

Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes

Essential Oils and Their Bioactive Compounds in the Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants

Weibson Paz Pinheiro André, Wesley Lyeverton Correia Ribeiro, Lorena Mayana Beserra de Oliveira, Iara Tersia Freitas Macedo, Fernanda Cristina Macedo Rondon & Claudia Maria Leal Bevilaqua

ABSTRACT

Background: Gastrointestinal nematodes are one of the major health and economic problem of sheep and goats in the world. The control of these nematodes is carried out conventionally with synthetic anthelmintics, which favored the selection of gastrointestinal nematode (GIN) populations multiresistant to anthelmintics. The emergence of anthelmintic resistance has stimulated the search for new alternatives to control small ruminant GIN, standing out the use of plants and their bioactives compounds, such as essential oils (EO). The objective of this review was to present the main characteristics and anthelmintic activity of EO, their isolated compounds and drug delivery systems in the control of GIN.

Review: Essential oils are a complex blend of bioactive compounds with volatile, lipophilic, usually odoriferous and liquid substances. EO are composed of terpenes, terpenoids, aromatic and aliphatic constituents. EO has various pharmacological activities of interest in preventive veterinary medicine such as antibacterials, antifungals, anticoccidials, insecticides and anthelmintics. *In vitro* and *in vivo* tests are used to validate the anthelmintic activity of EO on GIN. *In vitro* tests are low cost screening tests that allow the evaluation of the anthelmintic activity of a large amount of bioactive compounds on eggs, first (L1) and third stage larvae (L3), and adult nematodes. The antiparasitic effect of EO is related to its main compound or to the interaction of the compounds. These bioactive compounds penetrate the cuticle of the nematodes by transcuticular diffusion, altering the mechanisms of locomotion, besides causing cuticular lesions. Following *in vitro* evaluation, the acute and sub-chronic toxicity test should be performed to assess the toxicity of the bioactive compounds and to define the dose to be used in *in vivo* tests. *In vivo* tests are more reliable because the anthelmintic effectiveness of bioactive compounds is evaluated after the metabolization process. The metabolization process of the bioactive compounds can generate metabolites that exhibit or not anthelmintic effectiveness. The *in vivo* tests assessing the anthelmintic effectiveness of bioactive compounds in sheep and goats are the fecal egg count reduction test and the controlled test. OE promoted reduction of egg elimination in faeces which may be related to cuticular and reproductive alterations in GIN, and reduction of parasite burden in *in vivo* tests. Due to the promising results obtained with OE in the *in vivo* tests, interest has been aroused in using nanotechnology as an alternative to increase the bioavailability of OE and consequently, potentializing its anthelmintic effect, reducing the dose and toxicity of the biocompounds. In addition to nanotechnology, the isolation and chemical modification of compounds isolated from OE have been employed to obtain new molecules with anthelmintic action and understand the mechanism of action of EO on the small ruminant GIN.

Conclusion: The use of EO and their compound bioactive in the control of resistant populations of GIN is a promising alternative. The adoption of strategies in which natural products can replace synthetic anthelmintics, such as in dry periods and use synthetic anthelmintics in the rainy season when the population in refugia in the pasture is high, thus reducing the dissemination of GIN resistant populations. As perspective, the evaluation of pharmacokinetics and pharmacodynamics of these natural products should be performed so that one defines treatment protocols that optimize the anthelmintic effect.

Keywords: small ruminant, gastrointestinal nematodes, herbal medicines, nanotechnology.

Descritores: pequenos ruminantes, nematoides gastrintestinais, plantas medicinais, nanotecnologia.

DOI: 10.22456/1679-9216.81804

Received: 14 October 2017

Accepted: 27 December 2017

Published: 17 January 2018

Laboratório de Doenças Parasitárias (LABODOPAR), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. CORRESPONDENCE: W.P.P. André [weibsonpaz@hotmail.com - Tel.: +55 (85) 31019853]. LABODOPAR, Faculdade de Veterinária, PPGCV, UECE. Av. Dr. Silas Munguba n. 1700. Campus do Itaperi. CEP 60.714-903 Fortaleza, CE, Brazil.

I. INTRODUÇÃO

II. ÓLEOS ESSENCIAIS

III. EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

IV. COMPOSTOS ISOLADOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS COM AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA

V. NANOTECNOLOGIA APLICADA A ÓLEOS ESSENCIAIS COM AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA

VI. CONCLUSÃO

I. INTRODUÇÃO

Nematoides gastrintestinais (NGI) são responsáveis por comprometer o bem-estar e a sanidade animal, ocasionando grandes perdas econômicas para ovinocaprinocultura mundial [27,77]. O controle das nematodioses tem sido realizado convencionalmente com anti-helmínticos sintéticos e semissintéticos há mais de 50 anos [27]. Entretanto, o uso inadequado desses fármacos favoreceu a seleção de populações de NGI resistentes e multirresistentes a anti-helmínticos em diferentes regiões do mundo [46,87].

A disseminação da resistência anti-helmíntica e o longo tempo necessário para o desenvolvimento de uma nova molécula com ação antiparasitária [22] impuseram a busca por alternativas de controle sustentável e ecologicamente correto [24]. Estas alternativas devem ser empregadas combinando os três princípios básicos: 1) gestão dos sistemas de pastoreio; 2) estimulação da resposta do hospedeiro; 3) modulação da biologia dos nematoides [37]. São exemplos de alternativas de controle: manejo de pastagem, manejo nutricional, seleção genética de animais resistentes aos nematoides, controle biológico (fungos nematófagos), administração de vacinas, suplementação com minerais (cobre e ferro), fornecimento de vitaminas, utilização de nutracêuticos e fitoterapia [7,36,45].

A utilização de plantas na medicina veterinária é baseada no conhecimento etnoveterinário [85] e pode ser uma alternativa eficaz no controle de NGI, visto que extratos vegetais [19,40,65], decoctos [21,55,81] e óleos essenciais (OE) [53,77,82] apresentaram efeito anti-helmíntico promissor. Os OE também são utilizados na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos. Devido ao aumento da utilização dos OE e de seus compostos bioativos na agricultura, saúde humana e animal, a demanda por esses produtos tem aumentado nos últimos anos [18,72,78].

Desta forma, o objetivo desta revisão é discutir a utilização de OE e de seus compostos bioativos no controle de NGI, abordando as suas principais características, descrevendo a sua atividade anti-helmíntica e a aplicabilidade da nanotecnologia para aumentar a eficácia anti-helmíntica desses produtos naturais.

II. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OE são derivados do metabolismo secundário das plantas, cuja função é de defesa contra agentes patogênicos, além de conferir proteção contra os herbívoros e atrair polinizadores [6,29]. Os OE são misturas complexas de compostos bioativos que apresentam substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas [88]. Os OE são compostos por cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações, contudo apenas dois ou três componentes principais se apresentam em concentrações elevadas (20-70%) e os outros em concentrações vestigiais. Geralmente os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos OE [73].

Os OE são compostos por dois grupos de substâncias de origem biossintética diferente. O grupo principal é composto pelos terpenos e terpenóides e sua biossíntese ocorre a partir do ácido mevalônico e 3-fosfoglicerato [73,75]. Os terpenos são hidrocarbonetos compostos por unidades de isopreno (C₅) e são classificados de acordo com a junção de unidades de isopreno, sendo os principais grupos, os monoterpênicos, que são responsáveis pela constituição de 90% dos OE, e os sesquiterpenos. São exemplos de monoterpênicos: ascaridol, carvacrol, carvona, timol, citronelal, limoneno, entre outros. Dentre os sesquiterpenos destacam-se: β -cariofileno, bisabolol, cedrol, farnesol, carotol, entre outros [6]. O segundo grupo são os constituintes aromáticos e alifáticos que são sintetizados a partir do ácido chiquímico ou ácido mevalônico [73,75]. Estes compostos são encontrados em menor frequência nos OE, como o eugenol e anetol que são os representantes desse segundo grupo [6].

Vários fatores podem influenciar na composição e rendimento dos OE, como clima, temperatura, composição do solo, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica a que a planta está submetida, além de ataque de patógenos, idade da planta, horário de coleta, órgão utilizado para extração e tipo de extração.

A extração dos OE pode ser realizada a partir dos órgãos (flores, brotos, caules, folhas, frutos, se-

mentes e raízes) das plantas aromáticas [72,78] e por meio das técnicas de destilação a vapor, hidrodestilação (as plantas entram em contato direto com a água), prensagem a frio e por solvente [6,54,78]. O método de extração influencia diretamente na composição final dos OE, sendo indicada a extração a vapor e a hidrodestilação para extração de OE ricos em terpenos e derivados de fenilpropanóides [6].

Os OE apresentam diversas atividades farmacológicas de interesse na medicina veterinária, como ação antibacteriana [67,86], antifúngica [15,66], coccidíaca [41,79], carrapaticida [12,74] e anti-helmíntica [23,54,82].

A ação anti-helmíntica dos OE tem sido atribuída aos seus compostos majoritários ou a uma relação aditiva ou sinérgica dos compostos [42]. A interação (sinergismo, adição e antagonismo) dos biocompostos isolados de OE que apresentaram ação anti-helmíntica tem sido proposta como uma alternativa para obter novas formulações com eficácia anti-helmíntica [42,63]. Um estudo avaliando a atividade ovicida de 10 compostos majoritários (anetol, carvona, carvacrol, cineol, limoneno, linalol, timol, cinamaldeído, eugenol e vanilina) isolados de OE sobre *H. contortus*, combinados de forma binária, terciária e quaternária, indicaram que as melhores associações obtidas foram cinamaldeído + carvacrol e anetol + carvona [42].

Os compostos bioativos presentes nos OE podem interagir com receptores presentes nos diferentes estágios de vida dos NGI [59,68]. Possivelmente, a atuação dos compostos bioativos sobre múltiplos receptores nos NGI pode retardar o aparecimento de populações resistentes aos biocompostos e controlar populações multirresistentes aos anti-helmínticos sintéticos.

A composição do OE é um dos fatores que podem interferir na sua atividade anti-helmíntica. Estudos que avaliaram o efeito do OE de *Eucalyptus staigeriana* sobre NGI identificaram o limoneno [62,84] ou o geranial [82,83] como compostos ma-

oritários. Já o OE de *Piper aduncum* quando avaliado sobre *H. contortus* apresentou como composto majoritário o eucaliptol [71] ou o dilapiol [25]. A caracterização dos quimiotipos dos OE (caracterização dos genótipos das plantas utilizadas para extração dos OE de acordo com seus componentes majoritários e origem geográfica) [49] pode ser uma estratégia a ser adotada para padronização dos estudos que avaliam a ação anti-helmíntica.

III. EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Para validar a atividade anti-helmíntica dos OE são realizados estudos que vão desde as prospecções dos saberes populares aos testes de eficácia na espécie animal alvo [10]. Na seleção de plantas ricas em OE com atividade anti-helmíntica, utilizam-se ferramentas tais como: levantamento etnofarmacológico ou etnoveterinário, *screening* de plantas e filogenética ou quimiotaxonomia [1,50].

A maioria dos estudos que avaliam a atividade anti-helmíntica de OE baseiam-se em testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* são realizados principalmente com ovos e larvas de *H. contortus* devido à praticidade, pois até o presente não foram estabelecidas técnicas *in vitro* que permitam o desenvolvimento dos NGI do estágio de ovo a adulto, como observado para o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Os testes *in vitro* foram desenvolvidos para detecção de populações de NGI resistentes aos anti-helmínticos sintéticos e, posteriormente, foram adaptados para avaliar a atividade anti-helmíntica das plantas e seus compostos bioativos. Esses testes apresentam baixo custo e são executados rapidamente, sendo utilizados na triagem de uma grande quantidade de plantas e seus compostos bioativos. Além de ovos e larvas de primeiro estágio (L1), larvas de terceiro estágio (L3) e nematoides adultos têm sido utilizados [60,70]. Os principais resultados obtidos em testes *in vitro* com OE estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade *in vitro* de óleos essenciais sobre nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Óleo essencial	Composto majoritário	Ensaio	CE ₅₀ / CE*	Referência
<i>Ocimum gratissimum</i>	Eugenol	TEO	0,5%	Pessoa et al. [76]
<i>Lippia sidoides</i>	Timol	TEO	0,4 mg/mL	Camurça-Vasconcelos et al. [9]
		TDL	2,9 mg/mL	
<i>Croton zehntneri</i>	Anetol	TEO	0,7 mg/mL	Camurça-Vasconcelos et al. [9]
		TDL	1,3 mg/mL	

(continua...)

(...continuação)

<i>Eucalyptus staigeriana</i>	Limoneno	TEO	0,3 mg/mL	Macedo et al. [53]
		TDL	1,7 mg/mL	
<i>Mentha piperita</i>	Mentol	TEO	0,2 mg/mL	Katiki et al. [44]
		TDL	0,2 mg/mL	
		TD	61,9 mg/mL	
		TIAL	0,07 mg/mL	
<i>Cymbopogon martinii</i>	Geraniol	TEO	0,1 mg/mL	Katiki et al. [44]
		TDL	0,5 mg/mL	
		TD	28,1 mg/mL	
		TIAL	0,03 mg/mL	
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Geraniol	TEO	0,04 mg/mL	Katiki et al. [44]
		TDL	0,04 mg/mL	
		TD	24,6 mg/mL	
		TIAL	0,009 mg/mL	
<i>Artemisia lancea</i>	Eucaliptol	TEO	1,8 mg/mL	Zhu et al. [92]
		TDL	1,6 mg/mL	
<i>Piper aduncum</i>	Eucaliptol	TEO	2,4 mg/mL	Oliveira et al. [71]
<i>Arisaema franchetianum</i>	Linalol	TEO	1,6 mg/mL	Zhu et al. [93]
		TDL	1,1 mg/mL	
<i>Zanthoxylum simulans</i>	Borneol	TEO	3,9 mg/mL	Qi et al. [77]
		TDL	4 mg/mL	
<i>Ruta chalepensis</i>	2-undecanone	TEO	0,1 mg/mL	Akkari et al. [2]
		TMA	1 mg/mL*	
<i>Citrus sinensis</i>	Limoneno	TEO	0,2 mg/mL	Gáinza et al. [24]
		TDL	0,9 mg/mL	
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Longifolene	TEO	1,5 mg/mL	Gáinza et al. [24]
		TDL	0,4 mg/mL	
<i>Cymbopogon citratus</i>	Citral	TEO	0,14 mg/mL	Macedo et al. [58]
		TDL	1,92 mg/mL	
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	TEO	0,43 mg/mL	Ferreira et al. [23]
		TDL	0,062 mg/mL	
		TMA*	5 mg/mL*	
<i>Piper aduncum</i>	Dilapiol	TEO	5,7 mg/mL	Gainza et al. [25]
		TDL	0,1 mg/mL	
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpine-4-ol	TEO	0,43 mg/mL	Grando et al. [32]
		TIML	10,68 mg/mL	
<i>Hesperozygis myrtooides</i>	Isomentona	TEO	0,249 mg/mL	Castilho et al. [11]
		TDL	0,07 mg/mL	

TEO= Teste de eclosão de ovos; TDL= Teste de desenvolvimento larvar; TD= Teste de desbainhamento larvar; TIAL= Teste de inibição da alimentação larvar; TIML= Teste de Inibição da Migração Larvar; TMA= Teste de motilidade de nematoides adultos CE₅₀= Concentração Capaz de Inibir em 50% a eclosão de ovos e desenvolvimento das larvas; *CE = Concentração efetiva no TMA.

No teste de eclosão de ovos (TEO), os OE inibem o desenvolvimento embrionário das larvas [54] ou inativam as enzimas (proteases, lipases, quitinases, beta-glicosidase e leucina aminopeptidase) que são responsáveis pela degradação da casca dos ovos durante a eclosão das larvas [64].

O teste de desenvolvimento larvar (TDL) verifica se o OE possui capacidade de inibir o desenvolvimento larvar [39]. Neste caso, a ação larvicida dos OE pode estar relacionada a lesões cuticulares [28] ou a alterações no sistema nervoso dos nematoides [6]. Além do TDL são utilizados dois outros testes que avaliam a ação de OE sobre larvas: o teste de inibição da alimentação larvar (TIAL) e o teste de desembainhamento de larvas [44]. O TIAL consiste em avaliar se os OE ocasionam a paralisia da musculatura do esôfago das L1, inibindo a alimentação [3]. Já o teste de desembainhamento larvar é específico para avaliar a inibição do desembainhamento das L3 pelos taninos [69]. Entretanto, verificou-se que os OE podem bloquear o processo de desembainhamento das L3, contribuindo para reduzir a taxa de estabelecimento dessas larvas e, conseqüentemente, reduzir a carga parasitaria dos animais [44]. Contudo, o mecanismo de ação dos OE sobre a inibição do desembainhamento larvar ainda não foi esclarecido.

Estudos mais recentes têm utilizado o teste de motilidade de adultos (TMA) para avaliar o efeito de OE, visto que esses produtos naturais são lipofílicos e apresentam baixo peso molecular, sendo capazes de penetrar na cutícula dos nematoides por difusão transcútica [6,21], alterando os mecanismos de locomoção [68], além de ocasionar lesões cuticulares [4,5]. Entre os fatores limitantes do TMA, destacam-se a necessidade de eutanasiar um animal infectado com NGI e a manutenção dos nematoides em estufa de CO₂ [4,38]. Apesar desses fatores limitantes, a manutenção dos nematoides adultos vivos por 24 h é o tempo necessário para avaliar se os biocompostos inibem a motilidade desses parasitos. É importante ressaltar que o TMA é o único ensaio *in vitro* que permite avaliar a ação anti-helmíntica dos OE sobre o estágio de vida parasitaria do nematoide que é alvo dos anti-helmínticos sintéticos, o nematoide adulto [2,23]. Entretanto, os nematoides são mantidos em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 37°C e 5% de CO₂, condições que dificultam a manutenção da viabilidade dos parasitos por mais de 48 h. A formulação de um meio que simule as condições do abomaso (pH ácido, temperatura, CO₂ e nutrientes) seria

o ideal para manutenção desses nematoides por um maior período.

Os testes *in vitro* devem ser realizados com populações de NGI com nível de resistência anti-helmíntica conhecida, pois as concentrações efetivas dos compostos bioativos sobre isolados de *H. contortus* multirresistentes podem ser superiores às concentrações efetivas dos compostos bioativos sobre isolados sensíveis. A utilização de OE para o controle de *H. contortus* sensível e multirresistente a anti-helmínticos sintéticos indica que os isolados resistentes são naturalmente capazes de tolerar os metabólitos secundários das plantas [13,14,25]. A avaliação da tolerância dos nematoides aos produtos naturais pode ser baseada no cálculo da razão de resistência (RR) de cada isolado de *H. contortus* resistente em relação ao isolado sensível, a partir dos valores de CE₅₀ (capacidade de inibir em 50%) obtido nos testes *in vitro* sobre ovos e larvas [13,14].

Os OE que apresentaram efeito promissor *in vitro* são submetidos aos testes de toxicidade em roedores [82]. Estudos que avaliaram o OE de *Eucalyptus citriodora* e *E. staigeriana* em camundongos demonstraram que esses óleos apresentam baixa toxicidade aguda [53,54]. No teste de toxicidade sub-crônica, não foram registradas alterações hematológicas, bioquímicas ou histopatológicas em ratos [53,82].

O OE de *Melaleuca alternifolia* e seu composto majoritário, o terp-4-ol, não apresentaram toxicidade nas doses de 0,75 e 0,5 mL/kg, respectivamente, quando administrado por via oral em *Meriones unguiculatus* (gerbil) [31]. Em ovinos, o OE de *Cymbopogon schoenanthus*, nas doses de 180 e 320 mg/kg, não causou alterações bioquímicas ou hematológicas [43]. Os resultados desses estudos demonstram que os óleos apresentam baixa toxicidade, mas estudos toxicológicos sempre devem ser realizados em roedores e na espécie alvo do estudo para confirmar a segurança desses compostos bioativos [10].

Apesar de ainda não existir um protocolo específico que estabeleça uma dose segura a ser utilizada na espécie alvo, pode-se utilizar como base a dose letal para 10% (DL₁₀) dos camundongos obtida em testes de toxicidade aguda [4,53,82], ou mesmo, realizar um pré-teste em ovinos para definir a dose eficaz e que não seja tóxica [23,43]. De acordo com os estudos realizados em pequenos ruminantes, a dose de OE utilizada para o controle de NGI variou de 250 a 600 mg/kg [4,23,43,53,89].

Alguns OE apresentaram resultados promissores *in vitro*, porém os resultados nem sempre se reproduzem nos testes *in vivo* [8,23,31,43]. Nos ensaios *in vitro*, os nematoides são expostos diretamente aos compostos bioativos, enquanto nos testes *in vivo*, a metabolização dos óleos pode diminuir a concentração dos biocompostos na corrente sanguínea e nos tecidos do trato gastrintestinal [26]. A concentração dos biocompostos que atinge os parasitos vai influenciar na eficácia anti-helmíntica do produto [47]. Desta forma, estudos farmacocinéticos devem ser realizados para a determinação da biodisponibilidade dos OE nos pequenos ruminantes e a adoção de medidas que potencializem a ação anti-helmíntica desses produtos naturais.

Os testes realizados em ovinos e caprinos são fundamentais para comprovação do efeito anti-helmíntico dos OE [53,80]. Entretanto, a utilização de gerbis (*M. unguiculatus*) como um teste de triagem poderá auxiliar a avaliação da ação anti-helmíntica dos compostos bioativos, visto que o estômago desses roedores apresenta semelhança histológica com o abomaso de pequenos ruminantes, permitindo albergar uma infecção experimental de *H. contortus* após imunossupressão [17,58,84,89].

Os testes *in vivo* utilizados para avaliação da ação anti-helmíntica em pequenos ruminantes são: o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (RCOF) [16] e o teste controlado [91]. O RCOF estima

a eficácia anti-helmíntica de um produto pela comparação da contagem de ovos nas fezes antes e após o tratamento [90]. Experimentos constataram redução na eliminação de ovos nas fezes (OPG) e/ou na carga parasitária de pequenos ruminantes após a administração de OE [8,53,57,62]. Os principais resultados obtidos em testes *in vivo* com OE estão na Tabela 2.

A redução do OPG de pequenos ruminantes tratados com OE [54,80] pode estar associada a alterações cuticulares e no sistema reprodutor de *H. contortus* [4]. O comprometimento do sistema reprodutor de nematoides pode reduzir o OPG [35], por meio da redução da fecundidade das fêmeas ou mortalidade diminuindo, consequentemente, a contaminação da pastagem e as taxas de infecção dos animais [34,61].

O teste controlado é o ensaio mais confiável para avaliar a atividade anti-helmíntica de produtos naturais, como os OE, pois compara a carga parasitaria de animais tratados e não tratados. Entretanto, é mais caro em termos de requerimentos de mão-de-obra e custo dos animais, além de ser laborioso [10].

Experimentos indicam que a atividade anti-parasitária dos OE é decorrente do efeito dos seus compostos majoritários [9,77,93]. Entretanto, a ação anti-helmíntica dos OE também pode estar associada com sinergismo existente entre os seus constituintes [42,59]. Desta forma, o isolamento e a avaliação da ação anti-helmíntica dos constituintes dos OE pode ser uma alternativa para a obtenção de novas moléculas.

Tabela 2. Atividade anti-helmíntica *in vivo* de óleos essenciais sobre nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Óleo essencial	Componente*	Ensaio	Dose	Hospedeiro/ Tipo de infecção	Eficácia	Referência
<i>Lippia sidoides</i>	-	RCOF TC	283 mg/kg 283 mg/kg	Ovinos/Natural	45,9%	Camurça-Vasconcelos et al.[8]
Emulsão de óleo de laranja	-	RCOF	600 mg/kg	Ovinos/ Experimental com <i>H. contortus</i> Gerbil/	97,5%	Squires et al. [89]
Emulsão de óleo de laranja	-	TC	1200 mg/kg	Experimental com <i>H. contortus</i>	87,8%	Squires et al. [89]
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	Limoneno	RCOF	500 mg/kg	Caprinos/ Natural	76,5%	Macedo et al. [53]
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Geraniol	TC	360 mg/kg	Ovinos/ Experimental com <i>H. contortus</i> Gerbil/	Sem eficácia	Katiki et al. [43]
<i>Cymbopogon citratus</i>	Citral	TC	800 mg/kg	Experimental com <i>H. contortus</i> Ovinos/	38,6%	Macedo et al. [58]
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	RCOF	300 mg/kg	Experimental com <i>H. contortus</i>	Sem eficácia	Ferreira et al. [23]

*Componente Majoritário; RCOF= Teste de redução da contagem de ovos nas fezes; TC= Teste controlado.

IV. ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE COMPOSTOS ISOLADOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação, o isolamento e a avaliação da ação anti-helmíntica dos constituintes dos OE têm contribuído para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos e a síntese de novas moléculas [4,23].

Os resultados obtidos em testes *in vitro* com compostos isolados de OE sobre *H. contortus* estão descritos na Tabela 3. O eucaliptol (1,8-cineol) é o composto majoritário do OE de mais de uma planta. Entretanto, o isolamento e avaliação da sua eficácia sobre NGI baseou-se apenas em ensaios *in vitro*, como TEO e TDL [92], sendo necessário verificar sua ação anti-helmíntica em pequenos ruminantes.

Carvacrol e timol apresentaram atividade ovicida, larvicida e adulticida sobre *H. contortus* [4,5,23]. Estudos realizados para avaliar o mecanismo de ação desses monoterpenos em *C. elegans* demonstraram que esses monoterpenos têm ação sobre receptores de tiramina, inibindo a motilidade e o bombeamento da faringe desse nematoide de vida livre [48]. A ação do timol sobre receptores glutamato associado com cloro (GluCl) de *Schistosoma mansoni* expressos em oócitos de *Xenopus laevis* confirmaram a ação moduladora desse monoterpeno sobre esses receptores [51]. Os resultados são preliminares, sendo necessária a avaliação do timol em receptores de tiramina e canais de cloro com portão glutamato do sistema nervoso de NGI de pequenos ruminantes.

Os compostos fenólicos, carvacrol e timol, apresentaram efeito anti-helmíntico promissor. Entretanto, o processo de acetilação (substituição do radical hidroxila pelo radical acetil) desses compostos pode potencializar a atividade biológica e reduzir a toxicidade [4,5]. Os derivados acetilados do carvacrol, acetato de carvacrila, e do timol, acetato de timila, apresentaram atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo*, reduzindo o OPG de ovinos em 76,2% e 65,9%, respectivamente [4,5]. Timol na dose de 250 mg/kg reduziu o OPG de ovinos em 59,8% [5]. A modificação química dos compostos bioativos de OE pode ser uma alternativa para a obtenção de moléculas semissintéticas com atividade anti-helmíntica.

Apesar dos compostos isolados dos OE estarem se destacando como candidatos promissores para o controle do parasitismo gastrintestinal, esses biocompostos não são classificados como fitoterápicos, impedindo a sua utilização na agricultura orgânica e aumentando a possibilidade de desenvolvimento da resistência anti-helmíntica pelos nematoides, pois possivelmente possuem apenas um sítio de ação.

A utilização de OE e de seus compostos isolados vem se destacando como uma alternativa para o controle de NGI, entretanto, diversos estudos têm utilizado a nanotecnologia na tentativa de obter uma formulação mais estável [33], menos tóxica e com maior eficácia anti-helmíntica [62,82].

Tabela 3. Atividade *in vitro* de compostos isolados de óleos essenciais sobre nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Composto	Classificação	Ensaio	CE ₅₀ /CE*	Referência
Eugenol	Composto aromático	TEO	5%	Pessoa et al. [76]
Timol	Monoterpeno	TEO	0,5 mg/mL	Camurça-Vasconcelos et al. [9]
		TDL	2,4 mg/mL	
Anetol	Composto aromático	TEO	0,6 mg/mL	Camurça-Vasconcelos et al. [9]
		TDL	2,1 mg/mL	
Cânfora	Monoterpeno	TDL	7,8 mg/mL	Zhu et al. [93]
Eucaliptol	Monoterpeno	TEO	4,6 mg/mL	Zhu et al. [92]
		TDL	5 mg/mL	
B-elemene	Sesquiterpeno	TDL	32,1 mg/mL	Qi et al. [77]
Citral	Monoterpeno	TEO	0,13 mg/mL	Macedo et al. [58]
		TDL	1,37 mg/mL	

(continua...)

(...continuação)

Borneol	Monoterpeno	TEO	1,5 mg/mL	Qi et al. [77]
		TDL	1,9 mg/mL	
Timol	Monoterpeno	TEO	0,43 mg/mL	Ferreira et al. [23]
		TDL	0,125 mg/mL	
Terpine-4-ol	Monoterpeno	TEO	0,6 mg/mL	Grando et al. [32]
Carvacrol	Monoterpeno	TEO	0,1 mg/mL	Andre et al. [4]
		TDL	0,2 mg/mL	
		TMA*	200 µg/mL*	

TEO= Teste de eclosão de ovos; TDL= Teste de desenvolvimento larvar; CE₅₀= Concentração Capaz de Inibir em 50% a eclosão de ovos e desenvolvimento das larvas; *CE= Concentração efetiva do TMA.

V. NANOTECNOLOGIA APLICADA A ÓLEOS ESSENCIAIS COMAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA

A utilização do nanoencapsulamento com biopolímeros tem sido proposta como uma alternativa para potencializar o efeito anti-helmíntico dos OE. A proteção conferida por biopolímeros poderá reduzir a volatilidade dos OE, além de proteger contra degradação ruminal e promover liberação controlada no pH abomasal. A liberação sustentada possivelmente aumentará a biodisponibilidade dos OE, reduzindo a dose a ser administrada, e potencializando o efeito anti-helmíntico [20,80,84].

Estudos que avaliaram a atividade anti-helmíntica do OE de *E. staigeriana* nanoencapsulado utilizaram como biopolímero a quitosana [62,84] e um nanocarreador lipídico [31,32]. A definição da matriz a ser utilizada é de fundamental importância, pois fatores como eficiência de encapsulamento, liberação controlada do OE em uma faixa de pH abomasal (3,5-4,5) e tipo de formulação (líquido ou sólido) são fatores que podem inviabilizar a utilização do produto em ovinos e caprinos.

O nanoencapsulamento do OE de *M. alternifolia* com lipídeos não potencializou a atividade ovicida e larvicida sobre *H. contortus*. Provavelmente porque a liberação do óleo nanoencapsulado ocorre de maneira lenta e gradual, diferindo do óleo livre que rapidamente alcança concentrações elevadas [31]. A avaliação de OE nanoencapsulado em testes *in vitro* deve ser realizada com cautela, visto que o pH do meio pode influenciar a liberação controlada das substâncias, devendo os testes serem realizados em pH adequado e em um intervalo de tempo que permita a liberação do óleo carregado pelas nanopartículas [31,84].

A eficácia anti-helmíntica do OE de *M. alternifolia* livre e nanoencapsulado com lipídeos, e do seu composto majoritário, o terpinen-4-ol, em gerbis infectados experimentalmente com *H. contortus*, ocasionou redução da carga parasitária em 46,3, 48,6 e 43,1%, respectivamente [31]. Já a OE de *E. staigeriana* livre e nanoencapsulado com quitosana na dose de 500 mg/kg sobre gerbis infectados experimentalmente com L3 de *H. contortus*, promoveu redução de 46,5 e 40,5%, respectivamente [84]. Esses resultados indicam a necessidade de avaliar outros biopolímeros ou nanocarreadores que permitam liberação controlada do óleo no pH (1,3) do estômago dos gerbis.

A ação do OE de *E. staigeriana* encapsulado com quitosana (hidrogel) na dose de 365 mg/kg reduziu em 83,75% a carga parasitária de *H. contortus* em ovinos infectados experimentalmente com NGI [62]. Enquanto o OE de *Cymbopogon citratus* livre e nanoencapsulado com quitosana (nanoemulsão) apresentaram efeito de 48,9 e 69,2%, respectivamente, sobre a redução da carga parasitária de *H. contortus* [52].

O OE de *E. staigeriana* nanoencapsulado com quitosana apresentou efeito semelhante ao levamisol no controle integrado de NGI de ovinos, utilizando o Famacha. O experimento foi realizado durante 6 meses em uma fazenda na região semiárida do nordeste brasileiro [83]. Porém, a avaliação de produtos naturais, especificamente OE livres e nanoencapsulados, em condições epidemiológicas diferentes é fundamental para validar o potencial anti-helmíntico dos OE nanoencapsulados.

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A utilização de OE no controle de populações de NGI resistentes tem se destacado como uma alternativa promissora. Os estudos avaliando a ação anti-helmíntica dos OE e de seus compostos bioativos não indicaram um OE que apresentasse eficácia de 95%, como indicado para os anti-helmínticos sintéticos e semissintéticos. Entretanto, os OE livres e nanoencapsulados ou seus compostos bioativos que apresentaram eficácia de 60-70% podem ser utilizados em períodos estratégicos, como aqueles com menor precipitação pluviométrica, e, conseqüentemente, menor contaminação das pastagens; e os anti-helmínticos sintéticos em estações chuvosas quando a população *in refugia* na pastagem é elevada. A associação de OE e anti

-helmínticos pode ser uma alternativa para reduzir a pressão de seleção em populações de NGI resistentes aos anti-helmínticos, além de reduzir os resíduos desses fármacos nos produtos de origem animal.

Como perspectiva, a avaliação de novas matrizes poliméricas deve ser realizada na tentativa de potencializar a eficácia anti-helmíntica dos OE e dos seus compostos bioativos. Além disso, estudos avaliando a farmacocinética e farmacodinâmica de OE livres e nanoencapsulados, além dos seus compostos isolados, devem ser realizados para que se possa definir protocolos terapêuticos que otimizem o efeito anti-helmíntico.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Acharya J., Hildreth M.B. & Neil R. 2014. *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 201(1-2): 75-81.
- 2 Akkari H., Ezzine O., Dhahri S., B'chir F., Rezik M., Hajaji S., Darghouth M.A., Jamâa M.L.B. & Gharbi M. 2015. Chemical composition, insecticidal and *in vitro* anthelmintic activities of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products*. 74: 745-751.
- 3 Álvarez-Sánchez M.A., Pérez García J., Bartley D., Jackson F. & Rojo-Vázquez F.A. 2005. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology*. 110(1): 56-61.
- 4 Andre W.P.P., Ribeiro W.L.C., Cavalcante G.S., Santos, J.M.L., Macedo I.T.F., Paula H.C.B., Freitas R.M., Morais S.M., Melo J.V. & Bevilaqua C.M.L. 2016. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*. 218: 52-58.
- 5 André W.P.P., Cavalcante G.S., Ribeiro W.L.C., Santos J.M.L., Macedo I.T.F., Paula H.C.B., Morais S.M., Melo J.V. & Bevilaqua C.M.L. 2017. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 22(3): 323-330.
- 6 Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2): 446-475.
- 7 Besier R.B., Kahn L.P., Sargison N.D. & Van Wyk J.A. 2016. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Advances in Parasitology*. 93: 2-39.
- 8 Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Braga R.R., Silva R.A., Vieira L.S. & Navarro A.M.C. 2008. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*. 154(1-2): 167-170.
- 9 Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Braga R.R., Silva R.A. & Vieira L.S. 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*. 148(3-4): 288-294.
- 10 Camurça-Vasconcelos A.L.F., Morais S.M., Santos L.F.L., Rocha M.F.G. & Bevilaqua C.M.L. 2005. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 7(3): 97-106
- 11 Castilho C.V.V., Fantatto R.R., Gaínza Y.A., Bizzo H.R., Barbi N., Leitão S.G. & Chagas A.C.S. 2017. *In vitro* activity of the essential oil from *Hesperozygis myrtooides* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 27: 70-76.
- 12 Chagas A.C.S., Oliveira M.C.S., Giglioti R., Santana R.C.M., Bizzo H.R., Gama P.E. & Chaves F.C.M. 2016. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7(3): 427-432.

- 13 Chan-Pérez J.I., Torres-Acosta J.F.F., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Castañeda-Ramírez G.S., Vilarem G. & Mathieu C. 2016. *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology*. 217: 53-60.
- 14 Chan-Pérez J.I., Torres-Acosta J.F.F., Sandoval-Castro C.A., Castañeda-Ramírez G.S., Vilarem G., Mathieu C. & Hoste H. 2017. Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L3 larvae. *Veterinary Parasitology*. 240: 11-16.
- 15 Cleff M.B., Meinerz A.R.M., Madrid I., Fonseca A.O., Alves G.H., Meireles M.C.A. & Rodrigues M.R.A. 2012. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*. 14(1): 43-49.
- 16 Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A. & Waller P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 44(1-2): 35-44.
- 17 Conder G.A., Johnson S.S., Hall A.D., Fleming M.W., Mills M.D. & Guimond P.M. 1992. Growth and development of *Haemonchus contortus* in jirds, *Meriones unguiculatus*. *Journal of Parasitology*. 78(3): 492-497.
- 18 Cruz B.C., Buzzulini C., Lopes W.D.Z., Maciel W.G, Bichuette M.A., Felippelli G., Teixeira W.F.P., Soares V.E., Gomes L.V.C., Prando L., Campos G.P. & Costa A.J. 2015. Effects of different spray formulations on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested. *Preventive Veterinary Medicine*. 122(1-2): 70-75.
- 19 Domingues L.F., Giglioti R., Feitosa K.A., Fantatto R.R., Rabelo M.D., Oliveira M.C.S., Bechara G.H., Oliveira G.P., Barioni Junior W. & Chagas A.C.S. 2013. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. *Veterinary Parasitology*. 197(1-2): 263-270.
- 20 Donsi F., Annunziata M., Sessa M. & Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Food Science and Technology*. 44(9): 1908-1914.
- 21 Eguale T., Tadesse D. & Giday M. 2011. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 137(1): 108-113.
- 22 Epe C. & Kaminsky R. 2013. New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends in Parasitology*. 29(3): 129-134.
- 23 Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., França S.C., Contini S.S.H.T., Chagas A.C.S. & Belebony R.O. 2016. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Parasitology*. 288: 70-76.
- 24 Gaínza Y.A., Domingues L.F., Perez O.P., Rabelo M.D., López E.R. & Chagas A.C.S. 2015. Anthelmintic activity *in vitro* of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Industrial Crops and Products*. 76: 647-652.
- 25 Gaínza Y.A., Fantatto R.R., Chaves F.C.M., Bizzo H.R., Esteves S.N. & Chagas A.C.S. 2016. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 25(4): 383-393.
- 26 Gamboa G.V.U., Palma S.D., Lifschitz A., Ballent M., Lanusse C., Passirani C., Benoit J.P. & Allemandi D.A. 2016. Ivermectin-loaded lipid nanocapsules: toward the development of a new antiparasitic delivery system for veterinary applications. *Parasitology Research*. 115(5): 1945-1953.
- 27 Gaudin E., Simon M., Quijada J., Schelcher F., Sutra J.F., Lespine A. & Hoste H. 2016. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Veterinary Parasitology*. 227: 122-129.
- 28 Giarratana F., Muscolino D., Beninati C., Giuffrida A. & Panebianco A. 2014. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis larvae*. *Experimental Parasitology*. 142: 7-10.
- 29 Githiori J.B., Athanasiadou S. & Thamsborg S.M. 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139(4): 308-320.
- 30 Gobbo-Neto L. & Lopes N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. *Quimica Nova*. 30(2): 374-381.
- 31 Grandó T.H., Baldissera, M.D., Gressler, L.T., Sá M.F., Bortoluzzi B.N., Schafer, A.S., Ebling R.C., Raffin R.P., Santos R.C.V., Stefani L.M., Vaucher R., Leal M.L.R. & Monteiro S.G. 2016. *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*. 170: 177-183.

- 32 Grando T.H., Sá M.F., Baldissera M.D., Oliveira C.B., Souza M.E., Raffin R.P., Santos R.C.V., Domingues R., Minho A.P., Leal M.L.R. & Monteiro S.G. 2016. *In vitro* activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology*. 90(3): 377-382.
- 33 Gupta R., Gabrielsen B. & Ferguson S.M. 2005. Nature's Medicines: Traditional Knowledge and Intellectual Property Management. Case Studies from the National Institutes of Health (NIH), USA. *Current Drug Discovery Technology*. 2(4): 203-219.
- 34 Heckendorn F., Häring D.A., Maurer V., Senn M. & Hertzberg H. 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology*. 146(1-2): 123-134.
- 35 Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thansborg S.M. & Hoskin S.O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. 22(6): 253-261.
- 36 Hoste H., Torres-Acosta J.F.J., Quijada J., Chan-Perez I., Dakheel M.M., Kommuru D.S., Mueller-Harvey I. & Terrill T.H. 2016. Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*. 93: 239-351.
- 37 Hoste H. & Torres-Acosta J.F.J. 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*. 180(1-2): 144-154.
- 38 Hounzangbe-Adote M.S., Paolini V., Fouraste I., Moutairou K. & Hoste H. 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 78(2): 155-160.
- 39 Hubert J. & Kerboeuf D. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*. 130(20): 442-446.
- 40 Iqbal Z., Lateef M., Jabbar A., Muhammad G. & Khan M.N. 2005. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *Journal of Ethnopharmacology*. 102(2): 256-261.
- 41 Jitviriyanon S., Phanthong P., Lomarat P., Bunyapraphatsara N., Porntrakulpipat S. & Paraksa N. 2016. *In vitro* study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*. 228: 96-102.
- 42 Katiki L.M., Barbieri A.M.E., Araujo R.C., Veríssimo C.J., Louvandini H. & Ferreira J.F.S. 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. *Veterinary Parasitology*. 243: 47-51.
- 43 Katiki L.M., Chagas A.C.S., Takahira R.K., Juliani H.R., Ferreira J.F.S. & Amarante A.F.T. 2012. Evaluation of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 186(3-4): 312-318.
- 44 Katiki L.M., Chagas A.C.S., Bizzo H.R., Ferreira J.F.S. & Amarante A.F.T. 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Veterinary Parasitology*. 183(1-2): 103-108.
- 45 Kearney P.E., Murray P.J., Hoy J.M., Hohenhaus M. & Kotze A. 2016. The 'Toolbox' of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What's in and what's out. *Veterinary Parasitology*. 220: 93-107.
- 46 Kotze A.C. & Prichard R.K. 2016. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Advances in Parasitology*. 93: 398-420.
- 47 Lanusse C., Lifschitz A. & Alvarez L. 2015. Basic and clinical pharmacology contribution to extend anthelmintic molecules lifespan. *Veterinary Parasitology*. 212(1-2): 35-46.
- 48 Lei J., Leser M. & Enan E. 2010. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Pharmacology*. 79(7): 1062-1071.
- 49 Lima A.S., Carvalho, J.F., Peixoto, M.G., Blank, A.F., Borges L.M.F. & Costa-Júnior L.M. 2016. Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 30(1): 73-77.
- 50 Lopes S.G. & Costa-Junior L.M. 2015. Controle de helmintos gastrintestinais utilizando plantas no Brasil. In: Costa Junior L. & Amarante A. (Eds). *Controle de Helmintos de ruminantes no Brasil*. Jundiaí: Paco Editora, pp.261-304.
- 51 Lynagh T., Cromer B.A., Dufour V. & Laube B. 2014. Comparative pharmacology of flatworm and roundworm glutamate-gated chloride channels: Implications for potential anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 4(3): 244-255.

- 52 Macedo I.T.F. 2012. Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro. 120f. Fortaleza, CE. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 53 Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.L., Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Vieira L.S., Oliveira F.R., Queiroz-Junior E.M, Tomé A.R. & Nascimento N.R.F. 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*. 173(1-2): 93-98.
- 54 Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.L., Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F, Vieira L.S. & Amóra S.S.A. 2011. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20(3): 223-227.
- 55 Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.L., Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Morais S.M., Machado L.K.A. & Ribeiro W.L.C. 2012. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Veterinary Parasitology*. 190(3-4): 504-509.
- 56 Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.L., Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F, Vieira L.S., Oliveira F.R., Queiroz-Junior E.M., Portela B.G., Barros R.S. & Chagas A.C.S. 2009. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 18(3): 62-66.
- 57 Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Ribeiro W.L.C., Santos J.M.L., Morais S.M.M., Paula H.C.B. & Bevilaqua C.M.L. 2013. *In vitro* effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 22(4): 463-469.
- 58 Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Ribeiro W.L.C., Santos J.M.L., Silva K.C., Araújo Filho J.V., Camurça-Vasconcelos A.L.F. & Bevilaqua C.M.L. 2015. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 24(3): 268-275.
- 59 Marie-Magdeleine C., Hoste H., Mahieu M., Varo H. & Archimede H. 2009. *In vitro* effects of *cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 161(1-2): 99-105.
- 60 Marie-Magdeleine C., Udino L., Philibert L., Bocage B. & Archimede H. 2014. *In vitro* effects of *Musa paradisical* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 96(1): 127-132.
- 61 Martínez-Ortiz-de-Montellano C., Arroyo-López C., Fourquaux I., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A. & Hoste H. 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology*. 133(3): 281-286.
- 62 Mesquita M.A., Silva Júnior J.B., Panassol A.M., Oliveira E.F., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Paula H.C.B. & Bevilaqua C.M.L. 2013. Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Parasitology Research*. 112(9): 3161-3165.
- 63 Miresmailli S. & Isman M.B. 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in Plant Sciences*. 19(1): 29-35.
- 64 Molan A.L. & Faraj A.M. 2010. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Folia Parasitologica*. 57(1): 62-68.
- 65 Monteiro M.V.B., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Machado L.K.A., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Ribeiro W.L.C. & Mesquita M.A. 2011. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 182(2-4): 259-263.
- 66 Mugnaini L., Nardoni S., Pinto L., Pistelli L., Leonardi M., Pisseri F. & Mancianti F. 2012. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporium canis*. *Journal de Mycologie Médicale*. 22(2): 179-184.
- 67 Mullen K.A.E., Lee A.R., Lyman R.L., Mason S.E., Washburn S.P. & Anderson K.L. 2014. An *in vitro* assessment of the antibacterial activity of plant-derived oils. *Journal of Dairy Science*. 97(9): 5587-5591.
- 68 Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Yaniv Z. & Spiegel Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*. 90(7): 710-715.
- 69 Oliveira L.M.B, Bevilaqua C.M.L., Macedo I.T.F., Morais S.M., Monteiro M.V.B., Campello C.C., Ribeiro W.L.C. & Batista E.K.F. 2011. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20(2): 155-160.

- 70 Oliveira L.M.B., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Camurça-Vasconcelos A.L.F. & Macedo I.T.F. 2011. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Ciência Rural*. 41(11): 1967-1974.
- 71 Oliveira G.L., Vieira T.M., Nunes V.F., Ruas M.O., Duarte E.R., Moreira D.L., Kaplan M.A.C. & Martins E.R. 2014. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 24(3): 288-292.
- 72 Pandey A.K., Singh P. & Tripathi N.N. 2014. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(9): 682-694.
- 73 Pavela R. 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*. 76: 174-187.
- 74 Peixoto M.G., Costa-Júnior L.M., Blank F.A., Lima A.S., Menezes T.S.A., Santos D.A., Alves P.B., Cavalcanti S.C.H., Bacci L. & Arrigoni-Blank M.F. 2015. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 210(1-2): 118-122.
- 75 Peres L.E.P. 2004. *Metabolismo Secundário*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)/ Universidade de São Paulo, pp.1-10.
- 76 Pessoa L.M., Morais S.M., Bevilaqua C.M.L. & Luciano J.H.S. 2012. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 109(1-2): 59-63.
- 77 Qi H., Wang W.X., Dai J.L. & Zhu L. 2015. *In vitro* *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 211(3-4): 223-227.
- 78 Raut J.S. & Karuppayil S.M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 62: 250-264.
- 79 Remmal A., Achahbar S., Bouddine L., Chami N. & Chami F. 2011. *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Veterinary Parasitology*. 182(2-4): 121-126.
- 80 Ribeiro J.C., Ribeiro W.L.C., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Macedo I.T.F., Santos J.M.L., Paula H.C.B., Araújo Filho J.V., Magalhães R.D. & Bevilaqua C.M.L. 2014. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. *Veterinary Parasitology*. 204(3-4): 243-248.
- 81 Ribeiro W.L.C., Andre W.P.P., Cavalcante G.S., Araújo Filho J.V., Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Melo J.V., de Morais S.M. & Bevilaqua C.M.L. 2017. Effects of *Spigelia anthelmia* decoction on sheep gastrointestinal nematodes. *Small Ruminant Research*. 153: 146-152.
- 82 Ribeiro W.L.C., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Macedo I.T.F., Santos J.M.L., Ribeiro J.C., Pereira V.A., Viana D.A., Paula H.C.B. & Bevilaqua C.M.L. 2015. *In vitro* effects of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion on *Haemonchus contortus* and toxicity in rodents. *Veterinary Parasitology*. 212(3-4): 444-447.
- 83 Ribeiro W.L.C., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Santos J.M.L., Macedo I.T.F., Ribeiro J.C., Oliveira E.F., Paula H.C.B. & Bevilaqua C.M.L. 2017. The use of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion in the control of sheep haemonchosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37(3): 221-226.
- 84 Ribeiro W.L.C., Macedo I.T.F., Santos J.M.L., Oliveira E.F., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Paula H.C.B. & Bevilaqua C.M.L. 2013. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*. 135(1): 24-29.
- 85 Ritter R.A., Monteiro M.V.M., Monteiro F.O.B., Rodrigues S.T., Soares M.L.S., Silva J.C.R., Palha M.D.C., Biondi G.F., Rahal S.C. & Tourinho M.M. 2012. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares Island, Pará state, eastern Amazon, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 144(2): 346-352.
- 86 Rossi C.A., Soares M., Luchese F.C. & Santurio J.M. 2015. Uso de óleos essenciais no controle dos sinais clínicos das diarreias neonatais em leitões nascidos de fêmeas com diferentes ordens de parto. *Ciência Animal Brasileira*. 16(1): 93-102.
- 87 Santos J.M.L., Monteiro J.P., Ribeiro, W.L.C., Macedo, I.T.F., Araújo Filho J.V., Andre W.P.P., Araújo P.R.M., Vasconcelos J.F., Freitas E.P., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Vieira L.S. & Bevilaqua C.M.L. 2017. High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State, Brazil. *Small Ruminant Research*. 147: 1-5.
- 88 Simões C.M.O. & Spitzer V. 2004. Óleos voláteis. In: Simões C.M.O. (Ed). *Farmacognósia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, pp.467-495.

- 89 Squires J.M., Foster J.G., Lindsay D.S., Caudell D.L. & Zajac A.M. 2010.** Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. *Veterinary Parasitology*. 172(1-2): 95-99.
- 90 Taylor M.A., Hurt K.R. & Goodyear K.L. 2002.** Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*. 103(3): 183-94.
- 91 Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone-Junior J.B., Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocombe O., Taylor S.M. & Vercruyse J. 1995.** World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*. 58(3): 181-213.
- 92 Zhu L., Dai J.L., Yang L. & Qiu J. 2013.** *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Veterinary Parasitology*. 195(1-2): 112-117.
- 93 Zhu L., Dai J., Yang L. & Qiu J. 2013.** Anthelmintic activity of *Arisaema franchetianum* and *Arisaema lobatum* essential oils against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 148(1): 311-316.