol pode ter atuado como principal agente, no entanto o sinergismo é evidente, já em concentrações similares, o carvacrol isolado possuiu apenas ação inibitória e associado a outros compostos presentes nos óleos essenciais, caracterizou-se como coccidicida.

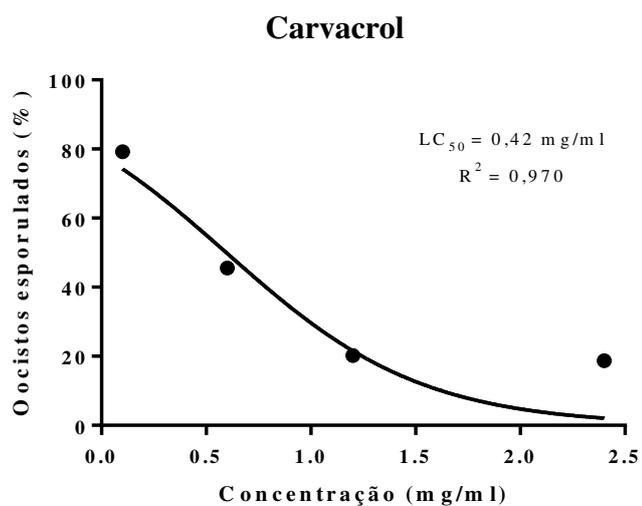


Figura 3. Efeito das concentrações de Carvacrol na inibição da esporulação dos oocistos de *Eimeria* spp.

Os óleos essenciais em sua maioria são constituídos principalmente por monoterpenos (DUBEY et al., 2003) e de acordo com o relato de Greay & Hammer (2011), monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória, o que pode interferir na esporulação dos oocistos.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho identificou oito espécies em pequenos ruminantes sendo estas, *E.arloingi*, *E. christenseni*, *E.joichijevi*, *E. hirci*, *E. ninakohlyakirnovae*, *E. caprovina*, *E.apsheronica*, e *E.ninakohlyakirnovae*. O genótipo 201 de *Lippia gracilis* utilizado na análise da destruição dos oocistos de *Eimeria* spp., apresentou sua eficiência sobre os oocistos com a concentração de destruição CD_{50} de 4,56 mg/ml demonstrando assim, sua atividade coccidico. Da mesma forma, o carvacrol demonstrou atividade coccidico atuando na inibição da esporulação dos oocistos, com concentração inibitória CI_{50} de 0,42 mg/ml. O presente estudo comprovou a ação de óleo essencial e monoterpene sobre oocistos de *Eimeria* spp. isolados de pequenos ruminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALYQUSIF, M. S.; KASIM, A. A.; AL-SHAWA, Y. R. Coccidia of the domestic goat (*capra hircus*) in Saudi Arabia. **International Journal Parasitology**. V. 22, p. 807-811, 1992.

ALLEN, P.C., LYDON, J., DANFORTH, H.D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. **Poult. Sci.** 76, 1156–1163, 1997.

ABBAS, R.Z. ABBAS, Z. IQBAL, D. BLAKE, M.N. KHAN, M.K. Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. **World's Poult. Sci. J.**, 67, pp. 337–350, 2011.

AMANCIO, V. F. de.; PEREIRA, T. S. Panorama de caprinocultura de corte e leite no Brasil. 2014.

ALI, B., AL-WABEL, N.A., SHAMS, S., AHAMAD, A., KHAN, S.A., ANWAR, F. Essential oils used in aromatherapy: a systemic review. **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.** 5,601–611, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de Junho de 2003 a. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos principais ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 4, Acesso em: 22 de jan. de 2017.

BRITO, D.R.B.; SANTOS, A.C.G.; TEIXEIRA, W.C.; GUERRA, R.M.S.N.C. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciê. Anim. Brasil.** 10 (3):967-974, 2009.

BARROSO, G.M. Sistemática de angiospermas do Brasil. **Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais., 1991.

BRATTSTEN, L. B. Cytochrome P-450 involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores. *In*: DUNKEL, F. V. & SEARS, L. J. Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. *Ssp. vaseyana*

(Rydb.) beetle for stored grain insects. 1998. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321.

BARRA, PB. Prevalência e espécies Gênero *Eimeria* Schneider, 1975 (Apicomplexa: Eimeridae) parasitas de caprinos no município de Mossoró — RN. 2000. 38 f. Monografia (graduação) — Curso de Medicina Veterinária, Escola Superior de agricultura de Mossoró, Mossoró.

BOYOM, F.F., NGOUANA, V., ZOLLO, P.H.A., MENUT, C., BESSIERE, J.M., GUT, J., ROSENTHAL, P.J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry** 64, 1269–1275, 2003.

BURT, S.A., TERSTEEG-ZIJDERVELD, M.H.G., JONGERIUS-GORTEMAKER, B.G.M., VERVELDE, L., VERNOOIJ, J.C.M. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. **Vet. Parasitol.** 191, 374–378, 2013.

CAVALCANTE, A.C.R. Espécies do Gênero *Eimeria* Schneider, 1975 (Apicomplexa: Eimeridae) parasitos de caprinos leiteiros na microrregião homogênea de Sobral, Ceará. Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica: Rio de Janeiro, 1996.

CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. 2009. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF -1 ed. 603 p.

CAVALCANTE A.C.R., TEIXEIRA M., MONTEIRO J.P., LOPES C.W.G. 2012. *Eimeria* species in dairy goats in Brazil. **Veterinary Parasitology**. 183 (3-4):356-358. Coelho W.M.D., Amarante A.F.T., Bresciani K.D.S. 2012.

CARVALHO, M.L. Coccidiose em pequenos ruminantes pequenos agentes e grandes problemas nas diarreias parasitárias. Prémio Bayer Saúde Animal: Animais de Produção 2013. **Veterinary Medicine**. p. 34-48, 2014.

CRUZ, O.M. ELIZANGELA DE; JUNIOR, C.M. LÍVIO; PINTO, O.A. JÉSSICA; SANTOS, A. DARLISSON DE; ARAÚJO, A. SANDRA DE; BLANK, A.F. MARIA DE; BACCI, L.; ALVES, B. PÉRICLES; CAVALCANTI, H. C. SÓCRATES DE.; BLANK, F. ARIE. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 195, 198-202, 2013.

COSTA-JÚNIOR, L.M; MILLER, R.J; ALVES, P.B; BLANK, A.F; LI, A.Y; PÉREZ DE LEÓN, A.A. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**. 2016; 228: 60-64. PMID:27692332.

CUNHA, I. A. L. da.; PEREIRA, A. R.; RODRIGUES, A. A.; MORAES, E. S. da.; JUNIOR, L.M. Coccidiose em pequenos ruminantes do estado do Maranhão. **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia e Veterinária**. Belém-Pará, 2016.

DENIZ, A. Coccidiose ovina: revisão bibliográfica. **In Albeitar** 2009. 3: 4-11.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, 75, 801-804, 2004.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R.; An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **J. Biosci.**, 28, 637–646, 2003.

EMBRAPA – Caprinos e Ovinos. Sistemas de Produção. 2005. ISSN 1809-1822 –Versão Eletrônica.

FOREYT, W.J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. **Veterinary Clinics North American Food Animal Practice**, v.6, n.3, p.655-670, 1990.

FRIEDRICH, C. Pharmacists in German Cultural History. An. **Real Acad. Farm.**, 80, 600-613, 2014.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A. Palou, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **J. Food Sci.**, 76, 95-100, 2011.

GREGORY, M.W.; CATCHPOLE, J. Ovine coccidiosis: The pathology of *Eimeria crandallis* infection. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.7, p.849-860, 1990.

GREAY, SJ & HAMMER, KA. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, abr. 2011.

GUENTHER, E. The essential oils. 6 ed. **Huntington, N.Y.: R.E. Krieger**, 1972, 63 p.

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

HASSUM, I.C., MENEZES, R.C.A.A., 2005. Infecção Natural por Espécies do Gênero *Eimeria* em Pequenos Ruminantes Criados em Dois Municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 14, 95–100.

HIDALGO ARGUELLO, M.R.; CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1999). Coccidiosis. In *Parasitologia Veterinaria*. Cordero del Campillo, M.; Rojo Vazquez, F.A. McGraw-Hill – Interamericana. Madrid. 195-212. **Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, Oct. 2007.

HOLLAND, R.D.; WILKES, J.G.; COOPER, W.M.; ALUSTA, P.; WILLIAMS, A.; PEARCE, B.; BEAUDOIN, M.; BUZATU, D. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 28, 2617–2626, 2014.

HOLANDA JÚNIOR, V.; MARTINS, E. C.. Análise da produção e do mercado de produtos caprinos e ovinos: o caso do território do sertão do Pajeú em Pernambuco. **Infoteca EMBRAPA**. 2008. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Índice de Produção Pecuária: produção da pecuária municipal. Dados de 2002 a 2011. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/>. Acesso em: 03 de agosto de 2016

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Índice de Produção Pecuária: produção pecuária municipal. Dados 2008 a 2012. Disponível em www.ibge.gov.br Acesso em: 22 de dez. 2016.

JITVIRIYANON, S.; PHANTHONG, P.; LOMARAT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; PORNTRAKULPIPAT, S.; PARAKSA, N. *In vitro* study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, n. 228, p. 96-102. 2016

KOUDELA, B.; BOKOVA, A. Coccidiosis in goats in the Czech Republic. **Vet. Parasitol.**, 76:261–267, 1998.

KLOCKE, J. A.; DARLINGTON, M. V.; BALANDRIN, M. F. 1,8 cineole (eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia* " tchii (Asteraceae). 1987. **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, p. 2.131-2.141.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, 91, 453–462, 2001.

LEVINE, N.D. Coccidiosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 17, p.179-198, 1963.

LEVINE, N.D. Protozoan parasites of domestic animals and man. 2a ed. **Burgess publishing company**, Minnesota, Burgess, p.406, 1973.

LIMA, J.D. Eimeriose dos ruminantes. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2., Fortaleza. **Anais**. Brasília Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária: Embrapa, p. 7997, 1980.

LIMA, J. D. Coccidiose dos ruminantes domésticos **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.**, v.13, suplemento 1. Ouro Preto, MG, 2004.

MARIS, P. Modes of action of disinfectants. **Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.** 14,47–55, 1995.

MANCIBO, O. A.; ACEVEDO, C. M.; ROSSITER, A.; SUÁREZ, M. D.; GUARDIA, N.; RUSSO, A. M.; MONZÓN, C. M.; BULMAN, G. M., Coccidiosis em cabritos em la província de Formosa (Argentina). **Vet. Arg.**, v. XIX, n. 185, p. 342-348, 2002.

MONTEIRO, G.S. Parasitologia na medicina veterinária. **Editora: ROCA**, ISBN 978-85-7241-882-9. p. 141-157 São Paulo-SP, 2011.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso em: 22/01/2017 <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos/saiba-mais>.

MENEZES, R.C.A.A.; LOPES, C.W.G. Epizootologia da Eimeria arloingi em caprinos na Microrregião Serrana Fluminense. **Revista Universidade Rural, Ciência da Vida**, Rio de Janeiro, v.17, n.2, p.5-12, 1995.

MENDES, S.S; BOMFIM, R.R; JESUS, H.C; ALVES, P.B; ESTEVAM, C.S; ANTONIOLLI AR, THOMAZZI, S.M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, ISSN 0378-8741, 2010.

MC EVOY, J.D.G. Contamination of animal feeding stuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. **Anal. Chim. Acta**, 473, pp. 3–26, 2002.

MICHIELS, J.; MISSOTTEN, J.; FREMAUT, D.; DE SMET, S.; DIERICK, N. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livest. Sci.*,109, 157–160, 2007.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T.; Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.**, 7, 28-35, 2012.

NORTON, C.C. Coccidia of the domestic goats (*Capra hircus*), with notes on *Eimeria ovinoidalis* and *E. bakuensis* (syn. *E. ovina*) from the sheep *ovis aries*. **Parasitology**, NY, v.92, p.279-289, 1986.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T. **Parasitologia animal** - Animais de Produção. 1.ed. São Paulo: Epub, 273 P., 2001..

ORDAZ, J. **La coccidiosis ovina, una enfermedad que limita la producción y es causa de mortandad de cordeiros.** (2011). Acesso em: 26 de Dezembro de 2016. Disponível em: <http://www.uno.org.mx/sistema/pdf/sanidad/lacoccidiosisovinaunaenfermedad.pdf>.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J.. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum**

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology** 76, 201–214, 2001.

PEEK, H.; LANDMAN, W.J.M. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2000. **Avian Pathology**, v.32, n.4, 2003.

PLATZER, B.; PROSL, H.; CIESLICKI, M.; JOACHIM, A. Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril. **Veterinary Parasitology**, v.129, n.1-2, p.1-9, 2005.

PEIXOTO-NEVES D.; SILVA-ALVES, K.S.; GOMES, M.D.; LIMA, F.C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.; CECCATTO, V.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 24, 341-350, 2010.

REBOUÇAS, M. M.; AMARAL, V.; TUCCI, E. C.; SPOSITO FILHA, E.; ALBERTI, H.; MURAKAMI, T. O. Identificação de espécies do gênero *Eimeria* Schneider, 1875 parasitas de caprinos no estado de São Paulo, Brasil (Apicomplexa: Eimeriidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 61-64, 1992.

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54, 5062–5069, 2010.

REMMAL, A.; ACHAHBAR,S.; BOUDDINE, L. CHAMI, N.; CHAMI, F. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. **Veterinary Parasitology**. 182, p.121-126, 2011.

RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F.; Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido nordestino: controle integrado das parasitoses gastrointestinais visando contornar a resistência anti-helmíntica. **Pesq. Vet. Bras.** 33, 901-908, julho 2013.

RICE, P. J.; COATS, J. R. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), the beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). 1994. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, p. 1172-1179.

ROSA, I. M. N. Contribuição para o estudo dos parâmetros considerados importantes para a determinação das cargas parasitárias presentes em três espécies de Ruminantes (Ovinos, Caprinos e Bovinos). **Dissertação de Mestrado**. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa, 535 pp. 1996.

SAHINDURAN, S. Protozoan Diseases in Farm Ruminants. **In A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine**. Dr. Carlos C. Perez-Marin. Intech. Rijeka. 473-500, 2012.

SAMAHA, H.A.T., HAGGAG, Y.N., NOSSAIR, M.A.L.S., HABIB, H.M. Assessment of the efficiency of some chemical disinfectants used in poultry farms against coccidiosis. **AJVS** 39, 82-90, 2013.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônica** (ISSN 2179-5746) -Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SHAPIRO, L.S. Endoparasites of Large Animals. **In Pathology & Parasitology for Veterinary Technicians**. 2th Ed. Shapiro, L.S. Delmar. Clifton Park. 184, 2010.

SHEATHER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. **J Comp Ther**. 36:266-75., 1923.

SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). 2002. **Darwiniana**. 40:121-125.

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. 2012. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 7, p. 139-144.

SEQUEIRA, T. C. G. de O.; AMARANTE, A. F. T. do. Parasitologia animal: animais de produção. Rio de Janeiro: **EPUB**, 2001. 158 p.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**. Manaus. v. 38, n. 1, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. UFSC e UFRGS Ed., 821p. 2000.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. (Eds.). **Coccidiosis. Goat medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.73-79. 1994.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 277 p. 1986.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. Manual para o diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4. ed. **Tokyo: Japan Internatinal Cooperation Agency**, 143p., 1998.

VIEIRA, L. S. *Eimeria ninakohlyakimovae*. Yakimoff & Rastegaieff, 1930 Emend. Levine, 1961: biologia, ultraestrutura e aspectos clínicos da infecção em caprinos experimentalmente infectados. 135 f. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1996.

VIEIRA, L.S. Eimeriose caprina: aspectos clínicos e de controle. **Ciência animal**, v.10, n.1.p. 31-33, 2000.

VIEIRA, L.S. **Eimeriose de pequenos ruminantes: panorama da pesquisa no Nordeste do Brasil**. Série Documentos 28. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 23p., 2002.

VIEIRA, L. S.; BARROS, N. N.; CAVALCANTE, A.C.R. ; CARVALHO, R. B. A. Salinomicina para o controle da eimeriose de caprinos leiteiros nas fases de cria e recria. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.873-878, 2004.

VIEIRA, L. S. Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Sobral: Embrapa Caprinos**, 32 p., 2005.

WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, B.M.; OUCHIKH, O.; HAMD AOUI, G.; KCHOUK, E.M.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential and methanol

extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italic* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**. Volume 48, Issue 5, May, Pages 1362-1370. 2010.

WABEL, N.A., SHAMS, S., AHAMAD, A., KHAN, S.A., ANWAR, F. Essential oils used in aromatherapy: a systemic review. **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.** 5,601–611, 2015.

WILLIAMS, R.B. Laboratory tests of phenolic disinfectants as oocysticides against the chicken coccidium *Eimeria tenella*. **Vet. Rec.** 141, 447–448, 1997.