**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VITRO* DO LINALOL SOBRE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS**

Antônia Aniellen Raianne Moises **AGUIAR¹**; Jordania Oliveira **SILVA2**; Thais Ferreira **FEITOSA3**; Vinícius Longo Ribeiro **VILELA4**.

1 Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos. E-mail: ani\_raianny@hotmail.com

2 Graduanda, curso de Medicina Veterinária, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, campus Sousa. E-mail: oliveira.jordania@academico.ifpb.edu.br

3 Pós-Doutor, docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, campus Sousa. E-mail: thais.feitosa@ifpb.edu.br

4 Pós-Doutor, docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, campus Sousa; docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos. E-mail: vinicius.vilela@.ifpb.edu.br

**Resumo:** O controle dos helmintos é realizado com a utilização de anti-helmínticos, mas o uso inadequado levou ao desenvolvimento de resistência parasitária, comprometendo a eficácia dos tratamentos. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito anti-helmíntico *in vitro* do linalol sobre as larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos. No Teste de Inibição da Motilidade (TIM),

aproximadamente 100 larvas de terceiro estágio (L3) foram incubadas com diferentes concentrações de linalol (0,12% a 8%) durante 72h. Observou-se uma elevada inibição da motilidade larval, com 100% de inibição nas concentrações de 8 e 4%, significativamente superior à Ivermectina (p<0,05). Conclui-se que o linalol apresentou efeitos promissores contra helmintos *in vitro*, inibindo eficazmente a motilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

**Palavras-chave:** monoterpeno; trichostrongylidae; resistência; fitoterapia.

**Introdução:** A produção de ovinos no Brasil tem crescido, especialmente no Nordeste, onde há cerca de 21,5 milhões de cabeças. No entanto, a ovinocultura enfrenta o desafio do parasitismo ocasionado por nematódeos gastrintestinais, que afetam significativamente a saúde e bem-estar dos animais e ocasionam grandes perdas econômicas e produtivas (IBGE, 2021; BELECKĖ et al., 2021).

Tradicionalmente, o controle desses helmintos tem sido feito com o uso de anti-helmínticos, mas o uso inadequado desses fármacos ocasionou desenvolvimento de resistência parasitária, resultando em falhas nos tratamentos (FISSIHA & KINDE, 2021). Esse problema incentivou a busca por novas alternativas de controle, como a utilização de compostos bioativos de origem vegetal com potencial anti-helmíntico. Entre eles, os monoterpenos, como o linalol, têm se mostrado promissores no controle das helmintoses devido às suas propriedades bioativas (HELAL et al., 2020).

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito anti-helmíntico *in vitro* do linalol sobre as larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

**Metodologia:** Para obtenção de larvas de terceiro estágio (L3), foram feitas coproculturas conforme Roberts & O’Sullivan (1950), usando fezes de ovinos Santa Inês, naturalmente infectados. Para avaliar a inibição da motilidade das L3, foi realizado o Teste de Inibição da Motilidade (TIM). Um pré-experimento determinou a dose letal para inibir 50% da população (DL50) com Ivermectina (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/ml, resultando em uma DL50 de 0,53 mg/ml (IC95% = 0,38-0,67), utilizada no grupo controle positivo. Para a realização do ensaio, uma solução (250 μL) com aproximadamente 100 L3 foram incubadas com o mesmo volume de linalol (Sigma-Aldrich®, ≥97% de pureza), nas concentrações: 0,12% (1,25 mg/ml); 0,25% (2,5 mg/ml); 0,5% (5 mg/ml); 1% (10 mg/ml); 2% (20 mg/ml); 4% (40 mg/ml) e 8% (80 mg/ml). Água destilada foi utilizada como controle negativo e Ivermectina como controle positivo. Foram feitas 8 réplicas para cada grupo e os testes foram incubados por 72h em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD). Após esse período a motilidade das L3 foi observada usando um microscópio óptico.

A eficácia de inibição da motilidade das L3 foi determinada pela fórmula: % Inibição = (Média de larvas grupo controle − Média de larvas grupo tratado) / (Média de larvas grupo controle) x 100. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. A análise Probit foi realizada nos resultados do teste, usando o software Polo-Plus (LeOra Software, 2003) para determinação da DL50 com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

**Resultados e discussão:** Os efeitos inibitórios do linalol obtidos no TIM estão dispostos da Tabela 1, e foram considerados promissores, com uma inibição de 100% da motilidade nas maiores concentrações testadas (8% e 4%) em relação ao grupo controle negativo.

Tabela 1: Média de larvas vivas ± desvio-padrão e percentuais de inibição da motilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Concentração linalol (%) (mg/ml)**  |
| CN | CP | 0,12%(1,2 mg/ml) | 0,25%(2,5 mg/ml) | 0,5%  (5 mg/ml) | 1%  (10 mg/ml) | 2% (20 mg/ml) | 4% (40 mg/ml) | 8% (80 mg/ml) |
| Média±DP | 96,9±29,7A | 70,7±6,8B | 56,2±18,3C | 50±25,9C | 64,5±20,2C | 38,6±20,6D | 17,9±7,9D | 0±0E | 0±0E |
| % Inibição | - | 20,9 | 41,9 | 48,4 | 34,4 | 60,1 | 81,5 | 100 | 100 |

CN (Controle negativo) – Água destilada; CP (Controle positivo) – : 0,53 mg/ml de Ivermectina. Médias seguidas por letras diferentes nas linhas denotam diferença estatística (p<0,05) – Teste de Tukey.

No presente estudo, uma elevada inibição da motilidade larval foi observada mesmo nas concentrações mais baixas, superior a 80% ao utilizar a concentração de 2%, diferindo significativamente da Ivermectina (p<0,05). Esses resultados corroboram com os encontrados por Helal et al. (2020), com 87% de inibição utilizando a concentração de 1% de linalol. Um efeito inibitório acentuado (97%) também foi obtido testando 10 μg/ml (0,01 mg/ml) (Helal et al., 2022), indicando que mesmo nas concentrações mais baixas o linalol promove uma elevada taxa de inibição da motilidade das larvas infectantes. As curvas dose-resposta das diferentes concentrações do linalol sobre a inibição da motilidade das larvas infectantes estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1: Curvas dose-resposta do linalol na inibição da eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

O valor de DL50 obtido foi de 0,42% ou 4,2 mg/ml (IC 95% = 0,29–0,57). Esses resultados diferem dos achados por Helal et al. (2020) e Helal et al. (2022), que obtiveram um menor valor de DL50 (0,51–1,76%) e (0,67–0,44 μg/ml), respectivamente, ao avaliar a ação do linalol sobre a motilidade de L3 após 24h de incubação.

Tradicionalmente para avaliar a eficácia na triagem de drogas e substâncias naturais são empregadas técnicas *in vitro*. O teste de inibição da motilidade de larvas utilizado no presente estudo tem sido amplamente usado para avaliação anti-helmíntica de biocompostos. Este ensaio serve como um indicador da viabilidade dos parasitos após a exposição a diferentes moléculas ou substâncias e é considerado o padrão ouro na avaliação da atividade anti-helmíntica (RITLER, et al., 2017; PARTRIDGE et al., 2018). Surge-se que o linalol atua causando uma neurotoxicidade por meio da inibição dos receptores de acetilcolinesterase (AChE), ocasionando danos ao sistema nervoso do nematódeo e interrupção da função da membrana por meio de forte atividade lipolítica (NADEEM, 2013; LÓPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010).

**Conclusão**: O linalol demonstrou efeitos promissores contra helmintos *in vitro*, inibindo a motilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Estes resultados estão sendo avaliados para o desenvolvimento de estudos adicionais sobre a aplicação do linalol como uma alternativa para controlar infecções por helmintos em pequenos ruminantes.

**Referências Bibliográficas:**

BELECKĖ, A. et al. Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 63, n. 1, p. 18, 2021.

FISSIHA, W.; KINDE, M. Z. Anthelmintic resistance and its mechanism: a review. **Infection and Drug Resistance,** p. 5403-5410, 2021.

HELAL, M.A. et al. Microfluidic-Based Formulation of Essential Oils-Loaded Chitosan Coated PLGA Particles Enhances Their Bioavailability and Nematocidal Activity. **Pharmaceutics** v. 14, n. 10, p. 2030, 2022.

HELAL, M. A. et al. Nematocidal Effects of a Coriander Essential Oil and Five Pure Principles on the Infective Larvae of Major Ovine Gastrointestinal Nematodes In Vitro. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 740, 2020.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal** **2022**. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\_2022\_v50\_br\_informativo.pdf. Acesso em: 19 jul. 2024.

LÓPEZ, M.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 284-288, 2010.

NADEEM, M. Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum L*.). **British Food Journal**, v. 115, n. 5, p. 743-755, 2013.

PARTRIDGE, F.A. et al. An automated high-throughput system for phenotypic screening of chemical libraries on *C. elegans* and parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 1, p. 8-21, 2018.

RITLER, D.; et al. Development of a movement-based in vitro screening assay for the identification of new anti-cestodal compounds. **PLoS neglected tropical diseases,** v. 11, n. 5, p. e0005618, 2017.

ROBERTS, F.H.S.; O’SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p. 99-102, 1950.