

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO BATISTA BORTOLUZZI

ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa* E *Mentha piperita* L. E OS COMPOSTOS,
CARVONE E LIMONENO, CONTRA LARVAS DE NEMATODAS
GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

CURITIBA

2019

BRUNO BATISTA BORTOLUZZI

ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa* E *Mentha piperita* L. E OS COMPOSTOS,
CARVONE E LIMONENO, CONTRA LARVAS DE NEMATODAS
GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento
Coorientadora: Prof. Dr.^a Andréia Buzatti

Curitiba
Abril/2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Bortoluzzi, Bruno Batista

Óleo essencial de *Mentha villosa* e *Mentha piperita* L. e os compostos, carvone e limoneno, contra larvas de nematodas gastrintestinais de ruminantes. / Bruno Batista Bortoluzzi. – Curitiba, 2019.
115 p.: il.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento

Coorientadora: Andréia Buzatti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Fitoterapia 2. Nematoides 3. Sinergismo farmacológico 4. Ruminantes I. Título II. Molento, Marcelo Beltrão III. Buzatti, Andréia IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 636.208



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **BRUNO BATISTA BORTOLUZZI** intitulada: **Óleo essencial de *Mentha villosa* e *Mentha piperita* L. e os compostos, carvone e limoneno, contra larvas de nematodas gastrintestinais de ruminantes**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Abril de 2019.

MARCELO BELTRÃO MOENTO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

JORDANA ANDRIOLI SALGADO

Avaliador Externo (PUC/PR)

JULIANA BELLO BARON MAUBER

Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esse trabalho à todos que acreditaram que eu era capaz. Dedico em especial para a minha avó, Maria, que de onde estiver sei que está sentindo orgulho de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades concedidas até o momento, em especial pela oportunidade de estar concluindo este estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro, bem como a Universidade Federal do Paraná, em especial ao Departamento de Patologia Básica pela oportunidade de cursar o mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Estendo esse agradecimento ao meu orientador Marcelo Beltrão Molento que esteve sempre ao meu lado nessa jornada, mostrando sempre o melhor caminho a seguir e compartilhando comigo seus preciosos conhecimentos, bem como minha co-orientadora, Andréia Buzatti, por toda ajuda ao longo desses dois anos.

Ao técnico Roger Cipriano, prof. Cícero Deschamps e a prof.^a Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia pela ajuda com as análises cromatográficas. Ao Dr. Fabiano Bertoldi pela ajuda com a nanoemulsão do óleo essencial e a Dr.^a Amanda Chaaban pelo fornecimento dos óleos essenciais da *Mentha villosa* e da nanoemulsão. Eu não teria conseguido sem vocês.

Um agradecimento mais que especial aos colegas e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, Izanara Pritsh, Carla J. Dolenga, Alan dos Anjos, Vivien Garbin, Lucas B. Bueno, Maria C. Rizon e à técnica Úrsula pela parceria, e por toda ajuda prestada ao longo desses dois anos.

Jamais poderia deixar de agradecer ao meu pai, Benjamin Bortoluzzi Neto e a minha tia Silvana Bortoluzzi Bortolini por terem me apoiado em todos os sentidos nesta empreitada. Além de toda a minha família que sempre me apoiou. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse realizar mais esse sonho. Meu muito obrigado!

Agradeço também aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, mesmo distantes, sempre presentes. Nos momentos mais difíceis onde tudo parece tão impossível, onde pensamos que não vamos conseguir ou até mesmo pensamos em desistir, lá estão eles prontos para segurar nossa mão e nos mostrar que sempre tem uma saída e que vamos conseguir cumprir nossos objetivos. São eles: Carla Dall'acqua, Dyenifer T. Almeida, Mateus Fracasso, Bruna A. Osório e Karen Paola Anghinoni. Vocês foram incríveis para mim!

Um obrigado muito especial ao Luiz Tiago Dalla Stella, que esteve sempre ao meu lado durante essa fase importante da minha vida, me apoiando, me incentivando

e se dispondo em me ajudar para tudo o que fosse preciso. Graças a Deus, a vida me deu pessoas maravilhosas que me acompanham, cuidam de mim e me fazem muito feliz!

Não é sobre vencer, é sobre não desistir. Não é sobre quantas vezes você foi rejeitado ou quantas vezes você caiu e foi derrotado. É sobre quantas vezes você levantou com coragem e seguiu em frente.

Lady Gaga

RESUMO

Doenças parasitárias causadas por nematoides gastrintestinais (NGI) são responsáveis por grandes perdas na produção animal. A patogenia dessas infecções acaba acarretando em prejuízos para os animais, podendo causar perda de peso, menor produção de leite, menor índice de animais prenhes, entre outros. Comumente medicamentos antiparasitários são utilizados no tratamento de rebanhos infectados, porém, o uso indiscriminado desses anti-helmínticos tem gerado problemas como a seleção de parasitos resistentes. Mediante a este cenário, pesquisas com novas alternativas no controle parasitário têm ganhado espaço. Esse trabalho teve o objetivo de determinar, por meio do teste de inibição da migração larvar (TIML), o efeito do óleo essencial (OE) de *Mentha villosa* (OEMV), puro e sob nanoemulsão, *M. piperita* (OEMP) e dos bioativos carvone e limoneno, contra larvas de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. O TIML também foi utilizado para testar o OEMV em nanoemulsão, o OEMP, o carvone e o limoneno em combinação com o antiparasitário Nitroxinil. Os resultados do TIML foram concentração-dependente. O OEMV coletado em 2017 demonstrou eficácia de 70,59%, com uma concentração letal de 50% (CL50) de 3,59 mg/ml. O OEMV de 2018, obteve eficácia de 86,33% com CL50 de 3,04 mg/ml. O OEMP obteve eficácia de 95,54% com CL50 de 4,23 mg/ml. Para o carvone a eficácia foi de até 88,20% com CL50 de 1,96 mg/ml. O OEMV sob nanoemulsão apresentou eficácia de 83,12% com CL50 de 0,1010 mg/ml; em torno de 30 vezes melhor que o OE puro. Os testes realizados em combinação revelaram sinergismo entre a CL50 do Nitroxinil, com a menor concentração do OEMP (1,1 mg/ml), obtendo eficácia de 70,82%. Efeitos aditivos entre a CL50 do Nitroxinil com a menor concentração do carvone (1,1 mg/ml) obteve eficácia de 80,92%. Nas combinações do Nitroxinil e do carvone com o limoneno, os efeitos foram antagônicos causados pelo limoneno. A combinação entre o OEMV em nanoemulsão com o Nitroxinil, resultou em efeito aditivo na menor concentração do Nitroxinil (4,8 mg/ml), com eficácia de 76,93%. Esses resultados sugerem que tanto os OE, quanto o carvone, apresentaram efeito contra *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp., e que houve efeito sinérgico e aditivo entre essas combinações. O mesmo não foi observado com as combinações entre carvone e limoneno e Nitroxinil e limoneno, que apresentaram efeito antagônico causado pela adição do limoneno. Estes dados revelam a possibilidade farmacológica do uso de OE na prática da Parasitologia Veterinária, inclusive no combate de populações resistentes aos anti-helmínticos. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar o mecanismo de ação dos compostos sobre as larvas, bem como os efeitos sinérgicos e antagônicos das combinações entre os produtos.

Palavras-chave: Fitoterapia, Etnoveterinária, Sinergismo, Nematodas, Ruminantes.

ABSTRACT

Parasitic diseases caused by gastrointestinal nematodes (GIN) are responsible for large losses in animal production. The pathogenesis of these infections ends up leading to losses for the animals, which can cause weight loss, lower milk production, lower rates of pregnant animals, among others. Antiparasitic drugs are commonly used in the treatment of infected herds; however, the indiscriminate use of these anthelmintics has led to problems such as the selection of resistant parasites. Through this scenario, research with new alternatives in parasitic control has gained space. The objective of this work was to determine the effect of *M. villosa* essential oil (MVEO), pure and under nanoemulsion, *M. piperita* essential oil (MPEO) and bioactive agents, carvona and limonene using Larval Migration Inhibition Test (LMIT), against larvae of *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp. LMIT was also used to test MVEO in nanoemulsion, MPEO, carvona and limonene in combination with the Nitroxinil antiparasitic. The LMIT results were concentration-dependent. MVEO collected in 2017 demonstrated efficacy of 70.59%, with a lethal concentration of 50% (LC50) of 3.59 mg/ml. The MVEO of 2018, achieved efficacy of 86.33% with LC50 of 3.04 mg/ml. The MPEO achieved 95.54% efficacy with LC50 of 4.23 mg/ml. For carvona the efficacy was up to 88.20% with LC50 of 1.96 mg/ml. The MVEO in nanoemulsion exhibited efficacy of 83.12% with LC50 of 0.1010 mg/ml, around 30 times better than pure EO. Tests performed in combination showed synergism between the LC50 of Nitroxinil and the lowest MPEO concentration (1.1 mg/ml) with 70.82% efficacy. Additives effects between Nitroxinil LC50 with the lowest concentration of carvona (1.1 mg/ml) with 80.92% efficacy. In the combinations of Nitroxinil and carvona with limonene the effects were antagonistic caused by limonene on the products. The combination of MVEO in nanoemulsion with Nitroxinil resulted in an additive effect on the lowest concentration of Nitroxinil (4.8 mg/ml) with a 76.93% efficacy. These results suggest that both EO and carvone had an effect against *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp., and that there was a synergistic and additive effect between these combinations, except for the combinations between carvone and limonene and Nitroxinil and limonene, which had an antagonistic effect caused by the addition of limonene. These data reveal the pharmacological possibility of the use of EO in the practice of Veterinary Parasitology, including in the control of populations resistant to anthelmintics. Further studies should be performed to elucidate the mechanism of action of the compounds on the larvae as well as the synergistic and antagonistic effects of the combinations between the products.

Keywords: Phytotherapy, Ethnoveterinary, Synergism, Nematodes, Ruminants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOTO DAS FOLHAS E FLORAÇÃO DE <i>Mentha villosa</i>	32
FIGURA 2 - Estrutura molecular do R- Carvone.	35
FIGURA 3 - Estrutura molecular do L- Limoneno.....	35
FIGURA 4 - ESTRUTURA MOLECULAR DO NITROXINIL	39
FIGURA 5 - CANTEIRO DE <i>M. Villosa</i> NA ÁREA DE CULTIVO DO INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA.....	41
FIGURA 6 - PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	50
FIGURA 7 - PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha villosa</i> COLETADO EM 2017 ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.	50
FIGURA 8 - PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha villosa</i> COLETADO EM 2018 ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSA.	51
FIGURA 9 – PERCENTUAL DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha villosa</i> COLETADO EM 2017 FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	52
FIGURA 10. PERCENTUAL DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha villosa</i> COLETADO EM 2018 FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	53
FIGURA 11 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	54
FIGURA 12 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O BIOATIVO CARVONE FRENTE A LARVAS DE	

TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	56
FIGURA 13 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O BIOATIVO LIMONENO FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> ..	57
FIGURA 14 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha villosa</i> EM NANOEMULSÃO FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	58
FIGURA 15 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL (NITROX) E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> (OEMP) FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> ..	61
FIGURA 16 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL CONTRA A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> ..	62
FIGURA 17 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL (NITROX) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CARVONE (CARV) CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	64
FIGURA 18 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO CARVONE (CARV) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL (NITROX) CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	65
FIGURA 19 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL (NITROX) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO BIOATIVO LIMONENO (LIMON) FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	66

FIGURA 20 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE O LIMONENO (LIMON) 3% COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL (NITROX) CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	67
FIGURA 21 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO CARVONE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO LIMONENO CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	69
FIGURA 22 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE O BIOATIVO LIMONENO A 1% COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO BIOATIVO CARVONE FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> ($R^2= 0,71$).....	70
FIGURA 23 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DE <i>Mentha villosa</i> EM NANOEMULSÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i>	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RELAÇÃO DE ESTUDOS <i>in vitro</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE OVOS E LARVAS DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES	28
TABELA 2 - RELAÇÃO DE ESTUDOS <i>in vitro</i> DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE LARVAS E OVOS DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES	30
TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (%) DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Mentha piperita</i> E <i>Mentha villosa</i> , IDENTIFICADAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	49
TABELA 4 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha villosa</i> , COLETADA NO ANO DE 2017.....	52
TABELA 5 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha villosa</i> , COLETADA NO ANO DE 2018.....	53
TABELA 6 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i>	54
TABELA 7 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DO BIOATIVO CARVONE.	55
TABELA 8 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O BIOATIVO LIMONENO FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> ..	56
TABELA 9 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus</i>	

<i>spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DO OEMV EM NANOEMULSÃO	58
TABELA 10 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL COM O OLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> (OEMP).....	60
TABELA 11 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> E NITROXINIL.....	61
TABELA 12 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> COM A COMBINAÇÃO DA CL50 DO NITROXINIL E O CARVONE.	63
TABELA 13 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO CARVONE COM O NITROXINIL.	64
TABELA 14 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL COM O LIMONENO.....	66
TABELA 15 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA DA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE O BIOATIVO LIMONENO 3% COM O NITROXINIL.....	67
TABELA 16 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO (L3) DE <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO BIOATIVO CARVONE COM O BIOATIVO LIMONENO	68
TABELA 17 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO (L3) DE	

<i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE O BIOATIVO LIMONENO A 1% COM O BIOATIVO CARVONE	69
TABELA 18 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE <i>Haemonchus</i> <i>spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DE <i>Mentha villosa</i> EM NANOEMULSÃO COM O NITROXINIL.	71
TABELA 19 - RELAÇÃO DAS CL50 DE TODOS OS PRODUTOS TESTADOS DE FORMA INDIVIDUAL E EM COMBINAÇÕES E GRUPAMENTO DAS MÉDIAS DAS EFICÁCIAS DOS TESTES ISOLADOS, COMPARADOS COM OS TESTES COMBINADOS CONTRA LARVAS DOS NEMATODEOS <i>Haemonchus spp.</i> E <i>Trichostrongylus spp.</i> FRENTE AO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR.	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% - Porcentagem

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

B.O.D. – Demanda bioquímica de oxigênio

Carv – Carvone

CG/MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CL50 – Concentração letal para 50% das larvas

Ctw – Controle Tween

C+ - Controle positivo

DIC – Detector de ionização por chama

Epagri – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

g – Gramas

H₂O – Água

IP – Índice de polidispersão

L – Litro

LAPOC – Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos

Limon – Limoneno

mg/ml – Miligramas por mililitro

min – minuto

mm – Milímetro

NGI – Nematoides gastrintestinais

Nitrox – Nitroxinil

nm – nanômetros

O/A – Óleo-água

OE – Óleo essencial

OEMP – Óleo essencial de *Mentha piperita*

OEMV – Óleo essencial de *Mentha villosa*

OEMVnano – Óleo essencial de *Mentha villosa* sob nanoemulsão

OPG – Ovos por grama de fezes

pH – Potencial hidrogeniônico

PR – Paraná

RR – Organismos homozigotos resistentes

rpm – Rotações por minuto

SS – Organismos homozigotos suscetíveis

SR – Organismos heterozigotos

TEO – Teste de eclosão de ovos

TD – Teste de desembainhamento

TDL – Teste de desenvolvimento larvar

TIAL – Teste de inibição da alimentação larvar

TIML – Teste de inibição da migração larvar

UFPR – Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	ENDOPARASIToses GASTRINTESTINAIS EM OVINOS.....	22
2.2	IMPORTÂNCIA DE FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS E ALTERNATIVAS DE CONTROLE	23
2.3	RESISTÊNCIA PARASITÁRIA	24
2.4	USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS NO CONTROLE DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES.....	25
2.4.1	Óleos Essenciais (OE).....	25
2.4.2	Efeito Anti-helmíntico de Óleos Essenciais.....	27
2.4.3	Atividade Anti-helmíntica de Bioativos	29
2.5	GÊNERO <i>MENTHA</i>	31
2.5.1	<i>Mentha villosa</i>	32
2.5.2	<i>Mentha piperita</i>	33
2.5.3	Bioativos: Carvone e Limoneno	33
2.6	CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/MS)	35
2.7	TECNOLOGIA DE NANOEMULSÃO.....	36
2.8	NITROXINIL.....	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	ÓLEO ESSENCIAL E BIOATIVOS	41
4.2	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/MS)	42
4.3	NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>MENTHA VILLOSA</i>	43
4.4	OBTENÇÃO DE LARVAS DE NEMATODAS GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES.....	43
4.5	TESTES DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR (TIML).....	44
4.5.1	TIML utilizando os OE de <i>M. villosa</i> coletados em 2017 e em 2018, <i>M. piperita</i> e os bioativos carvone e limoneno	45

4.5.2	TIML utilizando o OE de <i>M. villosa</i> sob nanoemulsão	45
4.5.3	TIML realizado com as combinações entre os produtos.....	45
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
5	RESULTADOS	48
5.1	IDENTIFICAÇÃO DAS LARVAS.....	48
5.2	ESTABILIDADE DA NANOEMULSÃO	48
5.3	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA <i>M. VILLOSA</i> E <i>M. PIPERITA</i> POR CG/MS.....	48
5.4	TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>MENTHA VILLOSA</i> E <i>MENTHA PIPERITA</i> E SEUS BIOATIVOS, CARVONE E LIMONENO	51
5.5	TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR COM NANOEMULSÃO DE <i>MENTHA</i> <i>VILLOSA</i>	57
5.6	TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR PARA OS TRATAMENTOS EM COMBINAÇÕES	59
5.6.1	Combinação do OE de <i>Mentha piperita</i> com Nitroxinil	59
5.6.2	Combinação do bioativo carvone com o Nitroxinil	62
5.6.3	Combinação do bioativo limoneno com Nitroxinil	65
5.6.4	Combinação entre os bioativos carvone e limoneno	68
5.6.5	Combinação entre OE <i>Mentha villosa</i> sob nanoemulsão com o Nitroxinil	70
5.7	CL50 DOS PRODUTOS ISOLADOS E DOS PRODUTOS EM COMBINAÇÕES FRENTE AO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR	72
6	DISCUSSÃO	73
6.1	TIML COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>M. VILLOSA</i> , <i>M. PIPERITA</i> E OS BIOATIVOS CARVONE E LIMONENO.....	73
6.2	TIML COM O OEMV DE 2017 SOB NANOEMULSÃO.....	76
6.3	TIML COM OS PRODUTOS EM COMBINAÇÕES.....	78
6.4	COMPARAÇÃO DAS CL50 DOS PRODUTOS ISOLADOS E EM COMBINAÇÕES	83
7	CONCLUSÃO	86
8	CONSIDERACOES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXO 1 – CERTIFICADO DE ACEITE PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS	109

ANEXO 2 – LARVAS L3 DE <i>HAEMONCHUS</i> SPP. E <i>TRICHOSTRONGYLUS</i> SPP. TENDO SUAS BAINHAS REMOVIDAS COM HIPOCLORITO DE SÓDIO.	110
ANEXO 3 – INCUBAÇÃO DAS LARVAS L3 DE <i>HAEMONCHUS</i> SPP. E <i>TRICHOSTRONGYLUS</i> SPP. COM OS PRODUTOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	111
ANEXO 4 – PLACAS DE 24 POÇOS COM OS APARATOS JÁ PREPARADOS PARA MIGRAÇÃO LARVAR	112
ANEXO 5 - APARATO DEVIDAMENTE PREPARADO. CONSISTE EM UMA SERINGA DE 5 ML CORTADA NO TAMANHO APROXIMADO DE 2 CM, COM OUTRA SERINGA DE 2 ML, TAMBÉM CORTADA COM TAMANHO PRÓXIMO DE 2 CM, ENVOLVIDA POR UMA MALHA COM ESPAÇAMENTO DE 25 MICRÔMETROS.	113
ANEXO 6 – CONTAGEM DE LARVAS MIGRADAS, UTILIZANDO O MICROSCÓPIO INVERTIDO.	114
ANEXO 7 – IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE LARVAS L3 DE NEMATODAS GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES. <i>HAEMONCHUS</i> SPP. A ESQUERDA E <i>TRICHOSTRONGYLUS</i> SPP. A DIREITA.....	115

1 INTRODUÇÃO

As infecções gastrintestinais por nematoides da ordem Strongylida, Família Trichostrongylidae são muito comuns em animais de produção como bovinos, ovinos e caprinos, que são de grande importância social e econômica, podendo gerar perdas que influenciam a produção e conseqüentemente no desenvolvimento econômico do produtor e do país (CHARLIER et al., 2015). Essas perdas ocorrem devido às infecções clínicas e subclínicas, que ocasionam em déficit no ganho de peso e produtividade dos animais (KATIKI et al., 2019).

Para controlar essas infecções parasitárias é feita a administração de medicamentos antiparasitários, dos quais, os mais usuais são benzimidazóis, levamisole e lactonas macrocíclicas (BASIER, LOVE, 2003). Segundo Molento (2009), a síntese de medicamentos com capacidade antiparasitária representa um grande marco na indústria de fármacos e está fortemente presente quando se fala de saúde animal. Porém, o uso indiscriminado dessas drogas pode causar a seleção de organismos resistentes para esses medicamentos. Além disso, se usados de forma incorreta, podem causar grave contaminação ambiental (ATHANASIADOU et al., 2008).

O desenvolvimento de novos anti-helmínticos pode levar décadas, enquanto a resistência pode aparecer mais rapidamente, muitas vezes dentro de poucos anos após a liberação de um novo fármaco (KAPLAN, 2004). Devido a isso, faz-se necessário preservar a eficácia dos antiparasitários, o que pode ser feito através de adoção de práticas de manejo, como o tratamento seletivo de animais, respeito a doses recomendadas pela bula dos medicamentos, eliminação de tratamentos desnecessários e utilização de pastoreio alternado (MOTA et al., 2003). Essas práticas atrasam a seleção de organismos resistentes (ROEBER et al., 2017).

Nos últimos anos, pesquisas com plantas e a exploração de seus potenciais fitoterápicos têm aumentado, buscando uma alternativa que seja eficaz no controle dos parasitos. Os materiais utilizados geralmente são; óleos essenciais, extratos hidroalcoólicos, extratos aquosos e hidrolatos, todos com componentes sintetizados pelo metabolismo secundário da planta (MACEDO, et al., 2010). Além destes, componentes isolados (ascaridol, carvacrol, carvone, timol, citronelal, limoneno, entre outros), majoritários ou não do óleo essencial (OE) dos vegetais, também estão sendo utilizados como bioativos em pesquisas. Esses bioativos são, na grande maioria,

pertencentes a classe dos terpenos, podendo ser a classe responsável pela atividade exterminadora de diversos organismos, como fungos e bactérias (PAVELA, 2015). Lei et al. (2010), buscaram identificar o mecanismo de ação de monoterpenos em *Caenorhabditis elegans* e determinaram que esses compostos agem sobre receptores de tiramina, inibindo a motilidade e o bombeamento da faringe do helminto, sendo esse um dos possíveis mecanismos de ação contra os NGI de ruminantes.

Diante deste cenário, esta pesquisa se objetivou a contribuir para os estudos de alternativas no controle parasitário de nematoides gastrintestinais de ruminantes (NGI), avaliando o efeito anti-helmíntico do OE de duas espécies de *Mentha* (*M. villosa* e *M. piperita*), bem como dois de seus compostos bioativos, carvone e limoneno, no Teste de Inibição da Migração Larvar (TIML) frente a larvas de terceiro estágio (L3) de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENDOPARASITOSSES GASTRINTESTINAIS EM OVINOS

Responsáveis por determinar importantes perdas econômicas oriundas da mortalidade ou baixas na produtividade dos animais, as infecções por NGI em ruminantes têm sido um grave problema com repercussão mundial (AMARANTE, 2004). Segundo Amarante (2009), os ovinos podem ser parasitados simultaneamente por várias espécies de NGI e os parasitos que apresentam maior ocorrência em infecções são dos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Trichuris* e *Oesophagostomum* (LIMA et al., 1997; BORDIN et al., 2004).

O ciclo de vida desses nematoides tem um grande nível de semelhança entre si e pode ser dividido em duas fases, sendo elas a pré-parasitária e a parasitária. A postura dos ovos pela fêmea ainda no sistema gastrintestinal do hospedeiro é o início da fase pré-parasitária. Esses ovos chegam ao meio ambiente externo juntamente com as fezes do animal e, em condições favoráveis, evoluem para ovo com larva (L1). Os ovos eclodem liberando as larvas para o meio, que continuam o desenvolvimento, entrando na fase de segundo estágio (L2) e seguidamente no terceiro estágio (L3), correspondente a fase infectante, esse processo desde ovo até larva L3 dura aproximadamente sete dias. A ingestão da larva de terceiro estágio (L3) pelo animal inicia a fase parasitária. Em aproximadamente três semanas, no interior do animal, a larva atinge a fase adulta. Esse ciclo é do tipo direto e não migratório e para que tudo ocorra bem, a temperatura ideal para eclosão de ovos e desenvolvimento das larvas fica em torno de 27 °C (BOWMAN, et al., 2006)

Dentre os parasitos já citados neste tópico, o *Haemonchus contortus* certamente é o principal parasito causador de perdas entre ovinos. Uma vez parasitados, os ovinos podem apresentar diversos sinais clínicos, como: diarreia, perda de apetite, perda de peso e condição corporal, andar cambaleante, mucosas pálidas e, ocasionalmente, presença de edema submandibular e ventral. Entretanto, esses sinais clínicos podem apresentar diferentes intensidades, e em últimos casos pode ocasionar a morte do animal (ATHANASHIADOU; KYRIAZAKIS, 2004. MOLENTO et al., 2011).

2.2 IMPORTÂNCIA DE FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS E ALTERNATIVAS DE CONTROLE

O sucesso na produção de ovinos e demais ruminantes depende de cuidados com o manejo sanitário, reprodutivo e nutricional dos animais. Um dos maiores desafios no manejo sanitário está no controle de doenças parasitárias, pois geralmente a criação desses animais é acompanhada de infecções parasitárias de difícil controle (RANGEL, 2003).

Há muito tempo, pesquisas vêm constatando que infecções por nematoides gastrintestinais prejudicam o desempenho dos rebanhos, gerando perdas graves de produção. Em 1991, Suarez e Bedotti constataram déficit no ganho de peso de animais infectados. Stromberg et al. (1997) verificaram diferenças na taxa de prenhes, sendo que as fêmeas parasitadas possuíam déficit nesse índice. Esses resultados indicam a importância do controle parasitário nos sistemas de produção animal.

No ano de 1999, Gross, Ryan e Ploeger fizeram um levantamento de dados entre estudos que envolvia infecções por nematoides gastrintestinais, e concluíram que de 87 trabalhos analisados, 70 deles afirmavam aumento na produção de leite por bovinos após administração de medicamentos antiparasitários. Em 2001, Elsener e colaboradores, relataram maior ganho de peso de bezerros que eram tratados com antiparasitários em relação a bezerros não tratados. Stromberg et al. (2012), observaram que bovinos contaminados por *Cooperia punctata* possuíam um consumo maior de matéria seca, resultando em perda de peso quando comparado a bovinos não parasitados.

O tratamento dessas infecções helmínticas pode ser realizado com a administração de medicamentos antiparasitários, dos quais os mais usados pertencem às classes dos benzimidazóis (KOHLENER, 2001) e das lactonas macrocíclicas (MELLO et al., 2006). Molento (2005), afirma que esses medicamentos são mais usados devido à facilidade de sua aquisição, bem como a boa relação custo-benefício que eles apresentam.

Dentre as alternativas para o controle dos parasitos gastrintestinais de ruminantes já citadas em diversos estudos, há pesquisas com a utilização de fungos nematófagos (BUSKE et al., 2012; YANG et al., 2013; MOLENTO, 2017), raças de animais resistentes aos parasitos (BRICARELLO et al., 2007), vacinas (BASSETTO et al., 2011; PIEDRAFITA et al., 2012) e finalmente o uso de plantas com potencial anti-helmíntico (NOGUEIRA et al., 2012; AHMED et al., 2012; KATIKI et al., 2011).

2.3 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

Como conceito, a resistência parasitária é a capacidade de parasitos sobreviverem na presença de um composto químico que deveria exterminá-lo (PRICHARD et al., 1980).

Nas últimas décadas, o frequente uso de anti-helmínticos pertencentes aos grupos dos benzimidazóis, imidazotiazóis (levamisole) e das lactonas macrocíclicas (ivermectinas e milbemicas) vem ocasionando a seleção e propagação de parasitos resistentes (FORTES; MOLENTO, 2013). A primeira descrição de resistência parasitária na literatura foi feita por Drudge et al. (1964) que verificou resistência contra Tiabendazole nos anos 60. Daí em diante, e em diferentes regiões do mundo, tem-se observado o crescimento do número de relatos de parasitos resistentes aos três principais grupos de drogas administradas em ruminantes; os benzimidazóis, levamisol e lactonas macrocíclicas (FORTES; MOLENTO, 2011; BATISTA, 2017).

Molento et al. (2011), afirmou que o desenvolvimento da resistência acontece devido à forte pressão de seleção das drogas em populações de parasitos. Essa resistência pode ser dividida em três tipos; resistência lateral, resistência cruzada e resistência múltipla. Segundo Almeida et al. (2013), quando a resistência acontece contra os princípios ativos de um mesmo grupo químico é chamada de resistência lateral. Quando a resistência se dá para diferentes grupos químicos, cruzada (ANZIANI et al., 2004), e quando se dá a três ou mais grupos, múltipla (SOUZA et al., 2008).

O aparecimento bem como a proliferação de NGI resistentes é praticamente inevitável devido à presença de parasitos que possuem um ou mais genes que conferem essa resistência, e com a pressão das drogas sobre essas populações, organismos são selecionados mais rapidamente (MOLENTO, 2005). Quando somente um gene confere resistência a um grupo químico, chama-se “monogênica”, a qual ocorre em um período curto de tempo, como exemplo disso temos os benzimidazóis, necessitando apenas da mutação nas estruturas da beta-tubulina para que o fenômeno ocorra. Quando é necessário mais de um gene para controlar a resistência, a qual é denominada de “poligênica”, o processo ocorre de forma mais lenta, como no caso das lactonas macrocíclicas, onde ocorrem mutações nos canais de cloro, clicoproteína-P e β -tubulina (XU et al., 1998; PRICHARD, 2001).

A resistência parasitária se estabelece quando há o aumento de parasitos que sobrevivem na presença de determinada droga, enquanto o número de parasitos que não resistiriam a essa mesma droga acaba sendo reduzido. As populações de parasitos possuem indivíduos homozigotos susceptíveis (SS), homozigotos resistentes (RR) e heterozigotos (SR). Em uma propriedade onde não se constatou resistência, a quantidade de SS é alta, SR é menor e RR representa uma pequena parcela. OS RR são os organismos responsáveis por iniciar novas populações resistentes. A partir do momento que uma droga é empregada em um tratamento anti-helmíntico, todos os SS e grande parte dos SR serão eliminados, permanecendo apenas os RR. Se houver um medicamento eficaz contra SR, a eficiência contra SS aumentará, pois, esses organismos serão totalmente susceptíveis, restando assim apenas os RR que darão início a novas populações de parasitos resistentes. Uma eficácia contra apenas SS, culmina na sobrevivência dos indivíduos SR, retardando assim o processo de resistência (PRICHARD, 1990).

Existem outros fatores que também influenciam na maior ou menor disseminação da resistência. Segundo Molento (2005), o tratamento de rebanhos com reduzidos intervalos de tempo, utilização frequente de produtos de ação prolongada durante o ano e a aquisição de animais já contaminados com parasitos resistentes, são fatores importantes para a seleção e disseminação da resistência parasitária.

2.4 USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS NO CONTROLE DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES

2.4.1 Óleos Essenciais (OE)

OE são sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e possuem a função de proteção contra possíveis agentes patogênicos, além de proporcionar proteção contra os herbívoros e atrair polinizadores (BAKKALI et al., 2008; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008). Os OE são misturas complexas, formadas por compostos bioativos que apresentam substâncias voláteis, lipofílicas, comumente odoríferas e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2004). Os OE são formados por cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações, entretanto apenas dois ou três componentes principais podem se apresentar em elevadas concentrações (20-70%),

enquanto os outros apresentam concentrações vestigiais. Comumente, os componentes que são majoritários apresentam as propriedades biológicas do OE (PAVELA, 2015).

OE são compostos por dois grupos de substâncias de origem biossintética diferente. O principal grupo é formado pelos terpenos e terpenoides e sua biossíntese se dá a partir do ácido mevalônico e 3-fosfoglicerato. Os terpenos são hidrocarbonetos compostos por unidades de isopreno (C₅) e podem ser classificados de acordo com a junção de unidades de isopreno, sendo os principais grupos os monoterpenos. Os monoterpenos podem representar 90% da constituição dos OE, e como exemplo temos o ascaridol, carvacrol, carvone, timol, citronelal, limoneno, entre outros. Como segundo grupo, temos os aromáticos e alifáticos, que são produzidos a partir do ácido chiquímico ou mevalômico (PAVELA, 2015; PERES, 2004). Por sua vez, esses compostos são encontrados em menor quantidade nos OE, como o eugenol e anetol (BAKKALI et al., 2008).

Diversos fatores influenciam no rendimento e composição química do OE, como clima, temperatura, disponibilidade hídrica, composição do solo, nutrientes, radiação ultravioleta, poluição atmosférica, altitude a que a planta está inserida, além de ataques de patógenos, idade da planta, órgão utilizado para extração, tipo de extração e até mesmo o horário de coleta da planta.

A extração do OE pode ocorrer através de órgãos como folhas, caules, raízes, bem como de brotos, flores, frutos e sementes (PANDEY et al., 2014; RAUT; KARUPPAYIL, 2014), através de técnicas de destilação a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio e por solventes (BAKKALI et al., 2008; MACEDO et al., 2011; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Como o método de extração pode influenciar diretamente sobre a composição do OE, indica-se a extração a vapor e a hidrodestilação para extrações de OE ricos em terpenos e fenilpropanoides (BAKKALI et al., 2008).

Pesquisas mostram diversas atividades farmacológicas dos OE na medicina veterinária, podendo ter ação antibacteriana (MULLEN et al., 2014; ROSSI et al., 2015), antifúngica (CLEFF et al., 2012; MUGNAINI et al., 2012), coccidicida (JITVIRIYANON et al., 2016), carrapaticida (CHAGAS et al., 2016; PEIXOTO et al., 2015) e anti-helmíntica (FERREIRA et al., 2016; MACEDO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2015).

A ação tóxica dos OE contra helmintos vem sendo atribuída aos seus compostos majoritários ou, até mesmo, a uma relação sinérgica ou aditiva dos

compostos (KATIKI et al., 2017). A interação de sinergismo, adição ou antagonismo dos biocompostos isolados dos OE que demonstraram alguma eficácia anti-helmíntica tem sido proposta para o descobrimento de novas alternativas no controle de parasitoses (MIRESMAILLI et al., 2014; KATIKI et al., 2017).

Acredita-se que os compostos bioativos presentes nos OE possam interagir com receptores presentes em diferentes estágios de vida do NGI (MARIE-MAGDELEINE et al., 2009). Possivelmente, a ação desses compostos sobre diferentes receptores dos NGI pode atrasar o surgimento de populações resistentes a esses mesmos compostos e ajudar a controlar populações que já são multirresistentes a medicamentos anti-helmínticos sintéticos (OKA et al., 2000).

2.4.2 Efeito Anti-helmíntico de Óleos Essenciais

Para que a atividade anti-helmíntica dos OE seja validada, diversos estudos devem ser realizados. Estudos que vão desde as prospecções do saber popular até testes de eficácia utilizando o animal alvo (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

A maioria dos estudos com o objetivo de avaliar a atividade anti-helmíntica de OE tem como base inicial os testes *in vitro*. Os testes *in vitro*, devido a praticidade, são realizados a partir de ovos e larvas de NGI, sendo que até o atual momento não foi desenvolvida nenhuma técnica *in vitro* que permita o desenvolvimento de NGI do estágio de ovo a adulto, como observado para o nematoide de vida livre *C. elegans* (MARIE-MAGDELEINE et al., 2014). Primeiramente, os testes *in vitro* foram desenvolvidos para avaliar resistência parasitária em populações de NGI e, posteriormente, foram adaptados para determinar a atividade anti-helmínticas de OE e compostos bioativos. Esses testes apresentam rapidez de execução e baixo custo, podendo ser utilizados na triagem de diversas plantas e seus compostos bioativos (OLIVEIRA et al., 2011). Os principais resultados obtidos em testes *in vitro* com OE sobre nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes nos últimos 12 anos estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 - RELAÇÃO DE ESTUDOS *in vitro* DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE OVOS E LARVAS DE NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE RUMINANTES

Óleo Essencial	Composto Majoritário	Ensaio	CL ₅₀ mg/ml	Referência
<i>Ocimum gratissimum</i>	Eugenol	TEO	0,5%	Pessoa et al., 2012
<i>Lippia sidoides</i>	Timol	TEO TDL	0,4 2,9	Camurça-Vasconcelos et al., 2007
<i>Croton zehntneri</i>	Anetol	TEO TDL	0,7 1,3	Camurça-Vasconcelos et al., 2007
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	Limoneno	TEO TDL	0,3 1,7	Macedo et al., 2010
<i>Mentha piperita</i>	Mentol	TEO TDL TD TIAL	0,2 0,2 61,9 0,07	Katiki et al., 2011
<i>Cymbopogon martinii</i>	Geraniol	TEO TDL TD TIAL	0,1 0,5 28,1 0,03	Katiki et al., 2011
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Geraniol	TEO TDL TD TIAL	0,04 0,04 24,6 0,009	Katiki et al., 2011
<i>Artemisia lancea</i>	Eucaliptol	TEO TDL	1,8 1,6	Zhu et al., 2013
<i>Piper aduncum</i>	Eucaliptol	TEO	2,4	Oliveira et al., 2014
<i>Arisaema franchetianum</i>	Linalol	TEO TDL	1,6 1,1	Zhu et al., 2013
<i>Zanthoxylum simulans</i>	Borneol	TEO TDL	3,9 4	Qi et al., 2015
<i>Ruta chalepensis</i>	2-undecanone	TEO	0,1	Akkari et al., 2015
<i>Citrus sinensis</i>	Limoneno	TEO TDL	0,2 0,9	Gaínza et al., 2015
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Longifolene	TEO TDL	1,5 0,4	Gaínza et al., 2015
<i>Cymbopogon citratus</i>	Citral	TEO TDL	0,14 1,92	Macedo et al., 2015
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	TEO TDL	0,43 0,062	Ferreira et al., 2016
<i>Piper aduncum</i>	Dilapiol	TEO TDL	5,7 0,1	Gainza et al., 2016
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpine-4-ol	TEO TIML	0,43 10,68	Grando et al., 2016
<i>Hesperozygis myrtooides</i>	Isomentona	TEO TDL	0,249 0,07	Castilho et al., 2017

FONTE: O Autor (2019). LEGENDA: TEO= Teste de eclosão de ovos; TDL= Teste de desenvolvimento larvar; TD= Teste de desembainhamento larvar; TIAL= Teste de inibição da alimentação larvar; TIML= Teste de inibição da Migração Larvar; CL₅₀= Concentração letal para 50% dos ovos ou larvas testadas.

No teste de eclosão (TEO), os OE podem agir inibindo o desenvolvimento embrionário das larvas (MACEDO et al., 2011) ou inativando as enzimas: lipases, proteases, beta-glicosidades, quitinases e leucina aminopeptidase que atuam na degradação da casca do ovo durante a eclosão (MOLAN; FARAJ, 2010).

O teste de desenvolvimento larvar (TDL) determina se o OE possui eficácia contra o desenvolvimento destas (HUBERT; KERBOEUF, 1992). Neste caso, a ação larvicida do OE pode estar relacionada a modificações no sistema nervoso das larvas (BAKKALI et al., 2008) ou em lesões cuticulares (GIARRATANA et al., 2014). Além do TDL, são utilizados outros dois testes que avaliam a ação de OE em larvas: o teste de inibição da alimentação larvar (TIAL) e o teste de desembainhamento de larvas (TD) (KATIKI et al., 2011). O TIAL verifica se o OE promove paralisia da musculatura do esôfago da larva L1, inibindo sua alimentação (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005). Já o teste de desembainhamento larvar, avalia especificamente a inibição do desembainhamento da larva de terceiro estágio (L3) (OLIVEIRA et al., 2011). Já foi constatado que os OE podem atuar no bloqueio do processo de desembainhamento das L3, não permitindo que as larvas se estabeleçam no organismo do hospedeiro, diminuindo assim a carga parasitária dos animais (KATIKI et al., 2011). Todavia, o mecanismo de ação dos OE sobre a inibição do desembainhamento larvar ainda não foi devidamente esclarecido.

2.4.3 Atividade Anti-helmíntica de Bioativos

O isolamento, identificação e avaliação da ação anti-helmíntica dos bioativos presentes nos OE tem contribuído para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos e até mesmo na síntese de novas moléculas (ANDRE et al., 2016; FERREIRA et al., 2016). Os principais resultados verificados em testes *in vitro* com compostos bioativos isolados de OE sobre NGI nos últimos 12 anos podem ser contemplados na Tabela 2. O eucaliptol (1,8-cineol) é o composto majoritário do OE e está presente em mais de uma planta. Contudo, o isolamento e avaliação da sua capacidade anti-helmíntica baseou-se apenas em ensaios *in vitro*, como TEO e TDL, sendo necessário avaliar sua ação contra NGI em pequenos ruminantes (*in vivo*) (ZHU et al., 2013).

O Carvacrol e o timol demonstraram atividade ovicida e larvicida em *H. contortus* (ANDRE et al., 2016; ANDRE et al., 2017). Estudos que buscaram identificar o mecanismo de ação desses monoterpenos em *C. elegans*, mostraram que os mesmos possuem ação sobre os receptores de tiramina, inibindo a motilidade e o bombeamento da faringe desse nematoide de vida livre (LEI et al., 2010). O timol teve sua ação identificada sobre receptores glutamato associado ao cloro (GluCl) em *Schistosoma mansoni* expressos em oócitos de *Xenopus laevis* que atestaram a ação moduladora desse monoterpeno sobre esses receptores (LYNAGH et al., 2014).

TABELA 2 - RELAÇÃO DE ESTUDOS *in vitro* DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE LARVAS E OVOS DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

Composto	Classificação	Ensaio	CL ₅₀ mg/ml	Referência
Eugenol	Composto aromático	TEO	5%	Pessoa et al., 2012
Timol	Monoterpeno	TEO TDL	0,5 2,4	Camurça-Vasconcelos et al., 2007
Anetol	Composto aromático	TEO TDL	0,6 2,1	Camurça-Vasconcelos et al., 2007
Cânfora	Monoterpeno	TDL	7,8	Zhu et al., 2013
Eucaliptol	Monoterpeno	TEO TDL	4,6 5	Zhu et al., 2013
B-elemene	Sesquiterpeno	TDL	32,1	Qi et al., 2015
Citral	Monoterpeno	TEO TDL	0,13 1,37	Macedo et al., 2015
Borneol	Monoterpeno	TEO TDL	1,5 1,9	Qi et al., 2015
Timol	Monoterpeno	TEO TDL	0,43 0,125	Ferreira et al., 2016
Terpine-4-ol	Monoterpeno	TEO	0,6	Grando et al., 2016
Carvacrol	Monoterpeno	TEO TDL	0,1 0,2	Andre et al., 2016

FONTE: O Autor (2019). LEGENDA: TEO= Teste de eclosão de ovos; TDL= Teste de desenvolvimento larvar; CL₅₀= Concentração letal para 50% dos ovos e larvas testados.

Os compostos fenólicos, timol e carvacrol, também demonstraram eficácia anti-helmíntica promissora (ANDRE et al., 2016). 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 (ANDRE et al., 2016).

O uso de OE e de seus compostos bioativos tem se mostrado como uma alternativa de controle para NGI, todavia, estudos têm utilizado a nanotecnologia com o objetivo de obter uma formulação mais estável (GRUPTA et al., 2005), menos tóxica e com maior eficácia anti-helmíntica (MESQUITA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015). A modificação química dos compostos bioativos de OE também pode ser uma alternativa para a obtenção de moléculas semissintéticas com atividade anti-helmíntica (ANDRE et al., 2017).

2.5 GÊNERO *Mentha*

Dentre as plantas com potencial anti-helmíntico encontram-se as espécies pertencentes ao gênero *Mentha*, o qual é parte da família Lamiaceae e possui mais de 25 espécies descritas com ampla abrangência global. As plantas deste gênero possuem grande importância econômica para a indústria de cosméticos, alimentos e farmacêutica (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2007). Diversos estudos já comprovaram efeito antioxidante, antimicrobiano, inseticida, antifúngico, repelente e anti-helmíntico dessa planta (MAHBOUBI; HAGHI, 2008; ALI et al., 1996; PAVELA, 2008; DZAMIC et al., 2010; TOLOZA, 2006; MACEDO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2009).

Segundo Bieski (2005), os princípios ativos dos vegetais são sintetizados através do metabolismo secundário e servem para a planta sobreviver e manter sua espécie inserida dentro de um determinado ecossistema, não estando ligado necessariamente com o fator crescimento e desenvolvimento do vegetal. As funções dessas substâncias estão pouco esclarecidas, mas sabe-se que estão associadas a defesa da planta contra agentes externos. Os óleos essenciais desse gênero são compostos por terpenos e fenilpropanoides, e são matéria prima para muitos feitos da indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (BIZZO, 2009).

Existem diversos relatos de efeitos promissores de terpenos em patógenos parasitários e infecciosos. Exemplo disso é o citral, já utilizado como anti-helmíntico em larvas de *Anisakis simplex* (HIERRO et al., 2006), como inibidor da diferenciação da fase epimastigota para tripomastigota em *Trypanosoma cruzi* (CARDOSO,

SOARES, 2010) e também como indutor de apoptose em formas promastigotas de espécies de *Leishmania* (MACHADO et al., 2012). Esses estudos citados sugerem que os terpenos apresentam potencial anti-helmíntico, sendo importante o estudo com OE em busca de novas formulações, as quais poderão contribuir no controle de NGI de ruminantes.

Os terpenos são substâncias que compõem os OE de diversas plantas e, quimicamente, podem ser definidos como “alcenos naturais”, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado, por outro lado, se um terpeno contém oxigênio, o mesmo é denominado de terpenoide, podendo apresentar diferentes funções químicas, entre as quais: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos (MC MURRY, 2011).

2.5.1 *Mentha villosa*

A *M. villosa* apresenta folhas ovais, curtamente pecioladas, aroma forte e muito característico (Figura 1). Quando presentes, as flores aparecem em forma de espigas curtas terminais, formam estolhos que crescem horizontalmente e dão origem a novos caules como se fossem novas plantas (LORENZI; MATOS; 2002).

FIGURA 1 - FOTO DAS FOLHAS E FLORAÇÃO DE *Mentha villosa*



FONTE: <https://www.secretgardengrowersstore.com/mentha-x-villosa.html>.

Matos et al. (1999), afirmam a utilização da *M. villosa* no tratamento de problemas gástricos e diarreia sanguinolenta em crianças. Tem sido relatado o uso dessa espécie contra amebíases, giardíases, tricomoníases urogenitais e esquistossomose, dentre outras atividades farmacológicas (SOUSA et al., 1997; MONTE e OLIVEIRA, 2001; LAHLOU et al., 2002). Resultados satisfatórios foram observados contra tricomoníase e esquistosomíases urogenital e efeito de analgesia do rotundifolone (óxido de piperitenona) em roedores (MARTINS et al., 2002). Nascimento (2012) também identificou a eficácia de 80 a 100%, usando o hidrolato (também composto de metabólitos secundários) de *M. villosa* no TEO de nematoides gastrintestinais de ruminantes nas maiores concentrações.

2.5.2 *Mentha piperita*

Com características anatômicas e morfológicas semelhantes a *M. villosa*, estudos com a espécie *M. piperita* apresentam eficácia contra gêneros de vetores de doenças em humanos como *Aedes* e *Culex* (WARIKOO, 2011), fungos responsáveis por causar dermatofitoses em animais e no homem como *Trichophyton metagrophytes*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* (SOKOVIC et al., 2006). OE de *M. piperita* também apresenta eficácia contra *Musca domestica* (MOREY; KHANDAGLE, 2012), *Candida* sp. (HÖFLING et al., 2010), Herpes virus tipos 1 e 2 (NOLKEMPER et al., 2006), *Pseudomonas fluorescens* (TYAGI; MALIK, 2010). Além da eficácia frente aos organismos já relatados, a *M. piperita* também apresenta atividade antiparasitária contra importantes PGI como *Echinococcus granulosus* (MAGGIORE et al., 2012). Atividade anti-helmíntica contra NGI de ruminantes também foi evidenciada por Katiki e colaboradores (2011) no TDL, obtendo CL50 de 0,26 mg/ml. Carvalho e colaboradores (2012) estudaram o efeito do OE de *M. piperita* em populações isoladas de *H. contortus* no TEO e obtiveram CL50 de 0,037 mg/ml.

2.5.3 Bioativos: Carvone e Limoneno

O carvone (Figura 2) é um monoterpeno da família dos terpenóides, com a fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, de nomenclatura 2-Metil-5-(prop-1-en-2-il) ciclo-hex-2-en-1-ona, presente no gênero *Mentha* e também em outras plantas, e pode funcionar

como antiparasitário e inseticida sustentável (KUMAR et al., 2011). O carvone apresenta duas formas estereoisómeras: R-carvone e S-carvone. No presente estudo, foi utilizado o enantiômero R-Carvone por ser a forma que é encontrada comumente em OE de *Menthas* (BROCKSON, T. J.; DE SOUSA, D.P.; FREDERICO, 2005).

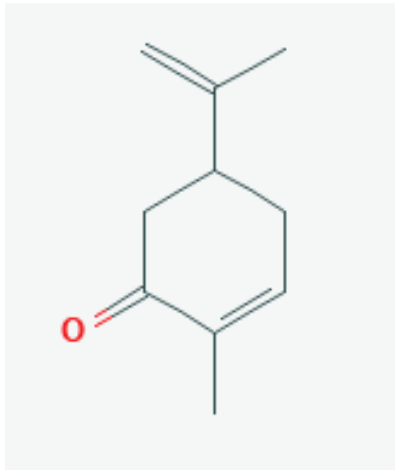
Esse monoterpeno, juntamente com outros componentes do OE é eficaz no controle de formigas e cupins (BEDOUKIAN et al., 2012). As atividades repelentes, inseticidas e fumigantes do OE de *Mentha* foram revisadas por Kumar et al. (2011). O óleo de *Mentha spicata*, que é rico em carvone, é eficaz no controle de *Tribolium castaneum*, *Musca domestica* e *Spodoptera littoralis*. Katiki e colaboradores (2017), relataram em seu trabalho eficácia do bioativo carvone frente ao TEO com eficácia elevada, com CL50 de 0,085 mg/ml.

A comissão Europeia de saúde e proteção aos consumidores realizou uma validação de estudos com a molécula do carvone frente a sua toxicidade em ratos. Os números apontam que o carvone se mostrou tóxico com CL50 dos animais acima de 2.000 mg/kg, quando administrado de forma oral e 4.000 mg/kg quando administrado de forma cutânea (ECHCP, 2008).

O limoneno (Figura 3) de nomenclatura 1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno é um monoterpeno, hidrocarboneto cíclico insaturado que pertence à família de terpenos, com fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. Formado a partir do alfa-terpineol, o limoneno possui centro quiral, ou seja, apresenta isomeria óptica (CROTEAU et al., 2000; MURRAY, LINCOLN, 1970). Segundo Simões et al. (2000) os limonoides são tetraterpenoides e talvez os maiores representantes dessa classe como substâncias inseticidas. Entretanto, monoterpenos simples, como o limoneno desempenham um papel de proteção contra insetos nas plantas que os produzem. Neste trabalho foi utilizado o L-limoneno e não o seu outro isômero, D- limoneno. O limoneno é precursor chave dos principais monoterpenos da *Mentha* (GARLET, 2007).

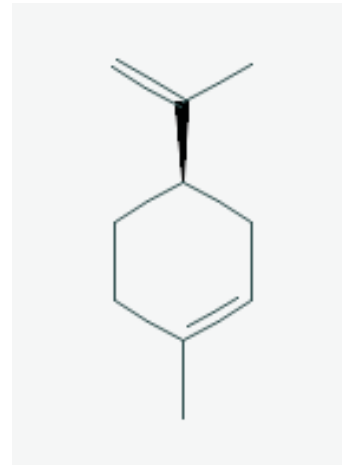
Segundo Ribeiro (2013), OE de *Eucalypto staigeriana*, composto por 72,9% de L-limoneno apresentou eficácia de 97,19% no TEO de *H. contortus* nas doses de 1,5 mg/ml e no TDL apresentou eficácia superior a 95% frente a mesma espécie de parasito na concentração de 8 mg/ml. Jorge (2017) utilizou OE da casca de *Citrus limon* Lineo (limão), rico em L-limoneno (teor de 48,99%), e encontrou eficácia contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*, com CL50 de 20,60 mg/L, sendo útil no combate a esquistossomose.

FIGURA 2 - Estrutura molecular do R- Carvone.



FONTE: LOPES et al., 2011.

FIGURA 3 - Estrutura molecular do S- Limoneno.



FONTE: LOPES et al., 2011.

2.6 CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/MS)

A cromatografia é um processo físico-químico de separação de constituintes de uma mistura, sendo que componentes voláteis de misturas podem ser separados por cromatografia gasosa. O perfil cromatográfico é aplicado em análises de identificação e também permite interferências sobre a pureza do material (FARIAZ, 2003). Segundo Silverstein e Webster (2000), a cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: fase estacionária e fase móvel. A amostra é transportada por uma corrente de gás através de uma coluna. O fluxo de gás passa pela coluna através da qual os componentes da amostra se deslocam a velocidades influenciadas pelo grau de interação de cada componente com fase estacionária, não volátil. Para colunas capilares utiliza-se uma câmara de injeção separada onde somente uma pequena parte da amostra vaporizada é transferida à coluna. Isso é necessário para não sobrecarregar a coluna com volume de amostras. As substâncias que têm maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, por tanto, separadas daquelas de menor interação. A medida que as substâncias eludem da coluna são quantificadas por um detector (FARIAZ, 2003).

Os componentes detectados são representados em gráficos chamados cromatogramas. Cada composto tem um tempo de retenção para uma coluna específica em condições padronizadas em relação a um composto padrão. Assim, cada composto é separado. A porcentagem de um composto presente no OE é

proporcional a área de pico no cromatograma. Devido a isso, tem-se a indicação dos componentes presentes e a quantidade de cada um nas amostras (ARAUJO, 1999).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica poderosa que, associada a cromatografia gasosa, é utilizada para identificar compostos desconhecidos e quantificar compostos conhecidos, além de ajudar na elucidação da estrutura das moléculas. É uma técnica de impacto de elétrons. As moléculas na fase de vapor são bombardeadas por um feixe de elétrons de alta energia, a maior parte dos íons formados tem carga unitária, estes íons são os registrados pelo detector e separados na razão massa/carga (m/z) (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

2.7 TECNOLOGIA DE NANOEMULSÃO

Nanoemulsões são sistemas coloidais que podem encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos e que têm sido cada vez mais utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e agroquímica com várias finalidades (McCLEMENTS, 2012; FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004). Esses sistemas são caracterizados por serem dispersões obtidas a partir de dois líquidos imiscíveis, desde que, pelo menos um destes líquidos seja disperso sob forma de nanogotículas (com diâmetro menor que 300 nm), havendo assim duas fases, em que pequenas gotículas de uma das fases (a fase dispersa) estão dispersas na outra fase (fase contínua) (COSGROVE, 2005).

Atualmente, as nanoemulsões são produzidas visando aplicações em alimentos para a proteção e liberação controlada de ingredientes funcionais lipofílicos, tais como: lipídios biologicamente ativos, como vitaminas, agentes conservantes, carotenoides e flavonoides (MAYER; WEISS, MCCLEMENTS, 2013).

As nanoemulsões, assim como emulsões convencionais, podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou ao contrário. Sendo sistemas termodinamicamente instáveis, e que, portanto, não podem ser formadas espontaneamente, necessitando de adição de energia para que o processo de formação ocorra. Essa energia pode ser proveniente de dispositivos mecânicos como homogeneizadores ultrassônicos, ou ainda, podem ser produzidas pela alteração da energia química dos componentes, por meio de métodos de baixa energia, como emulsificação espontânea ou inversão de fase (SOLANS et al., 2005).

Uma das principais vantagens do uso de nanoemulsões é que elas são capazes de aumentar a biodisponibilidade de substâncias bioativas lipofílicas (POTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007), além de proteger o conteúdo encapsulado contra a oxidação e volatilização (McCLEMENTS; RAO, 2011).

Uma característica considerada importante nos programas de controle do parasitismo é o tempo de duração do efeito dos princípios ativos. Esse tempo está associado com as propriedades farmacocinéticas do anti-helmíntico, bem como propriedades físico-químicas e a tecnologia farmacêutica aplicada na disponibilização sistêmica deste medicamento (LIFSCHITZ et al., 2007). Além disso, a possibilidade de liberar o medicamento no sítio específico de ação é uma grande vantagem dos sistemas de liberação controlada, pois o efeito dos óleos essenciais sobre os parasitos vai depender da capacidade dos seus componentes químicos continuarem ativos após a passagem pelo rúmen (BENCHAAR et al., 2008).

Em geral, a nanotecnologia pode proteger o princípio ativo da degradação, melhorar a absorção do fármaco e facilitar a sua difusão pelo tecido, além de modificar a farmacocinética e o perfil de distribuição da droga no tecido, bem como sua penetração na célula (COUVREUR E VAUTHIER, 2006).

Sendo assim, a utilização desse sistema possui muitas vantagens, pois permite que o princípio ativo seja liberado em um sítio específico de ação, baixa toxicidade, aumento do índice terapêutico, diminuição da dose administrada e maior biodisponibilidade (AZEVEDO, 2005). Segundo Gonsalves et al. (2009), o uso de sistemas carreadores promove uma resolução para algumas problemáticas relacionadas com a estabilidade dos óleos essenciais, como a oxidação e a volatilização dos constituintes químicos. Além disso, esse sistema reduz os níveis de oscilação do princípio ativo na corrente sanguínea, evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos (PEZZINI et al., 2007).

Os tensoativos não iônicos, por não possuírem carga verdadeira, formam gotículas que não apresentam dupla camada elétrica e a estabilização das emulsões ocorrem pelo impedimento estérico de suas moléculas com partes polares, geralmente, longas. O tensoativo de escolha para as formulações foi o *Polissorbato 80*, denominado Monolaurato de Sorbitano etoxilado *80 OE* -sigla Tp80, e comercialmente é chamado de *Tween 80* (BRUXEL, et al. 2012)

Trata-se de tensoativos não-iônicos do grupo dos polioxietileno-sorbitanos (*Tweens*) que têm se mostrado promissores em combinação com os fosfolipídeos,

pois levam a formação de filmes mistos compactos, conferindo maior estabilidade à formulação (BRUXEL, et al. 2012).

O desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada de fármacos, como é o caso das nanoemulsões, quando atrelado a medicina veterinária tem por objetivo melhorar a eficácia dos tratamentos e minimizar os riscos e os custos dos mesmos. Além disso, a indústria animal moderna requer produtos mais eficientes e ecologicamente corretos (MARTIN, KADOKAWA, 2006). É crescente o interesse em estudos com o uso de plantas medicinais e seus derivados de importância veterinária e sistemas coloidais como nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas são objetos de pesquisa sobre novas configurações para carrear e liberar fármacos para locais específicos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A rodococose equina, doença que acomete o trato respiratório de potros, tem como agente etiológico a bactéria *Rhodococcus equi* (MUSCATELLO et al., 2007). O tratamento com antimicrobianos macrolídeos associados com a rifampicina são as principais formas de controle da doença. Nanoemulsões do OE de *Melaleuca alternifolia* inibiram o crescimento dos isolados de *Rhodococcus equi* do solo e das fezes. Entretanto, o uso das nanoestruturas contendo o OE dessa planta em comparação com o OE puro não nanoestruturado aumentou de forma considerável sua capacidade inibitória (SAGAVE et al., 2015).

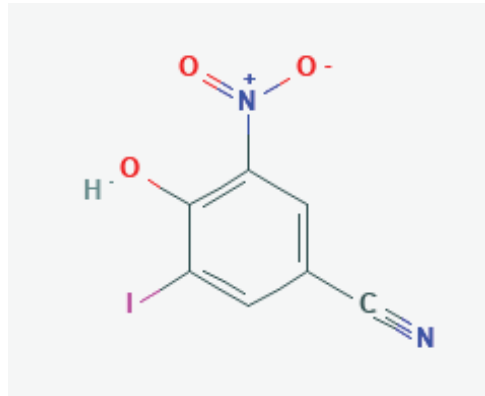
Em suínos, a atividade antimicrobiana da clorexidina associada à nanocápsulas apresentou maior atividade sobre o *Staphylococcus epidermidis* do que os fármacos comerciais (LBOUTOUNNE et al., 2002). Emulsão formulada com 10% do OE de Neem (*Azadirachta indica*) no controle de *Psoroptes ovis* em coelhos naturalmente infestados foi bastante eficaz, principalmente quando comparado ao tratamento convencional (FERNANDES et al., 2012).

2.8 NITROXINIL

O Nitroxinil (4-Hydroxy-3-iodo-5-nitrobenzonitrile), de forma molecular $C_7H_3IN_2O_3$ (Figura 4) e peso molecular 290,01 g/mol, é um antiparasitário indicado para o tratamento e controle de *Fasciola hepatica* e nematoides em geral em bovinos, ovinos e caprinos. O composto é tóxico por ingestão, podendo causar irritação alérgica quando em contato com a pele, pode causar grave irritação nos olhos, nas vias

respiratórias e é extremamente tóxico para a vida aquática (*Pimephales promelas* CL50= 0,034 mg/l) (WHELAN et al., 2011). O Nitroxinil, possui como mecanismo de ação, a capacidade de desacoplar a fosforilação oxidativa, interferindo na obtenção de energia do parasito, matando por inanição (MONTEIRO, et al., 2010).

FIGURA 4 - ESTRUTURA MOLECULAR DO NITROXINIL



FONTE: WHELAN et al., (2011).

De acordo com Cunha Filho e Yamamura (1999), o valor mínimo aceitável no percentual de redução na contagem de OPG é de 90%. Portanto, em seus estudos, os resultados encontrados sobre os princípios ativos Closantel 10% e Nitroxinil 34% indicaram uma resistência parasitária inicial ao Nitroxinil 34%, com 85,7% de eficácia, e uma resistência parasitária mais pronunciada ao Closantel 10%, com 73,7% de eficácia. Albert et al. (2004) relataram que a formulação de Nitroxinil 34% mostrou-se eficaz no controle de cepas de *Haemonchus* sp. resistentes por um período de 21 dias. Monteiro e colaboradores (2010) testaram diversos antiparasitários em ovinos, tendo o Nitroxinil (34%) com o melhor resultado, com eficácia de 83%. Relatam ainda que quando utilizada a associação do Nitroxinil com Moxidectina essa eficácia cai para 80%. No mesmo trabalho, o Closantel 10% apresentou eficácia de 81%. Marini et al. (2014) testaram Nitroxinil 34% e Closantel 10% contra nematoides de ovinos no município de Marília, SP e o Nitroxinil apresentou o melhor resultado com eficácia de 80%.

Neste trabalho, a escolha do antiparasitário Nitroxinil 34% partiu de uma triagem realizada com diversos antiparasitários no TIML contra NGI de ovinos. Dentre os produtos testados; Albendazol, Ivermectina, Monepantel e Nitroxinil, este último apresentou melhor eficácia, sendo assim o antiparasitário adotado como controle positivo para este trabalho e sendo também utilizado nos testes em combinações.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito anti-helmíntico do OE de *M. villosa* e *M. piperita* e dois de seus princípios ativos, carvone e limoneno, contra larvas de nematodas gastrintestinais de ruminantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito anti-helmíntico, por meio de teste *in vitro*, dos OE e dos bioativos contra parasitos nematodas gastrintestinais de ruminantes.
- Avaliar o efeito anti-helmíntico, por meio de teste *in vitro*, do OE de *M. villosa* sob a forma de nanoemulsão contra parasitos nematodas gastrintestinais de ruminantes.
- Testar o OE de *M. villosa* e *M. piperita* e os compostos carvone e limoneno em combinação com o antiparasitário Nitroxinil.
- Testar o OE de *M. villosa* sob nanoemulsão em combinação com o antiparasitário Nitroxinil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL E BIOATIVOS

As amostras de *M. villosa* foram plantadas (Figura 5) anteriormente pela Médica Veterinária, Dr. Amanda Chaaban, na área de cultivo do Instituto Federal Catarinense, sediado em Araquari, SC (26°, 23' 33.6691" S e 48° 44' 18.3336" W). Uma exsicata da planta foi depositada no Herbário do Museu Botânico da Universidade Federal do Paraná, UFPR, sob o protocolo de número 358.966. As amostras de *M. villosa* foram cordialmente cedidas para a realização deste trabalho.

FIGURA 5 - CANTEIRO DE *M. Villosa* NA ÁREA DE CULTIVO DO INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA



FONTE: Amanda Chaaban (2018).

Foi realizada a coleta de toda a parte aérea da planta, pela manhã no horário de 8h. Toda a parte aérea da planta foi utilizada para a extração do OE.

A extração do OE foi feita pelo método de hidrodestilação em aparelho *Clevenger* com condensador vertical de bola, onde a planta (900 g de material) foi inserida em balão volumétrico contendo aproximadamente 5 L de água destilada. O balão foi adaptado ao extrator e aquecido a temperatura suficiente ($\pm 100^{\circ}\text{C}$) para o sistema entrar em ebulição. Durante o período em que o sistema esteve em ebulição, as substâncias voláteis e os vapores de água foram conduzidos até o condensador adaptado ao aparelho, possibilitando a destilação e a circulação contínua dos mesmos

através do sistema fechado e vaso-comunicante, fazendo com que o OE da planta se acumulasse gradualmente no reservatório de separação do aparelho (WASCKY, 1963). Após a coleta do OE, ele foi mantido congelado e protegido da luz até a realização das análises propostas pelo trabalho.

Esse processo foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, sob coordenação do Prof. Dr. Cícero Deschamps e com a ajuda do Técnico Roger Cipriano.

O OE de *M. piperita* foi adquirido comercialmente da empresa Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil), bem como os bioativos carvone e o limoneno, sob os códigos 7741111, 124931 e 183164, respectivamente.

4.2 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/MS)

A identificação dos constituintes químicos do OE foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) (Shimadzu 2010 Plus) no Departamento de Química, UFPR sob coordenação da Prof. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia. Os OE foram diluídos em hexano na proporção de 1% e 1,0 µl da solução foi injetada. A separação dos constituintes foi obtida em coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%- dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e utilizando hélio como gás carreador (1,0 ml min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240°C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras min⁻¹ e faixa de massas de 40 a 450 µ. A linha de transferência foi mantida a 260 °C, a fonte de íons a 230 °C e o analisador (quadrupolo) a 150 °C.

A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas e também seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de n-alcanos (C7-C30) (VAN DE DOOR e KRATZ, 1963), com bases de dados e com a literatura (ADAMS, 2007).

Para a quantificação, as amostras diluídas foram injetadas em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280 °C. Foram empregadas a mesma coluna e condições analíticas descritas acima,

exceto pelo gás carreador usado, que foi o hidrogênio, a uma vazão de 1,5 ml min⁻¹. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (%).

4.3 NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa*

A nanoemulsão do OEMV coletado no ano de 2017 foi cordialmente cedida pela Médica Veterinária, Dr.^a Amanda Chaaban, para aplicação neste trabalho. A nanoemulsão O/A (óleo-água) foi preparada usando o composto ativo OEMV, como fase dispersa e água destilada e Tween 80 (polissorbato 80) como fase contínua. A mistura foi feita acrescentando o OEMV a 2%, Tween 80 a 0,05% e H₂O a 97,95%.

A fase contínua (Tween 80 e água destilada) foi invertida sobre a fase dispersa (fase oleosa, composto ativo) e homogeneizada em Ultra-Turrax (T25 digital IKA, Staufen, Alemanha) com um rotor S 25N – 18G a 9000 rpm por 1 minuto, formando uma pré-emulsão, com objetivo de potencializar a etapa subsequente. Para a obtenção da nanoemulsão, esta pré-emulsão foi submetida à homogeneização de alta pressão (homogeneizador APLAB 10 - Artepeças, Brasil) durante 20 ciclos a uma alta pressão de 400 bar. Este processo ocorreu no Laboratório de Óleos Essenciais da EPAGRI - Unidade de Itajaí, em Santa Catarina, conduzido pelo Dr. Fabiano Bertoldi. As amostras foram transferidas para frascos âmbar e armazenadas por 24 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para posterior análise de índice de polidispersão (IP) e potencial zeta no equipamento Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), com o objetivo de avaliar a estabilidade da nanoemulsão. Amostras apenas com Tween 80 e H₂O foram submetidas aos mesmos processos e analisadas como um dos controles branco no ensaio de TIML.

4.4 OBTENÇÃO DE LARVAS DE NEMATODAS GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias e aprovado sob o protocolo de número 088/2017 (Anexo 1). Os

animais utilizados para coleta de fezes foram provenientes do LAPOC, Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos, sediada na Fazenda Canguiri em Pinhais, PR.

Para obtenção de larvas de NGI de ruminantes foi realizada a coprocultura (ROBERT; O'SULLIVAN, 1950), para a qual fezes de 10 ovinos naturalmente infectados foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, misturadas com vermiculite, umedecidas com água destilada e postas em vidros para cultura. As coproculturas foram dispostas em estufa B.O.D (S.S. Santana – Tecnologia Científica, Londrina, PR, Brasil) a $\pm 27^{\circ}\text{C}$ por 10 dias, com umidade relativa entre 70 a 80%. Para a recuperação das larvas após o período de cultura, foi acrescentado água morna ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) até preencher completamente o vidro de cultivo e bruscamente invertido sobre a placa de *Petri*. Acrescentou-se água até cobrir o fundo da placa de *Petri* e, após 12 horas, o conteúdo da placa foi coletado com auxílio de uma pipeta *Paster* e transferido para um tubo de ensaio. A identificação das larvas foi feita analisando a morfologia em microscópio óptico, conforme van Wyk et al. (2004). As larvas foram contadas e 100 L3 foram identificadas.

4.5 TESTES DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR (TIML)

Para a realização do TIML foi utilizada a metodologia adaptada por Demeler et al. (2010). As L3 tiveram suas bainhas removidas usando 0,5% (v/v) de hipoclorito de sódio pelo período de cinco minutos (anexo 2). Posteriormente, foram lavadas três vezes por centrifugação (por dois min a 2000 rpm) com água destilada e, após serem quantificadas em triplicata, foram adicionadas em placas de 24 poços (aproximadamente 200 larvas/poço).

Após serem adicionadas nas placas de 24 poços, as larvas foram incubadas em estufa B.O.D. (S.S. Santana – Tecnologia Científica, Londrina, PR, Brasil) a $\pm 27^{\circ}\text{C}$ (anexo 3) por 18h, contendo as diferentes concentrações dos diferentes produtos conforme serão descritos abaixo separadamente. Posterior a essa incubação, todo o conteúdo de cada poço da placa foi transferido para outra placa contendo um aparato devidamente preparado (anexo 4) em cada poço para a etapa de migração larvar. Essas placas foram incubadas em estufa B.O.D. (S.S. Santana – Tecnologia Científica, Londrina, PR, Brasil) a 27°C por 24 horas (segunda incubação). Após o tempo determinado, cada aparato foi removido cuidadosamente de dentro de cada

poço da placa e as larvas que migraram foram contadas em microscópio óptico invertido em aumento de 10 vezes (anexo 5).

Para a diluição dos OE e bioativos foi utilizado Tween 80 a 2% (v/v) e todos os testes foram feitos acompanhados de controles negativos (água e Tween 80 a 2%) e controle positivo (Nitroxinil 68 mg/ml – Laboratórios Microsules, Canelones, Uruguai). Os testes foram feitos em quadruplicatas.

4.5.1 TIML utilizando os OE de *M. villosa* coletados em 2017 e em 2018, *M. piperita* e os bioativos carvone e limoneno

- Concentrações finais do OEMV: 1,1; 2,2; 4,5; 9,1; 18,3; 36,7 e 73,4 mg/ml.
- Concentrações finais do OEMP: 1,1; 2,2; 4,4; 8,9; 17,9; 35,9; 71,8 e 143,6 mg/ml.
- Concentrações finais do carvone: 1,1; 2,3; 4,7; 9,5; 19,1 e 38,3 mg/ml.
- Concentrações finais do limoneno: 8,4; 16,8; 33,6; 67,3; 134,7 e 202,2 mg/ml.

4.5.2 TIML utilizando o OE de *M. villosa* sob nanoemulsão

O TIML também foi usado para testar a capacidade antiparasitária do OE de *M. villosa* sob nanoemulsão frente a L3 de NGI. Para isso, foram testadas as concentrações finais de 0,022; 0,045; 0,091; 0,183 e 0,367 mg/ml, seguindo a metodologia já descrita neste tópico. A nanoemulsão foi realizada com o OEMV coletado no ano de 2017.

4.5.3 TIML realizado com as combinações entre os produtos

Posteriormente, o TIML também foi utilizado para a avaliação da eficácia dos OE e seus bioativos em combinação com o antiparasitário comercial Nitroxinil (Laboratórios Microsules, Canelones, Uruguai) e entre eles. Para isso, utilizou-se a

CL 50 de ambos, exceto do limoneno, que foi estipulado uma concentração diferente da CL50 para os tratamentos em combinações:

- Combinação Nitroxinil + OE *M. piperita*: Inicialmente foi utilizado a CL50 do Nitroxinil (13,84 mg/ml) em adição as seguintes concentrações de OEMP: 1,1; 2,2; 4,4; 8,9; 17,9; 35,9; 71,8; 143,6 mg/ml. Posteriormente, foi testado a CL50 do OEMP (4,23 mg/ml) em adição as seguintes concentrações de Nitroxinil: 1,7; 3,4; 6,8; 13,6; 27,2 e 54,4 mg/ml.
- Combinação Nitroxinil + carvone: Primeiramente foi testado a CL50 do Nitroxinil (13,84 mg/ml) em adição com as seguintes concentrações de carvone: 1,1; 2,3; 4,7; 9,5; 19,1 e 38,3 mg/ml. Após isto, foi testado a CL50 do carvone (1,93 mg/ml) com as seguintes concentrações de Nitroxinil: 1,7; 3,4; 6,8; 13,6; 27,2 e 54,4 mg/ml.
- Combinação Nitroxinil + limoneno: Inicialmente foi testado a CL50 do Nitroxinil (13,84 mg/ml) em adição as seguintes concentrações de limoneno: 4,2; 8,4; 16,8; 33,6; 67,3 e 134,7 mg/ml. Posteriormente foi testado limoneno a 3% (25,2 mg/ml) com as seguintes concentrações de Nitroxinil: 4,8; 8,5; 17; 34 e 68 mg/ml.
- Combinação carvone + limoneno: Primeiramente foi utilizado a CL50 do carvone (1,93 mg/ml) com as seguintes concentrações do limoneno: 4,2; 8,4; 16,8; 33,6; 67,3 e 134,7 mg/ml. Logo após, foi testado limoneno a 1% (8,4 mg/ml) com as seguintes concentrações de carvone: 1,1; 2,3; 4,7; 9,5; 19,1 e 38,3 mg/ml.
- Combinação Nitroxinil + OE *M. villosa* sob nanoemulsão: Foi testado a CL50 do OE de *M. villosa* sob nanoemulsão (0,1010 mg/ml) com as seguintes concentrações de Nitroxinil: 4,8; 8,5; 17; 34 e 68 mg/ml.

Todos os testes descritos acima foram realizados seguindo a metodologia de TIML já descrita neste tópico.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o método de Análise de Variância (ANOVA) para avaliar a influência das variáveis preditoras (concentração e produtos) sobre a eficácia. O teste

de Tukey foi adotado para avaliar a diferença estatística entre a eficácia e a concentração dos produtos.

As análises estatísticas foram realizadas pelo software R Core Team (2017). Para auxílio nas análises das curvas concentração-eficácia, bem como nos agrupamentos do teste de Tukey, os pacotes estatísticos "drc" (RITZ et al., 2015) e "agricolae" (MENDIBURU, 2017) foram utilizados, respectivamente. As análises foram realizadas com a orientação do Médico Veterinário, MSc. Alan dos Anjos.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LARVAS

Do total de L3 identificadas, 74% representam *Haemonchus* spp. e 36% representam *Trichostrongylus* spp (Anexo 6) (van Wyk et al., 2004). Foram realizadas cinco coproculturas simultâneas e a identificação ocorreu a partir de uma alíquota da junção de todas essas.

5.2 ESTABILIDADE DA NANOEMULSÃO

A análise de estabilidade forneceu os resultados sobre o tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão (IP) das partículas, apresentando diâmetro de 164 nm, valores de IP e potencial zeta de 0,26 e -36,41 mV.

5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA *M. villosa* E *M. piperita* por CG/MS

Foi possível identificar a grande maioria dos compostos nos três OE das duas plantas; *M. villosa* coletada em 2017, *M. villosa* coletada em 2018 e *M. piperita*, obtendo assim 90,72; 93,85 e 95,25% de compostos identificados, respectivamente. Na Tabela 3 é possível verificar quais os componentes encontrados e suas concentrações, em porcentagem.

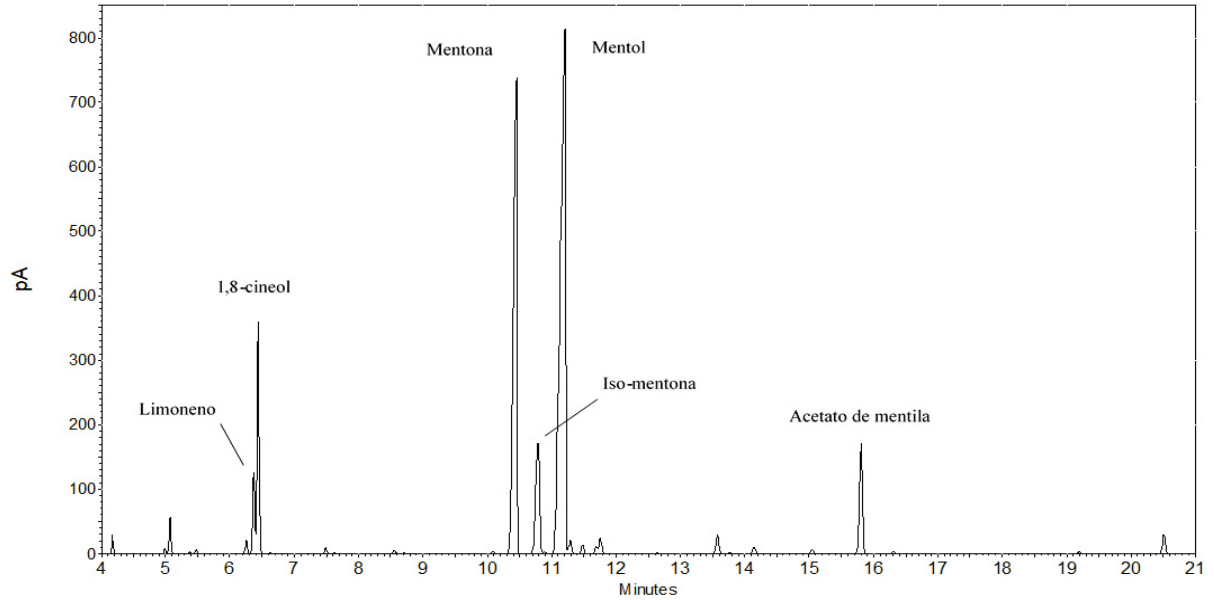
Na Figura 6 é possível visualizar o cromatograma do OE da *M. piperita*, onde o composto majoritário menthol, apresentou o maior pico. Na Figura 7 e 8, é possível visualizar o cromatograma do OEMV coletada em 2017 e 2018, respectivamente. O composto majoritário apresentou o maior pico, sendo o carvone seguido do limoneno.

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (%) DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha piperita* E *Mentha villosa*, IDENTIFICADAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA.

Composto	IR	<i>M. piperita</i>	<i>M. villosa</i> 2018	<i>M. villosa</i> 2017
β -pineno	974	1,07	0,39	0,83
o-cymeno	1022	0,43	x	0,18
limoneno	1024	2,71	6,81	17,49
1.8-cineol	1026	7,45	x	x
γ -terpineno	1054	0,2	0,98	1,09
menthona	1148	27,68	x	x
iso-menthona	1158	7,19	0,22	0,27
menthol	1167	41,86	0,38	0,61
carvone	1239	x	83,87	68,8
carvotanacetona	1244	0,33	0,12	0,11
acetato de menthyla	1294	5,34	x	x
(E)-cariofileno	1417	0,99	1,08	1,34
Percentual identificados		95,25%	93,85%	90,72%

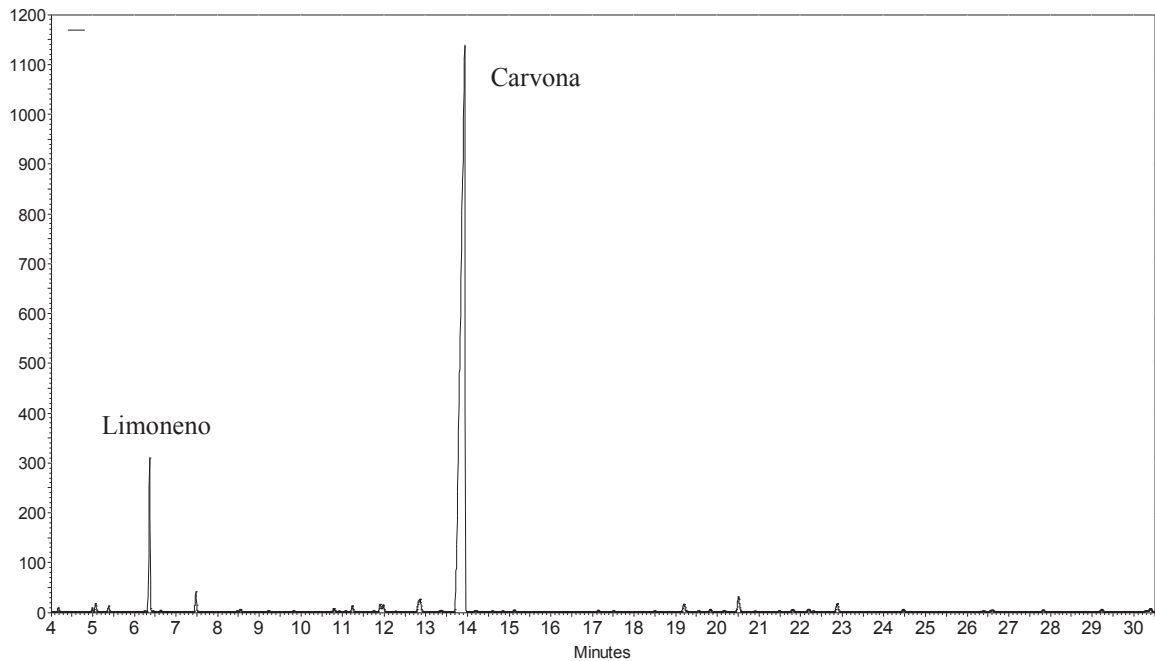
FONTE: O Autor (2019). LEGENDA: IR= Índice de Retenção, X= não presente.

FIGURA 6 - PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.



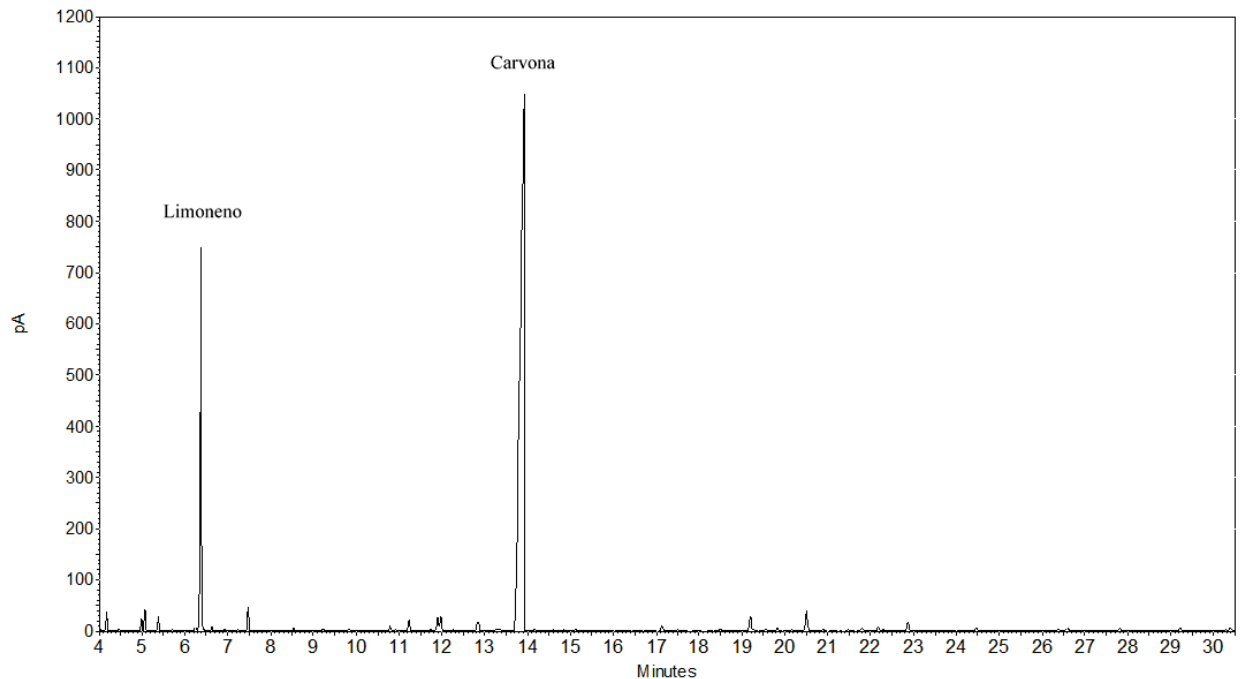
FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 7 - PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa* COLETADO EM 2017 ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.



FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 8 - PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa* COLETADO EM 2018 ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSA.



FONTE: O Autor (2019).

5.4 TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha villosa* E *Mentha piperita* E SEUS BIOATIVOS, CARVONE E LIMONENO

Os resultados do TIML foram concentração-dependente (Tabela 4). Para o OEMV coletado em 2017 a eficácia máxima foi de 70,59%, com uma CL50 de 3,59 mg/ml (Tabela 4). Para o OE da mesma planta, coletada em 2018, a eficácia foi de até 86,33% com uma CL50 de 3,04 mg/ml (Tabela 5). O OEMP obteve eficácia de 95,54% com a CL50 de 4,23 mg/ml. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos no TIML entre os OEMV coletados em anos diferentes (2017 e 2018), mesmo havendo diferença no percentual do bioativo carvone de um ano para o outro (2017 = 68,8%; 2018 = 83,8%), na composição do OE.

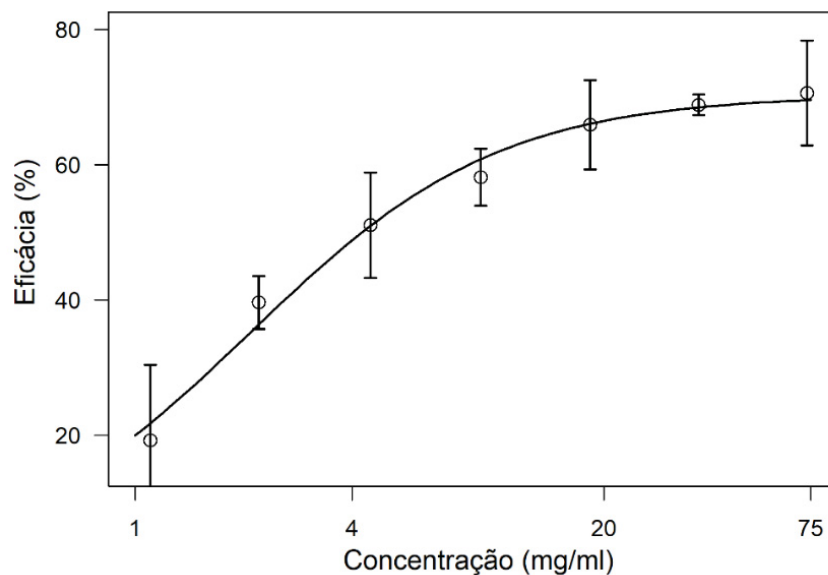
TABELA 4 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa*, COLETADA NO ANO DE 2017.

Concentração OEMV 2017 (mg/ml)	Eficácia sobre a Migração Larvar (%)
73,4	70,59 \pm 7,77 a*
36,7	68,86 \pm 1,55 ab
18,3	65,92 \pm 6,59 ab
9,1	58,13 \pm 4,22 abc
4,5	51,04 \pm 7,80 bc
2,2	39,62 \pm 3,89 c
1,1	19,20 \pm 11,18 d
Ctw	3,46 \pm 8,15
H ₂ O	0,00 \pm 0
Nitroxinil	98,96 \pm 0,51
CL ₅₀	3,59 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: OEMV= Óleo essencial de *M. villosa*, CL₅₀=Concentração letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água. *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias.

FIGURA 9 – PERCENTUAL DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa* COLETADO EM 2017 FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

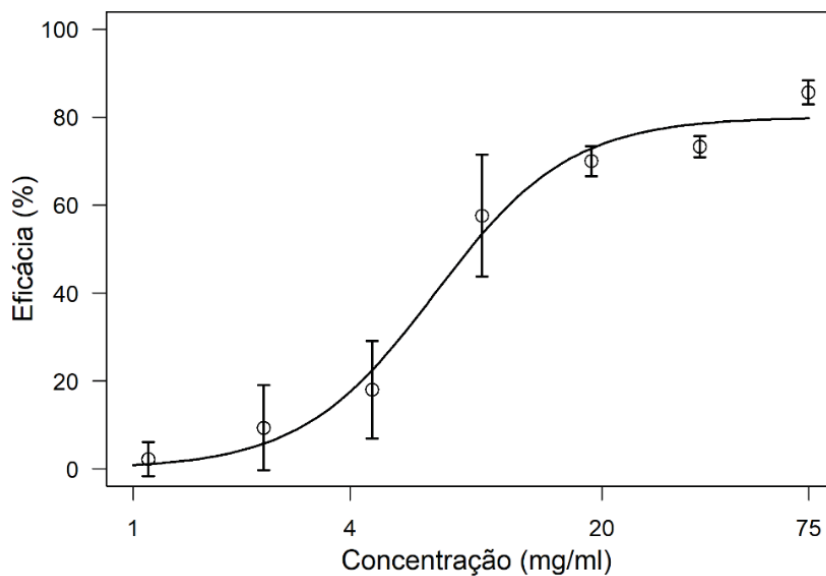
TABELA 5 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa*, COLETADA NO ANO DE 2018.

Concentração OEMV 2018 (mg/ml)	Eficácia sobre a Migração Larvar (%)
74,9	86,33 \pm 2,56 a*
37,4	81,31 \pm 2,26 ab
18,7	74,56 \pm 3,24 ab
9,3	71,45 \pm 13,22 ab
4,6	59,68 \pm 10,53 c
2,3	21,97 \pm 10,12 c
1,1	13,14 \pm 7,29 c
Ctw	3,46 \pm 8,15
H ₂ O	0,00 \pm 0
Nitroxinil	98,96 \pm 0,51
CL50	3,04 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: OEMV= Óleo essencial de *M. villosa*, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água. *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias.

FIGURA 10. PERCENTUAL DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa* COLETADO EM 2018 FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

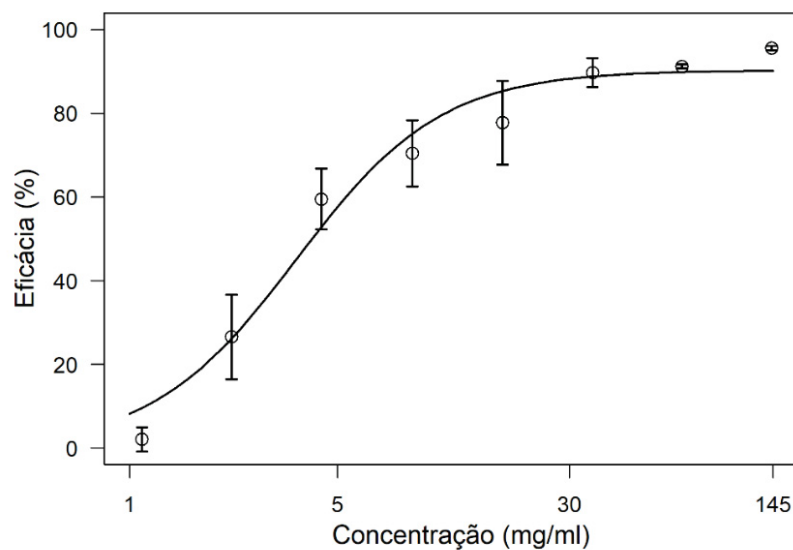
TABELA 6 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita*.

Concentração OEMP (mg/ml)	Eficácia sobre a Migração Larvar (%)
143,6	95,54 \pm 0,51 a*
71,8	91,22 \pm 0,51 ab
35,9	89,74 \pm 3,44 ab
17,9	77,73 \pm 10,03 bc
8,9	70,44 \pm 7,91 cd
4,4	59,51 \pm 7,25 d
2,2	26,5 \pm 10,09 e
1,1	1,34 \pm 3,72 f
Ctw	5,93 \pm 9,40
H ₂ O	0,00 \pm 0
Nitroxinil	99,05 \pm 1,27
CL50	4,23 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: OEMP= Óleo essencial de *M. piperita*, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água. *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias.

FIGURA 11 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

Os resultados do TIML para o bioativo carvone, que se apresentou como o composto majoritário do OEMV, também foram concentração-dependente, onde as maiores concentrações demonstraram melhor eficácia contra a migração de larvas de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp., com eficácia de até 88,20% e uma CL50 de 1,96 mg/ml (Tabela 7 e Figura 12). Para o bioativo limoneno, composto presente nos OE de ambas as plantas, o efeito não foi concentração-dependente, apresentando uma CL50 de 14,27 mg/ml (Tabela 8 e Figura 13).

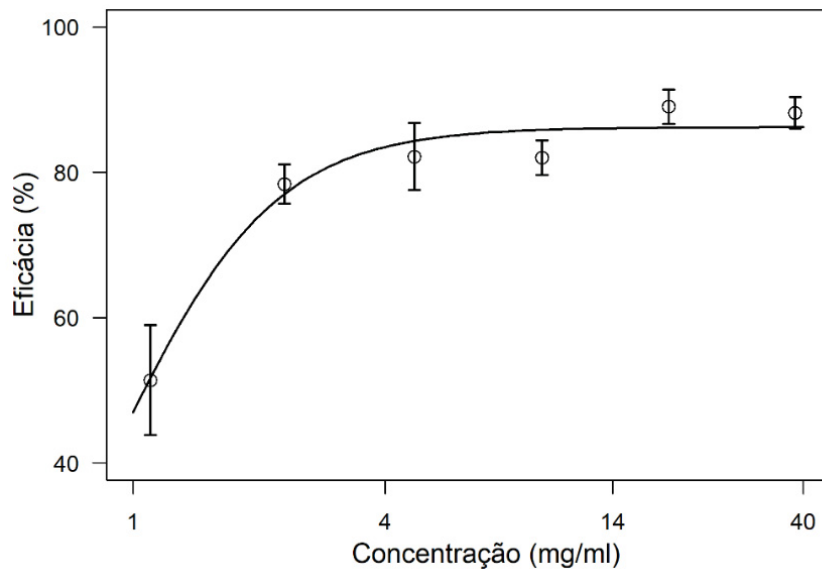
TABELA 7 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus* spp. E *Trichostrongylus* spp. SOB EFEITO DO BIOATIVO CARVONE.

Carvone (concentração mg/ml)	Eficácia (%)
38,3	88,20 \pm 2,15 a*
19,1	89,04 \pm 2,36 a
9,5	77,94 \pm 2,38 ab
4,7	82,16 \pm 4,61 ab
2,3	78,37 \pm 2,69 b
1,1	51,40 \pm 7,57 c
Ctw	0,00 \pm 9,40
H ₂ O	0,00 \pm 0
Nitroxinil	98,87 \pm 1,27
CL50	1,96 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água. *Letra igual indica que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias.

FIGURA 12 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O BIOATIVO CARVONE FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

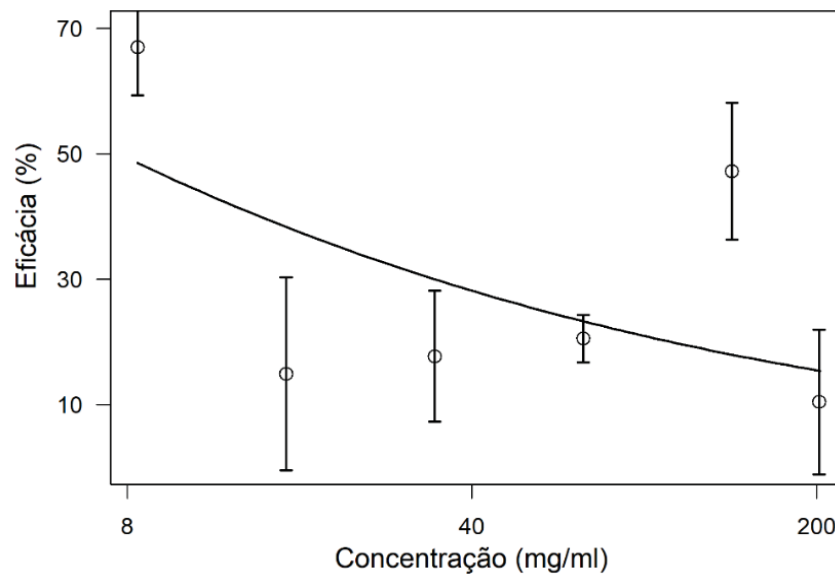
TABELA 8 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O BIOATIVO LIMONENO FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*

Bioativo Limoneno (mg/ml)	Eficácia sobre a Migração Larvar (%)
202,2	47,19 ± 12,06 b*
134,7	20,50 ± 10,91 b
67,3	17,69 ± 3,79 b
33,6	14,60 ± 10,44 b
16,8	66,99 ± 15,77 b
8,4	13,14 ± 7,72 a
Ctw	9,97 ± 9,40
H ₂ O	0,00 ± 0
Nitroxinil	98,96 ± 1,27
CL50	14,27 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água. *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias.

FIGURA 13 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O BIOATIVO LIMONENO FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus* spp. E *Trichostrongylus* spp.



FONTE: O Autor (2019).

5.5 TESTE DE MIGRAÇÃO LARVAR COM NANOEMULSÃO DE *Mentha villosa*

Os resultados obtidos no TIML utilizando a nanoemulsão do OEMV também foram concentração-dependente (Tabela 9 e Figura 14).

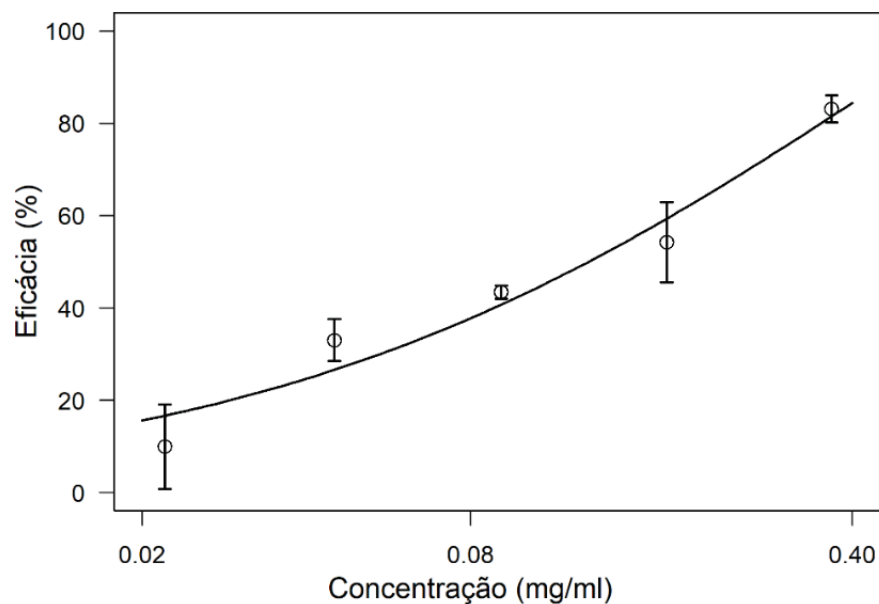
TABELA 9 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DO OEMV EM NANOEMULSÃO.

OEMVnano (mg/ml)	Eficácia sobre a Migração Larvar (%)
0,367	83,12 \pm 2,96 a*
0,183	54,21 \pm 8,66 b
0,091	43,44 \pm 1,42 bc
0,045	33,03 \pm 4,58 c
0,022	9,69 \pm 9,57 d
Ctw	0,00 \pm 9,52
H ₂ O	0,00 \pm 0
Nitroxinil	98,74 \pm 1,12
CL50	0,1010 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: OEMVnano= Óleo essencial de *Mentha villosa* sob nanoemulsão, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água). *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias.

FIGURA 14 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha villosa* EM NANOEMULSÃO FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

5.6 TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR PARA OS TRATAMENTOS EM COMBINAÇÕES

No TIML com as combinações buscando interações entre as drogas, os melhores valores de eficácia foram encontrados nas maiores concentrações com a CL50 dos compostos, evidenciando um efeito concentração-dependente.

5.6.1 Combinação do OE de *Mentha piperita* com Nitroxinil

Neste teste foi possível observar que a CL50 do antiparasitário Nitroxinil acrescida da concentração de 1,1 mg/ml do OEMP gerou efeito marcadamente sinérgico, culminando em uma eficácia média de 70,82%, comparado com 1,34% sem a adição do Nitroxinil (Tabela 10). Nas concentrações de 2,2 e 4,4 mg/ml do OEMP foi possível afirmar que houve um efeito aditivo e nas demais concentrações, houve efeito nulo (Figura 15). Efeitos sinérgicos são observados nas menores concentrações, justamente porque sinergia é quando o resultado da combinação testada é superior à soma dos resultados esperados por cada concentração.

Observamos que no teste realizado com a CL50 do OEMP e o Nitroxinil em várias concentrações, houve sinergismo entre as duas menores concentrações (1,1 e 2,2 mg/ml), acrescidas da CL50 do OEMP (Tabela 11 e Figura 16). Para este teste, foi obtido eficácia de 74,13 e 83,54%, respectivamente. Nas demais concentrações foi observado efeito aditivo e nulo.

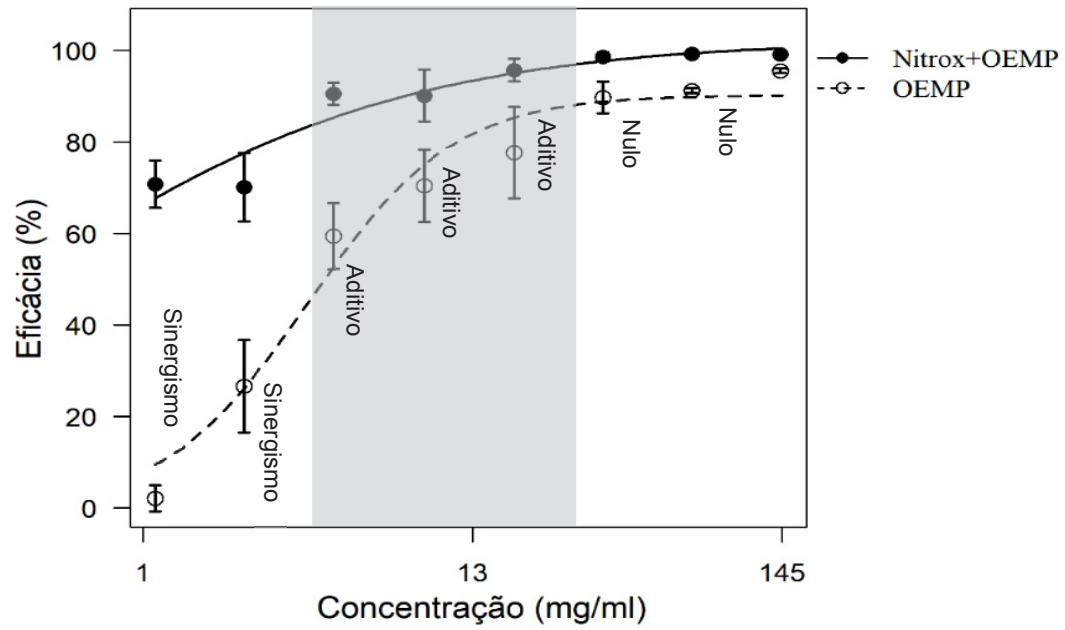
TABELA 10 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL COM O OLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* (OEMP).

Concentração(mg/ml) CL50 Nitrox + OEMP	OEMP Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
13,84 + 143,6	95,54 \pm 0,51 aA*	99,15 \pm 0,72 aA
13,84 + 71,8	91,22 \pm 0,51 abA	97,65 \pm 0,28 aA
13,84 + 35,9	89,74 \pm 3,44 abA	95,19 \pm 0,97 aA
13,84 + 17,9	77,73 \pm 10,03 bcA	95,79 \pm 2,48 aB
13,84 + 8,9	70,44 \pm 7,91 cdA	90,18 \pm 5,69 aB
13,84 + 4,4	59,51 \pm 7,25 dA	90,60 \pm 2,39 aB
13,84 + 2,2	26,5 \pm 10,09 eA	70,12 \pm 7,46 aB
13,84 + 1,1	1,34 \pm 3,72 fA	70,82 \pm 5,16 bB
Tween 80	5,93 \pm 9,40	0,00 \pm 10,36
H ₂ O	0,00 \pm 0	0,00
Nitroxinil	99,05 \pm 1,27	99,23 \pm 0,53
CL50	4,23 mg/ml	4,37 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: OEMP= Óleo essencial de *Mentha piperita*, Nitrox= Nitroxinil, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água). *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 15 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL (NITROX) E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* (OEMP) FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

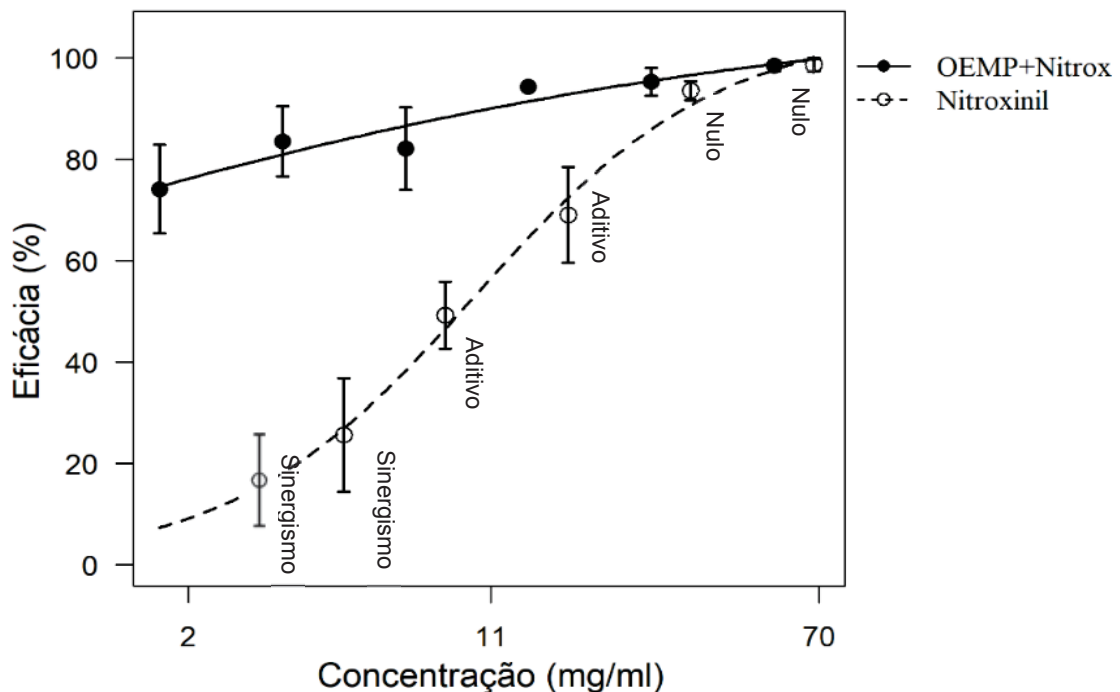
TABELA 11 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* E NITROXINIL.

Concentração (mg/ml) CL50 OEMP + Nitrox	Eficácia (%) Nitroxinil	Interação Eficácia (%)
4,23 + 54,4	97,37 \pm 1,28 aA*	98,43 \pm 1,08 aA
4,23 + 27,2	84,27 \pm 3,11 aA	95,29 \pm 2,73 abA
4,23 + 13,6	62,38 \pm 3,15 aA	94,35 \pm 0,51 abcB
4,23 + 6,8	49,01 \pm 11,74 bA	82,13 \pm 8,15 cdB
4,23 + 3,4	23,85 \pm 11,61 cA	83,54 \pm 6,91 bcdB
4,23 + 1,7	25,29 \pm 15,34 cA	74,13 \pm 8,72 dB
H ₂ O	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0
Tween 80	X	0,00 \pm 16,42
Nitroxinil	96,55 \pm 2,14	96,55 \pm 2,14
CL50	11,81	7,16 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: OEMP= Óleo essencial de *M. piperita*, Nitrox= Nitroxinil, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H2O= controle água, X= não se aplica). *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p<0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 16 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL CONTRA A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

5.6.2 Combinação do bioativo carvone com o Nitroxinil

Neste teste, a combinação da CL50 do Nitroxinil com diferentes concentrações do carvone resultou em efeito aditivo nas concentrações de 1,1 e 2,3 do carvone e efeito nulo nas demais (Tabela 12 e Figura 17). Quando realizado o teste invertido, foi observado efeito aditivo quando combinado com as primeiras concentrações do Nitroxinil (1,7 e 3,4 mg/ml), gerando eficácia média de 46,14 e 76,15% (Tabela 13 e Figura 18). Nas demais concentrações foi observado efeito nulo.

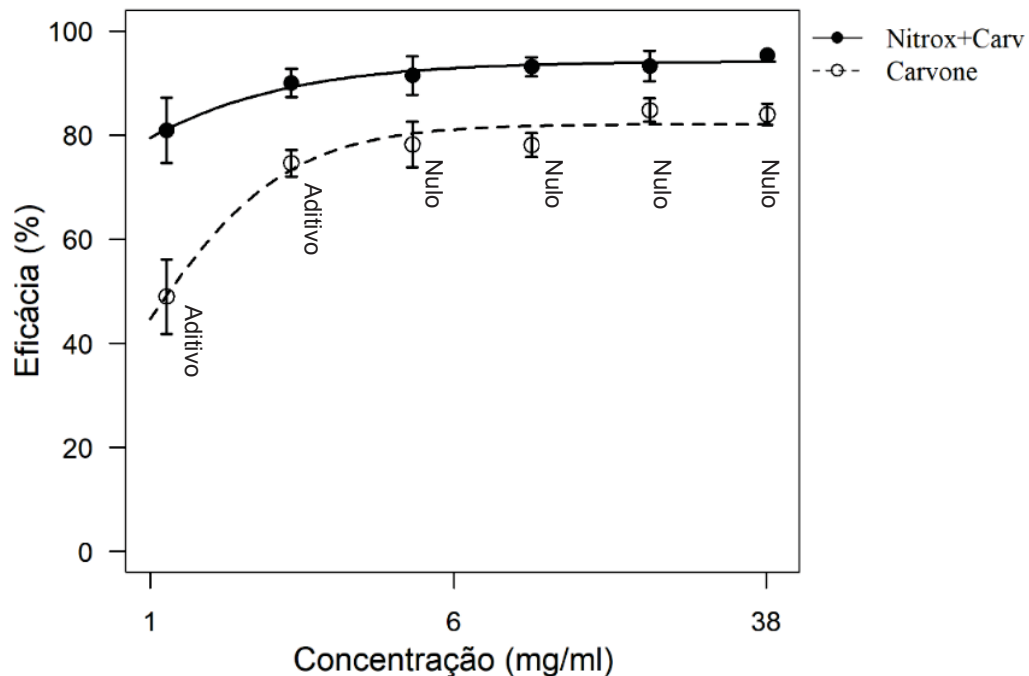
TABELA 12 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* COM A COMBINAÇÃO DA CL50 DO NITROXINIL E O CARVONE.

Concentração (mg/ml) CL50 Nitrox + Carv	Carvone Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
13,84 + 38,3	88,20 \pm 2,15 Aa*	95,37 \pm 0,28 aA
13,84 + 19,1	89,04 \pm 2,36 aA	93,26 \pm 2,93 aA
13,84 + 9,5	77,94 \pm 2,38 abA	93,12 \pm 1,85 aA
13,84 + 4,7	82,16 \pm 4,61 abA	91,44 \pm 3,73 aA
13,84 + 2,3	78,37 \pm 2,69 bA	90,04 \pm 2,72 aB
13,84 + 1,1	51,40 \pm 7,57 cA	80,92 \pm 6,26 bB
Tween 80	0,00 \pm 9,40	0,00 \pm 10,36
H ₂ O	0,00 \pm 0	0,00 \pm 0,00
Nitroxinil	98,87 \pm 1,27	99,23 \pm 0,53
CL ₅₀	1,96 mg/ml	2,47 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: Carv= Carvone, Nitrox= Nitroxinil, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H2O= controle água). *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 17 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL (NITROX) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CARVONE (CARV) CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

TABELA 13 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO CARVONE COM O NITROXINIL.

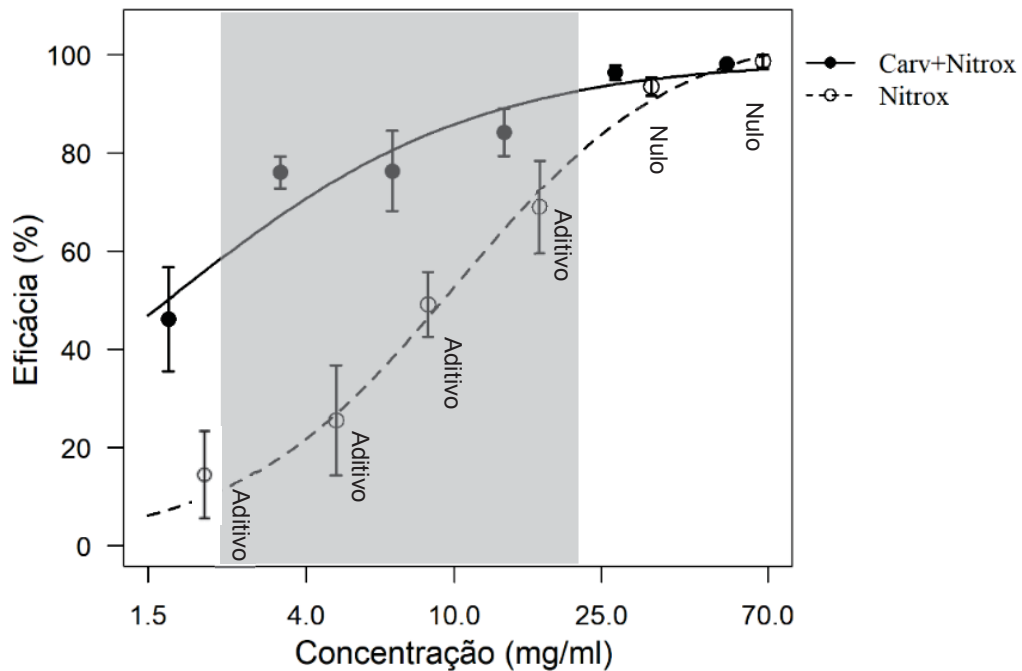
Concentração(mg/ml) CL50 Carv + Nitrox.	Nitroxinil Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
1,96 + 54,4	97,37 \pm 1,28 aA*	98,17 \pm 0,53 aA
1,96 + 27,2	84,27 \pm 3,11 aA	96,35 \pm 1,48 abA
1,96 + 13,6	62,38 \pm 3,15 aA	84,29 \pm 4,86 bcB
1,96 + 6,8	49,01 \pm 11,74 bA	76,43 \pm 8,20 cB
1,96 + 3,4	23,85 \pm 11,61 cA	76,15 \pm 3,25 cB
1,96 + 1,7	25,29 \pm 15,34 cA	46,14 \pm 10,63 dB
H ₂ O	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0
Tween 80	X	0,00 \pm 10,21
Nitroxinil	96,55 \pm 2,14	99,23 \pm 0,53
CL ₅₀ Nitrox	11,81	4,77 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: (Carv= Carvone, Nitrox= Nitroxinil, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H2O= controle água, X= Não se aplica). *Letras iguais significam que

não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p<0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 18 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO CARVONE (CARV) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL (NITROX) CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

5.6.3 Combinação do bioativo limoneno com Nitroxinil

Nesta combinação, a primeira tentativa (CL50 Nitroxinil + limoneno) apresentou efeito antagônico ao Nitroxinil, desde a eficácia esperada das concentrações isoladas do limoneno em soma com a eficácia esperada da CL50 do Nitroxinil não responderam a expectativa (Tabela 14 e Figura 19).

Quando testadas as combinações ao contrário (limoneno 3% + Nitroxinil), foi evidenciado o efeito nulo em todas as concentrações. Devido a isso, sugere-se que houve ação apenas do antiparasitário Nitroxinil (Tabela 15 e Figura 20).

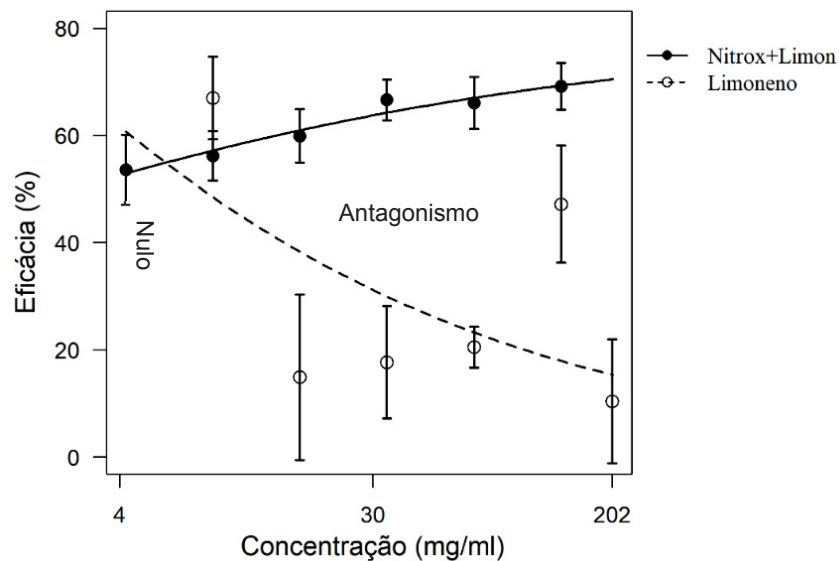
TABELA 14 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL COM O LIMONENO.

Concentração (mg/ml) CL50Nitrox + Limoneno	Limoneno Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
13,84 + 134,7	47,19 \pm 12,06 bA*	69,20 \pm 4,36 aB
13,84 + 67,3	20,50 \pm 10,91 bA	66,10 \pm 4,86 abB
13,84 + 33,6	17,69 \pm 3,79 bA	66,62 \pm 3,81 abB
13,84 + 16,8	14,60 \pm 10,44 bA	59,92 \pm 4,95 abcB
13,84 + 8,4	66,99 \pm 15,77 bA	56,18 \pm 4,59 bcA
13,84 + 4,2	13,14 \pm 7,72 aA	53,60 \pm 6,50 cB
Tween 80	9,97 \pm 9,40	0,00 \pm 9,74
H ₂ O	0,00 \pm 0	0,00 \pm 0,00
Nitroxinil	98,96 \pm 1,27	98,98 \pm 0,42
CL ₅₀ Nitroxinil	14,27 mg/ml	19,30 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H₂O= controle água). *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 19 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO NITROXINIL (NITROX) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO BIOATIVO LIMONENO (LIMON) FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

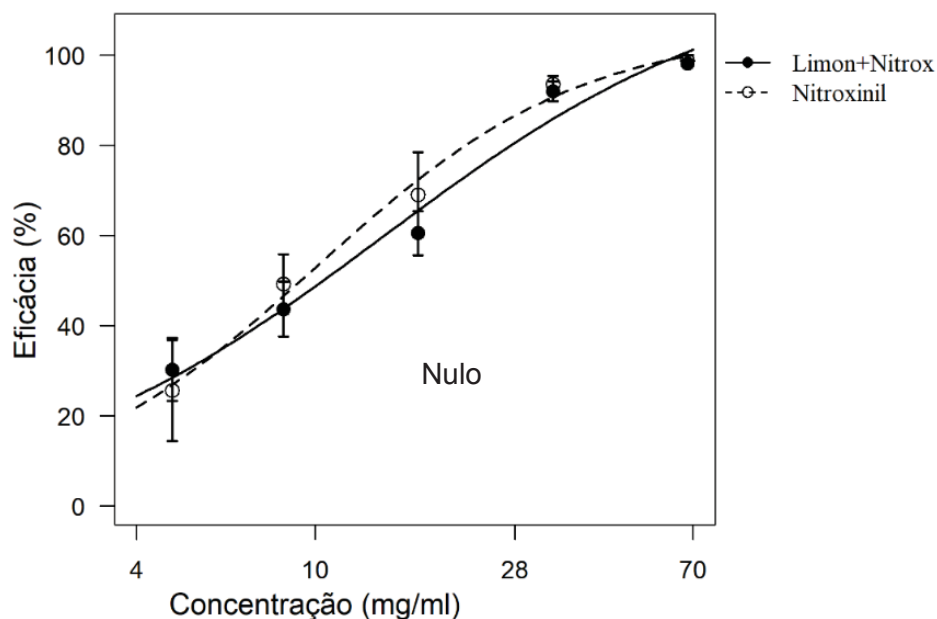
TABELA 15 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA DA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE O BIOATIVO LIMONENO 3% COM O NITROXINIL.

Concentração (mg/ml) Limon 3% + Nitrox	Nitroxinil Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
25,2 + 68	97,37 \pm 1,28 aA*	98,19 \pm 0,66 aA
25,2 + 34	84,27 \pm 3,11 aA	92,01 \pm 2,16 aA
25,2 + 17	62,38 \pm 3,15 aA	60,57 \pm 4,88 bA
25,2 + 8,5	49,01 \pm 11,74 bA	43,68 \pm 6,08 cA
25,2 + 4,8	23,85 \pm 11,61 cA	30,28 \pm 6,97 dA
H ₂ O	0,00 \pm 0	0,00 \pm 0
Tween 80	X	0,00 \pm 974
Nitroxinil	98,98 \pm 0,42	98,98 \pm 0,42
CL ₅₀	18,02 mg/ml	17,13 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: (Limon= Limoneno, Nitrox= Nitroxinil, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H2O= controle água). *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 20 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE O LIMONENO (LIMON) 3% COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL (NITROX) CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

5.6.4 Combinação entre os bioativos carvone e limoneno

Na combinação da CL50 do carvone com diferentes concentrações do limoneno (Tabela 16 e Figura 21), pode-se sugerir um efeito antagonista do limoneno ao carvone, principalmente nas maiores concentrações do limoneno (134,7 mg/ml), reduzindo a eficácia esperada de 50% da CL50 do carvone.

No teste posterior, onde foi acrescido limoneno a 1% sobre diferentes concentrações de carvone (Tabela 17 e Figura 22), também foi possível observar um efeito antagônico causado pelo limoneno sobre o carvone. Na figura 21, é possível observar que o carvone, combinado com o limoneno, perdeu eficácia quando comparado ao teste com a forma isolada (Figura 12). A CL50 do carvone quando isolado foi de 1,96 mg/ml, já na combinação foi de 5,38 mg/ml, pelo menos duas vezes maior do que quando testado isoladamente.

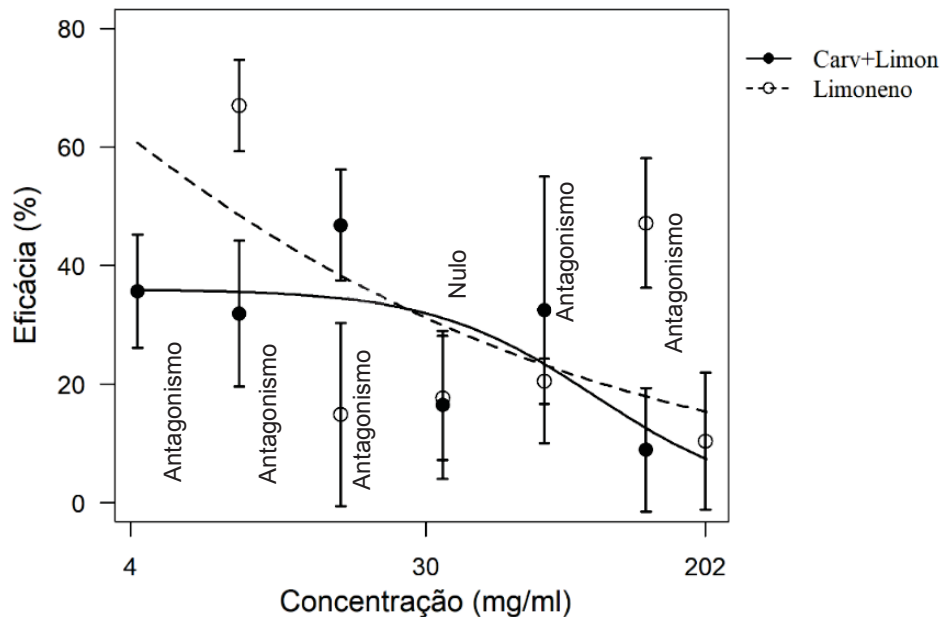
TABELA 16 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO (L3) DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO BIOATIVO CARVONE COM O BIOATIVO LIMONENO

Concentração(mg/ml) CL50 Carvone + Limoneno	Limoneno Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
1,96 + 134,7	20,50 \pm 10,91 bA*	7,52 \pm 12,47 bA
1,96 + 67,3	17,69 \pm 3,79 bA	21,23 \pm 44,40 abA
1,96 + 33,6	14,60 \pm 10,44 bA	13,32 \pm 18,84 abA
1,96 + 16,8	66,99 \pm 15,77 bA	47,02 \pm 9,36 aB
1,96 + 8,4	13,14 \pm 7,72 aA	32,13 \pm 12,33 abA
1,96 + 4,2	20,50 \pm 10,91 bA	35,89 \pm 9,55 abA
Tween 80	9,97 \pm 9,40	0,00 \pm 16,47
H ₂ O	0,00 \pm 0	0,00 \pm 0,00
Nitroxinil	98,96 \pm 1,27	98,98 \pm 2,14
CL ₅₀	14,27 mg/ml	23,88 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: (Limon= Limoneno, Carv= Carvone, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H2O= controle água). *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 21 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DO CARVONE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO LIMONENO CONTRA LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.*



FONTE: O Autor (2019).

TABELA 17 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO (L3) DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE O BIOATIVO LIMONENO A 1% COM O BIOATIVO CARVONE

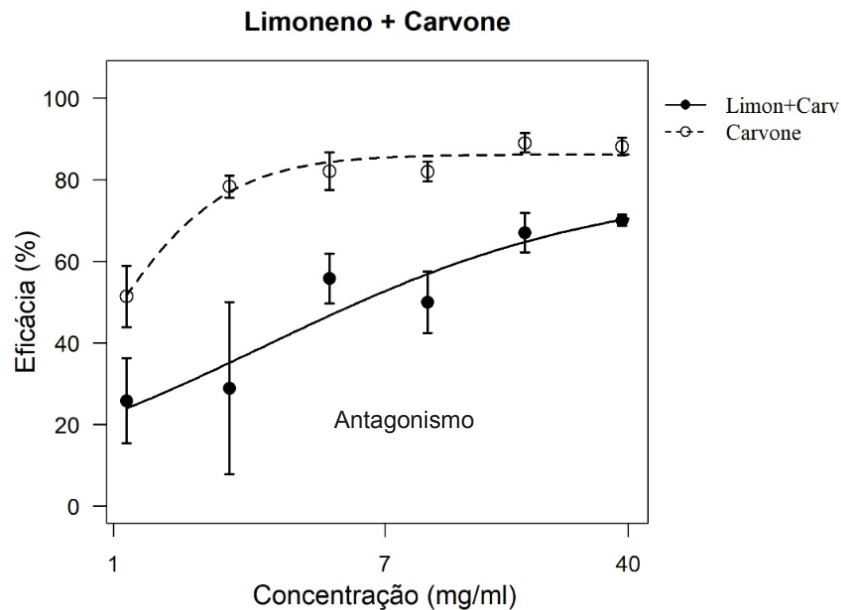
Concentração (mg/ml) Limoneno 1% + Carvone	Carvone Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
8,4 + 38,3	88,20 \pm 2,15 aA*	70,06 \pm 1,39 aA
8,4 + 19,1	89,04 \pm 2,36 aA	67,08 \pm 4,84 aA
8,4 + 9,5	77,94 \pm 2,38 abA	50 \pm 7,53 abA
8,4 + 4,7	82,16 \pm 4,61 abA	55,79 \pm 6,11 aA
8,4 + 2,3	78,37 \pm 2,69 ba	27,27 \pm 24,15 bcB
8,4 + 1,1	51,40 \pm 7,57 cA	25,86 \pm 10,40 cB
Tween 80	0,00 \pm 9,40	-0,50 \pm 8,47
H ₂ O	0,00 \pm 0	0,00 \pm 0,00
Nitroxinil	98,87 \pm 1,27	98,98 \pm 0,60
CL ₅₀	1,96 mg/ml	5,38 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: (Limon= Limoneno, Carv= Carvone, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H2O= controle água). *Letras iguais significam que não houve

diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 22 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE O BIOATIVO LIMONENO A 1% COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO BIOATIVO CARVONE FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE *Haemonchus spp.* E *Trichostrongylus spp.* ($R^2 = 0,71$).



FONTE: O Autor (2019).

5.6.5 Combinação entre OE *Mentha villosa* sob nanoemulsão com o Nitroxinil

No teste de combinação entre a CL50 do OEMV, coletado em 2017, em nanoemulsão, acrescido em diferentes concentrações do Nitroxinil, foi demonstrado efeito aditivo máximo ($p < 0,05$) na menor concentração de Nitroxinil (4,8 mg/ml), gerando uma eficácia surpreendente de 76,93% na combinação, enquanto de forma isolada era de 25,64% (Tabela 18 e Figura 23).

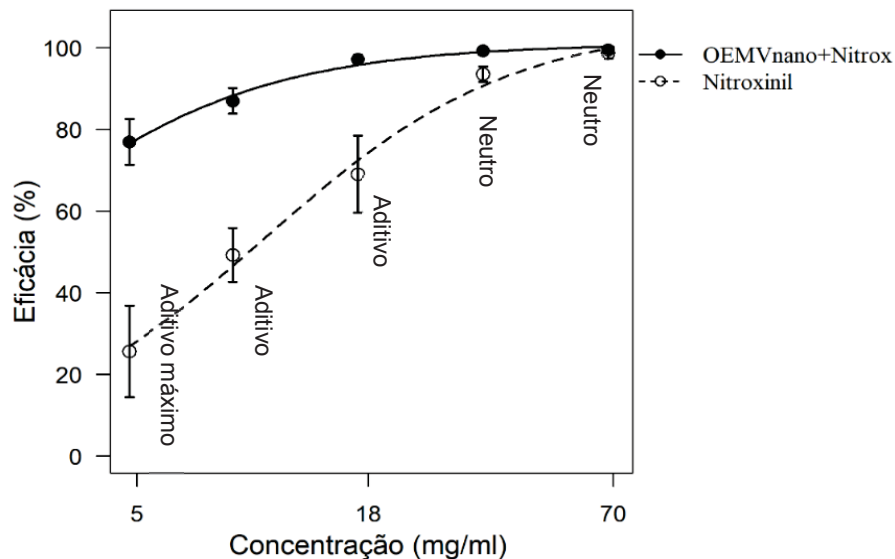
TABELA 18 - PORCENTAGEM MÉDIA (\pm DESVIO PADRÃO) DA EFICÁCIA NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *Haemonchus* spp. E *Trichostrongylus* spp. SOB EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DE *Mentha villosa* EM NANOEMULSÃO COM O NITROXINIL.

Concentração (mg/ml) OEMVnano + Nitrox	Nitroxinil Eficácia (%)	Interação Eficácia (%)
0,10 + 68	98,71 \pm 1,36 aA	99,48 \pm 0,72 aA
0,10 + 34	93,55 \pm 1,90 aA	99,22 \pm 0,51 aA
0,10 + 17	69,07 \pm 9,45 bA	97,16 \pm 1,07 aB
0,10 + 8,5	49,22 \pm 6,59 cA	86,98 \pm 3,16 bB
0,10 + 4,8	25,64 \pm 11,20 dA	76,93 \pm 5,60 cB
H ₂ O	0,00 \pm 0	0,00 \pm 0
Tween 80	X	-0,50 \pm 8,47
Nitroxinil	98,98 \pm 0,42	98,98 \pm 0,60
CL ₅₀	18,02 mg/ml	9,11 mg/ml

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: OEMVnano= óleo essencial de *Mentha villosa* em nanoemulsão, Nitrox= Nitroxinil, CL50= Dose letal para 50% das larvas, C+= controle positivo, Ctw= controle Tween, H2O= controle água, X= Não se aplica. *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias do teste isolado. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste com o outro: produto isolado e produtos combinados.

FIGURA 23 - CURVA DE EFICÁCIA NO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR COM A COMBINAÇÃO ENTRE A CL50 DE *Mentha villosa* EM NANOEMULSÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NITROXINIL FRENTE A LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Haemonchus* spp. E *Trichostrongylus* spp.



FONTE: O Autor (2019).

5.7 CL50 DOS PRODUTOS ISOLADOS E DOS PRODUTOS EM COMBINAÇÕES FRENTE AO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR

Na tabela 19, se observa as CL50 dos produtos testados isolados e em combinação. Os melhores resultados foram com as combinações entre a CL50 do carvone com Nitroxinil, com a redução da CL50 do Nitroxinil de 11,81 para 4,77 mg/ml e a combinação da CL50 do OEMP com o Nitroxinil, reduzindo a CL50 do Nitroxinil de 11,81 para 7,16 mg/ml. A combinação da CL50 do OEMV em nanoemulsão com o Nitroxinil também reduziu a CL50 do Nitroxinil de 18,02 para 9,11 mg/ml.

TABELA 19 - RELAÇÃO DAS CL50 DE TODOS OS PRODUTOS TESTADOS DE FORMA INDIVIDUAL E EM COMBINAÇÕES E GRUPAMENTO DAS MÉDIAS DAS EFICÁCIAS DOS TESTES ISOLADOS, CÔMPARADOS COM OS TESTES COMBINADOS CONTRA LARVAS DOS NEMATODEOS *Haemonchus* spp. E *Trichostrongylus* spp. FRENTE AO TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR.

Produtos Isolados		Produtos Combinados	
Produtos mg/ml	CL50 mg/ml	Combinações	CL50 mg/ml
OEMVnano ^{bc*}	0,1010	x	x
OEMV 2017 ^b	3,59	x	x
OEMV 2018 ^{bc}	3,04	x	x
OEMP ^{abB}	4,23	CL50 Nitrox + OEMP ^{aA}	4,37
Carv ^{aA}	1,96	CL50 Nitrox + Carv ^{aA}	2,47
Carv ^{aA}	1,96	Limon 1% + Carv ^{dB}	5,38
Nitrox ^{abB}	11,81	CL50 OEMP + Nitrox ^{aA}	7,16
Nitrox ^{abB}	11,81	CL50 Carv + Nitrox ^{abA}	4,77
Limon ^{cA}	14,27	CL50 Nitrox + Limon ^{cdA}	19,30
Limon ^{cA}	14,27	CL50 Carv + Limon ^{eB}	23,88
Nitrox ^{abA}	18,02	Limon 3% + Nitrox ^{bcA}	17,13
Nitrox ^{abB}	18,02	CL50 OEMVnano + Nitrox ^{aA}	9,11

FONTE: O Autor (2019)

LEGENDA: OEMV= Óleo essencial de *Mentha villosa*, OEMP= óleo essencial de *Mentha piperita*, Carv= carvone, Limon= limoneno, Nitrox= Nitroxinil, OEMVnano= óleo essencial de *Mentha villosa* em nanoemulsão, CL50= concentração letal para 50% das larvas, X= não houve combinação com o produto. *Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as eficácias, letras diferentes significam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as eficácias. Letras minúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias dos testes isolados. Letras maiúsculas significam que o teste de Tukey foi aplicado comparando as eficácias de um teste isolado com o teste em combinação.

6 DISCUSSÃO

6.1 TIML COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *M. villosa*, *M. piperita* E OS BIOATIVOS CARVONE E LIMONENO

Na cromatografia gasosa com espectrometria de massas, a *M. piperita* mostrou o menthol como componente majoritário no presente trabalho, seguido da menthona com 41,86 e 27,68% respectivamente. Esse resultado se assemelha com o resultado de Katiki *et al.* (2011) que constataram o menthol como sendo o componente majoritário (42,5%) da *M. piperita*. Em relação a *M. villosa*, na GC/MS, a composição do OE dessa planta, em ambos os anos, apontou para o bioativo carvone como composto majoritário, podendo este efeito anti-helmíntico promissor estar relacionado com o composto descrito. Os resultados deste trabalho, mostrados pela GC/MS, estão de acordo com os encontrados por Radüns *et al.* (2004), cujo principal componente do OEMV foi o carvone. O carvone confere um odor adocicado à menta e pode ser produzido sinteticamente para uso em fragrâncias e cosméticos, além de ser agente antimicrobiano e de grande interesse medicinal, fatores que justificam o interesse de pesquisar esse monoterpeno (CARVALHO, FONSECA, 2006).

Utilizando uma metodologia semelhante, Martins *et al.* (2007) distinguiram 28 componentes no OEMV. O óxido de piperitenona foi o componente principal, com 35,4%, diferente deste trabalho, no qual a *M. villosa*, nas duas análises, apresentou o carvone como composto majoritário, com 83,87% na *M. villosa* coletada em 2018 e 68% na *M. villosa* coletada em 2017. O cromatograma não apresentou nenhuma concentração identificada do óxido de piperitenona (Tabela 3). Como esses compostos provém do metabolismo secundário das plantas, alguns fatores podem ter interferido na composição do OE, principalmente fatores relacionados com o tipo de solo e a disponibilidade de nutrientes, bem como o clima do local (CARVALHO *et al.*, 2012).

O objetivo das metodologias *in vitro* é de analisar o efeito de uma substância tanto no embrionamento e eclosão dos ovos, como no desenvolvimento e motilidade larvar (MOLENTO; PRICHARD, 2001). Neste trabalho, a metodologia do TIML propiciou a observação de excelentes resultados encontrados utilizando os OE das duas plantas e também pelo bioativo carvone contra L3 de NGI de ruminantes. A *M. villosa* coletada em 2017 e em 2018, demonstrou eficácia contra L3 de NGI de

ruminantes de até 86,33% (Tabela 5 e Figura 10). Efeitos tóxicos para NGI de ruminantes também foram encontrados por Nascimento (2009), quando utilizou o hidrolato de *M. villosa* no TEO, mostrando resultados com eficácia acima de 98% nas concentrações de 80 e 100% do produto. A ação anti-helmíntica de *M. villosa* foi também avaliada por Macedo et al. (2012), demonstrando que a *M. villosa* na concentração de 2,5 mg/ml inibiu em 97,6% a eclosão de ovos de *H. contortus*. De acordo com os autores, e como constatado neste atual trabalho, a planta pode possuir propriedades anti-helmínticas.

No caso da *M. piperita*, o presente trabalho demonstrou que o OE desta planta pode possuir eficácia frente a L3 de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. (Tabela 6 e Figura 11). Na sua maior concentração (143,6 mg/ml), o OEMP demonstrou eficácia de 95,54%, com uma CL50 de 4,23 mg/ml no TIML. Outras pesquisas também demonstraram ótimos resultados com essa planta, como por exemplo a de Carvalho et al. (2012), que estudaram seu efeito sobre populações isoladas do *H. contortus* e obtiveram CL50 de 0,037 mg/ml no TEO. Katiki et al. (2011) também identificaram potencial anti-helmíntico da *M. piperita* no TDL, obtendo uma CL50 de 0,26 mg/ml. Entretanto, é importante ressaltar que não é possível comparar diretamente os resultados da literatura com o obtido no presente estudo, sabendo que são testes *in vitro* diferentes. O que se pode observar é a eficácia relatada em ambos os estudos, sugerindo que a *M. piperita* possua efetivamente efeito anti-helmíntico. Além da eficácia observada ter sido semelhante, ambos estudos apresentaram o composto majoritário menthol para a *M. piperita*.

Carvone e limoneno também foram avaliados frente a larvas de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. no TIML. O carvone apresentou na sua maior concentração (38,3 mg/ml), eficácia de 88,2% com uma CL50 de 1,96 mg/ml (Tabela 7 e Figura 12). Comprovada sua eficácia neste teste, foi possível relacionar esse efeito anti-helmíntico promissor com o efeito antes encontrado no OEMV, que possuiu como composto majoritário o carvone, ou seja, o efeito anti-helmíntico do OEMV pode ser causado pela alta presença do bioativo carvone.

Ao observar a relação de compostos identificados na *M. villosa* coletada em diferentes anos (Tabela 3), nota-se que a *M. villosa* coletada em 2018 apresentou uma maior quantidade de carvone na sua composição do que a coletada em 2017, isso pode ter refletido na eficácia obtida por essa planta no TIML, sendo que a *M. villosa* coletada em 2018 apresentou maior eficácia (86,33%) (Tabela 5), comparada com a

M. villosa coletada em 2017 (70,59%) (Tabela 4) quando testadas em concentrações muito semelhantes. Mesmo não tendo sido diferidas estatisticamente ($p>0,05$), uma maior concentração de carvone no OEMV coletado em 2018, pode ter lhe conferido pelo menos 15,74% a mais de eficácia frente aos testes realizados.

Como a concentração do carvone no OEMV, coletado em 2018, foi de 84% e no OEMV coletado em 2017, foi de 69% (Tabela 3), existiu a expectativa de que a eficácia do carvone isoladamente fosse de aproximadamente 70 a 80% no TIML frente a L3 de NGL de ruminantes. No presente estudo, observamos a CL50 do OEMV de 2018 de 3,04 mg/ml e do OEMV 2017 de 3,59 mg/ml e do carvone isolado de 1,96 mg/ml, confirmando o efeito do carvone isolado na inibição da migração de L3. Deste modo, mesmo que os outros compostos tenham ação sinérgica sobre o efeito do OE, nesta pesquisa ficou comprovada a eficácia anti-helmíntica do carvone de forma isolada.

O bioativo limoneno não apresentou eficácia relevante frente as larvas de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. nos testes realizados neste trabalho (Tabela 8 e Figura 13). Ao analisar a composição dos OE das duas plantas, nota-se a presença do bioativo limoneno em menor quantidade, não sendo o composto majoritário de nenhuma das plantas. Portanto, mediante a esse resultado, pode-se sugerir que o efeito anti-helmíntico tanto da *M. villosa* quanto da *M. piperita* não está atrelada ao limoneno como bioativo responsável, entretanto, a hipótese de ele agir em sinergia com outros compostos dos OE não pode ser descartada.

Katiki et al (2017), em sua pesquisa, utilizaram limoneno e carvone no TEO, resultando no limoneno como o menos eficaz (CL50 = 207,56 mg/ml) e o carvone com alta eficácia (CL50 = 0,085 mg/ml). O resultado obtido com o limoneno por Katiki et al. (2017), mostrou uma CL50 alta, comparada aos demais bioativos, o que se assemelha com os resultados encontrados neste trabalho, que mesmo tendo sido feito o TIML (Tabela 8). Assim, sugerimos que este isolado não possui grande eficácia contra os parasitos testados, não demonstrando um padrão de eficácia crescente. Katiki et al. (2017) ressaltam em seu trabalho que o limoneno teve a CL50 40 vezes mais alta que o cineol e que a menor atividade do limoneno *in vitro* contrasta com o trabalho de Squires et al. (2010), os quais observaram atividade anti-helmíntica do limoneno no TEO, com eficácia de até 97,5%, contra *H. contortus* em ovelhas infectadas naturalmente. No entanto, esses autores testaram uma emulsão com óleo de laranja

(40% terpenos laranja, 20% óleo de laranja, Tween 80, peróxido de hidrogênio), indicando que o limoneno pode ter tido um efeito sinérgico com os terpenos da laranja.

Uma revisão bibliográfica sobre o efeito inseticida de OE e seus bioativos (Dambolena et al., 2016) citou vários autores que avaliaram diversos bioativos para atividade ovicida em piolhos (*Pediculus humanus*), e relataram que linalol, timol, carvone, anetol, cinamaldeído, entre outros, tinham alta atividade ovicida. Outro estudo relatou que o OE de *Eucalyptus staigeriana* composto principalmente por 73% limoneno, 9,5% cineol e 4,5% cimene, teve uma eficácia de 99,96% no TEO de NGI de ruminantes (Ribeiro et al., 2013).

Barbieri et al. (2014) também realizaram um estudo utilizando diferentes compostos bioativos no teste de eclodibilidade de ovos de NGI de pequenos ruminantes, entre eles o carvone e o limoneno. Neste trabalho, o limoneno representou o pior resultado com alta CL50 (207,56 mg/ml). Já o bioativo carvone apresentou excelente resultado (CL50 de 0,085 mg/ml), demonstrando boa eficácia com doses relativamente baixas. Esses resultados se assemelham com os do atual trabalho, que mesmo tendo sido realizado testes diferentes, comprovam eficácia anti-helmíntica frente aos parasitos testados.

6.2 TIML COM O OEMV DE 2017 SOB NANOEMULSÃO

As nanoemulsões são um importante sistema carreador de componentes bioativos hidrofóbicos, além de permitir o aumento da estabilidade química e aumento da bioacessibilidade destes compostos. Elas possuem como característica principal o tamanho da partícula, que varia entre 5 e 200 nm (ÇINAR, 2017). O método de obtenção da nanoemulsão foi satisfatório, uma vez que apresentou um IP menor que 0,3 - o que significa que o sistema é monodisperso (ÇINAR, 2017) e tamanho de partícula abaixo de 200 nm. Neste trabalho, obtivemos o potencial zeta de 36,41 mV, sendo superior que 25 mV, o que é o indicado. Segundo a literatura, os sistemas são considerados estáveis quando possuem potencial zeta em modulo (valor absoluto) maior que 25 mV. Quando o potencial zeta é relativamente baixo (menor que 25 Mv), as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, as partículas se aproximam, floculando, podendo levar à separação de fases (Lieberman et al., 1989).

Muitos estudos foram realizados para avaliar a eficácia *in vitro* de produtos com atividade anti-helmíntica e de acordo com as recomendações da Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WAAVP), os potenciais anti-helmínticos são considerados altamente eficazes se a sua eficácia for superior a 98%, eficaz quando a eficácia estiver entre 90-98%, moderadamente eficaz na faixa de 80-89% e ineficaz quando a eficácia foi inferior a 80% (WOOD et al., 1995). Até o momento, pesquisas que avaliam o efeito anti-helmíntico de *M. villosa* sob nanoemulsão contra NGI são desconhecidos, porém este estudo demonstrou que o OEMV em nanoemulsão, inibiu a migração de L3 em 83,12% (Tabela 9 e Figura 14), se mostrando altamente eficaz quando comparado com os OE da mesma planta testados anteriormente. No presente estudo, o OE sob nanoemulsão apresentou uma eficácia de 83,12%, enquanto os OE puros apresentaram eficácia de 19,20 e 13,14% para o OEMV de 2017 e 2018, respectivamente, utilizando a concentração de 1,1 mg/ml para o OE de *M. villosa* de 2017 e de 2018. A diferença de eficácia ficou na ordem de 3 vezes, comparando os compostos. Já a CL50 da *M. villosa* sob nanoemulsão foi de 0,1010 mg/ml, enquanto os OE puros apresentaram CL50 igual a 3,59 e 3,04 mg/ml para os anos de 2017 e de 2018, respectivamente. Desta forma, observou-se então uma diferença de eficácia da ordem de aproximadamente 35.5 (2017) e 30 (2018) vezes ($p < 0,05$) quando o OEMV foi testado em nanoemulsão.

Essa ação pode ser explicada justamente porque as nanoestruturas possuem a característica de liberação lenta e gradual (Zanoto-Filho et al., 2013). A substância teste na sua forma livre deve atingir rapidamente nas concentrações máximas, enquanto as nanoestruturas demonstram uma liberação gradual, fazendo com que seus níveis séricos permaneçam estáveis por mais tempo (Zanoto-Filho et al., 2013). Monteiro et al. (2013), testaram a atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* e revelaram que o sistema nanoestruturado apresentou atividade 98 vezes superior ao fármaco livre (hidroximetilnitrofuril). Em fases amastigotas, o sistema nanoestruturado teve efeito 33 vezes maior do que o fármaco livre. Esses resultados se assemelham com os obtidos no presente estudo, que demonstrou um efeito significativamente maior do OE quando testado na forma nanoestruturada, comparado ao OE testado puro.

Grando et al (2015), avaliaram o OE de *Melaleuca artemifolia* de forma pura e posteriormente nanoestruturada. Quando testado o OE puro, obtiveram excelentes resultados no TEO, inibindo 100% a eclodibilidade de ovos na concentração de 3,5

mg/ml. Quando na forma nanoestruturada, o resultado se mostrou menos eficaz, inibindo 82,63%. No entanto, os autores justificam essa ação tendo em conta a duração do TEO, já que as nanopartículas têm uma característica de liberação lenta e gradual das drogas, aumento da biodisponibilidade e poucos efeitos tóxicos.

Katiki e colaboradores (2019), também testaram fitoquímicos de forma nanoestruturada, sendo eles o carvone e o anetol em testes *in vivo* com ovelhas artificialmente infectadas com *H. contortus*. Os resultados foram promissores quanto à eficácia anti-helmíntica, havendo uma redução significativa na contagem de ovos após 45 dias de administração (ração, via oral) de anetol e carvone a 50 mg/kg/dia. Porém, efeitos colaterais foram identificados após a administração nessa dosagem, ocorrendo uma baixa no consumo de ração e, conseqüentemente, redução do ganho de peso. Outra dosagem foi realizada com 20 mg/kg/dia, porém não foi eficiente para reduzir a contagem de ovos nas fezes. Os autores frisaram a necessidade de mais estudos com diferentes doses e diferentes maneiras de administração.

No nosso trabalho, realizamos apenas o teste *in vitro* com o OE de *M. villosa* rica em carvone de forma nanoestruturada e obtivemos significativa redução da CL50, quando comparada ao OE puro, bem como resultados promissores sobre L3 de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. Comparando com o trabalho de Katiki et al. (2019), os autores testaram o composto bioativo carvone nanoestruturado *in vivo*, obtendo também significativa redução da contagem de ovos de *H. contortus* ficando, mais uma vez, comprovada a eficácia do carvone livre e agora, também, nanoestruturado aplicado no teste *in vivo*.

6.3 TIML COM OS PRODUTOS EM COMBINAÇÕES

Ao analisar a curva de eficácia das combinações entre Nitroxinil e o OEMP, observou-se que a inclusão da CL50 do antiparasitário Nitroxinil nas diferentes doses do OEMP afetou a eficácia deste produto sobre a migração das larvas de forma positiva. Observando a tabela 10 e a figura 15, nota-se que a CL50 do antiparasitário Nitroxinil em combinação com a menor concentração do OEMP (1,1 mg/ml) obteve eficácia significativamente maior (70,82 contra 1,34%) ($p < 0,05$) do que quando usado sozinho, observando efeito sinérgico. Sinergia refere-se a fenômenos em que dois ou mais agentes juntos, produzem um efeito maior do que seria previsto a partir de suas

contribuições individuais (Williamson, 2001). Nas concentrações de 4,4; 8,9 e 17,9 mg/ml foi possível observar efeito aditivo, após a combinação com a CL50 do antiparasitário. Nas concentrações mais altas, o efeito foi nulo, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) uma eficácia da outra, baseada na concentração do produto.

Quando testado de forma contrária, também foi observada sinergia entre a CL50 do OEMP com as duas concentrações mais baixas do Nitroxinil (1,1 e 3,4 mg/ml) (Tabela 11 e Figura 16). Nas demais concentrações, podemos observar efeito aditivo e nulo. Além disso, a inclusão da CL50 do OEMP fez com que a CL50 do antiparasitário Nitroxinil reduzisse de 11,81 para 7,16 mg/ml (Tabela 11). Esses resultados demonstram que a combinação do OEMP acrescido do Nitroxinil apresentou claro efeito sinérgico em determinadas combinações. Este fato deverá ser melhor explorado em experimentos futuros, na tentativa de elucidar estes promissores achados para a farmacologia veterinária. Importante ressaltar que quanto maior a eficácia obtida com menores concentrações de produtos, torna esse resultado ainda melhor, evitando efeitos tóxicos para o animal e também para o meio ambiente, além de retardar a seleção de parasitos resistentes (ATHANASIADOU et al., 2008).

O teste de combinação entre o antiparasitário Nitroxinil e o bioativo carvone também demonstrou resultado positivo quando acrescido a CL50 do bioativo carvone em diferentes concentrações do Nitroxinil, reduzindo a CL50 do antiparasitário que, de forma isolada, foi de 11,81 mg/ml para 4,77 mg/ml na combinação (Tabela 13). O que significa que com a inclusão do carvone nas concentrações do Nitroxinil é possível se obter resultados semelhantes ao Nitroxinil isolado, utilizando uma menor concentração do fármaco. Stringaro et al (2014), realizaram uma pesquisa semelhante, porém voltada à microbiologia, onde testaram o efeito da combinação do OE de *Mentha suaveolens* com os antifúngicos Fluconazol e Micafulgina contra o fungo *Candida albicans*. Resultados sinérgicos foram encontrados entre a combinação do OE de *M. suaveolens* e Fluconazol e resultados aditivos entre o OE de *M. suaveolens* e Micafulgina. Os autores afirmaram que esse tratamento combinado pode reduzir as doses das drogas convencionais utilizadas e minimizar os efeitos colaterais.

Efeitos aditivos foram observados ao contemplar as Tabelas 12 e 13. Quando acrescido a CL50 do Nitroxinil nas concentrações de 1,1 e 2,3 mg/ml do carvone, foi possível verificar esse efeito somatório nas eficácias das combinações. Nas demais

concentrações o efeito foi nulo (Figura 17). Do contrário, quando foi acrescentado a CL50 do carvone sobre diferentes concentrações do Nitroxinil (Figura 18), também foi observado efeito de adição e nas maiores concentrações (13,6; 27,2 e 54,4 mg/ml), o efeito foi nulo. Hendry e colaboradores (2009), realizaram uma pesquisa testando o OE de *Eucalyptus* e o bioativo 1,8-cineol em combinação com Clorodextina contra microrganismos cultivados em culturas planctônicas e de biofilme e encontraram resultados sinérgicos promissores entre os produtos testados. Atividade sinérgica também foi demonstrada entre a Clorodextina e ambos os produtos testados contra suspensões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, culturas de biofilme e *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando mais uma vez que produtos naturais podem apresentar bons resultados quando combinados a sintéticos. Estes produtos podem ser uma alternativa na descoberta de um controle alternativo para bactérias, fungos e, como visto neste atual trabalho, contra helmintos.

Trabalhos de pesquisa demonstraram que o sinergismo de produtos naturais e medicamentos sintéticos (principalmente antibióticos) são um impulso na área de pesquisa de fitoterápica e para o desenvolvimento de novos prospectos para fitofármacos (HAMER et al., 2004; KARPANEN et al., 2008). Novas combinações de medicamentos, incluindo produtos naturais, recentemente se tornaram uma prioridade de pesquisa. Implicações financeiras como reformulação de medicamentos ou combinações podem revelar-se uma opção melhor do que uma nova droga química que requer testes extensivos e ensaios pré-clínicos. O sinergismo de compostos derivados de plantas e antibióticos foi encontrado e pode ser muito eficaz contra doenças infecciosas (HENDRY et al., 2009) e também contra *C. albicans* (WAGNER, ULRICH-MERENICH, 2009), e como visto nesse trabalho, a combinação de produtos naturais com antiparasitários geraram efeitos sinérgicos contra parasitos de ruminantes, sendo eles *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp.

A combinação do bioativo limoneno em várias concentrações e acrescido a CL50 do antiparasitário Nitroxinil, demonstrou resultados sugerindo que nesta combinação houve efeito antagônico para o Nitroxinil (Tabela 14 e Figura 19). O efeito esperado da ação pela CL50 do Nitroxinil em combinação com o efeito esperado pelas concentrações individuais do limoneno não aconteceu. Ao observar a tabela 14, percebemos que quanto maior a concentração do limoneno, menor foi o efeito do Nitroxinil, efeito esse que deveria ter sido somado com o limoneno. Mediante a isso, podemos afirmar que o bioativo limoneno interferiu negativamente no efeito do

antiparasitário Nitroxinil. Santos et al. (2017) realizaram uma pesquisa semelhante, combinando o extrato hidroalcoólico de *Opuntia ficus-indica*, rico em taninos, com o antiparasitário Ivermectina e obtiveram efeitos antagônicos. Quando testada de forma isolada, o extrato de *O. ficus-indica* na sua maior concentração apresentou eficácia média de 77,26% e, posteriormente, quando testada a mesma concentração acrescida da CL50 da ivermectina, a eficácia baixou para 62,49%, demonstrando que a associação entre esses dois compostos também não surtiu efeitos positivos.

O TIML também foi realizado utilizando limoneno 3% (25,2 mg/ml) em adição a concentrações do antiparasitário Nitroxinil, e o efeito foi nulo ($p > 0,05$), tendo somente o antiparasitário agindo contra as L3 (Tabela 15 e Figura 20). Este fato reforça a sugestão de que o bioativo limoneno não apresenta bons resultados quando testado sozinho ou em combinação. O antagonismo ocorre quando a mistura de compostos não tem um efeito melhor do que quando usados individualmente, pelo contrário, quando um composto prejudica o efeito de outro. O efeito nulo ou neutro é quando um composto não interfere negativamente ou positivamente sobre o efeito de outro (Hyldgaard et al., 2012). O interesse em pesquisas com combinações de medicamentos que apresentem potenciais anti-helmínticos, surge do problema crescente de resistência parasitária. Devido a isso, a associação de princípios ativos possibilitaria maior eficácia no controle, maior controle de populações de parasitos resistentes, e o retardo no aparecimento da resistência (GEARY et al., 2012). Entretanto, interações desfavoráveis entre os compostos ativos são possíveis e precisam ser consideradas (CANTON et al., 2017).

A combinação entre os dois bioativos (carvone + limoneno) também não demonstrou efeitos positivos quando comparado ao teste com o carvone isolado. Na primeira tentativa, quando combinado a CL50 do carvone com concentrações do limoneno obteve-se efeito antagônico do limoneno sobre o carvone, onde nem mesmo a eficácia esperada de 50% pela CL50 do carvone foi observada. Observou-se também que quanto maior a concentração do limoneno mais antagonismo foi gerado sobre o carvone, diminuindo assim o efeito esperado no teste (Figura 21). Resultados de antagonismo entre combinações de bioativos já foram encontrados anteriormente por Ntalli e colaboradores (2010). Estes autores testaram combinações entre carvone e timol, e carvone e eugenol frente a larvas do nematoide vegetal *Meloidogyne incognita* no teste de imersão, essas interações antagônicas não foram explicadas quanto ao seu mecanismo de ação.

Quando testadas, as concentrações do carvone com a adição do limoneno a 1% (8,4 mg/ml), observou-se uma perda de 18,14% de eficácia do carvone (tabela 17). Esse resultado expressa um efeito antagônico ocasionado pela adição do limoneno ao carvone. Quando testado de forma isolada, o carvone apresentou eficácia de 88,20% na sua maior concentração (38,3 mg/ml), enquanto na combinação sua maior concentração acrescida de limoneno apresentou eficácia de 70,06%. Ao observar a CL50 do carvone quando isolado (1,96 mg/ml), nota-se que quando combinado ao limoneno, a CL50 subiu para 5,38 mg/ml, significando que na presença do limoneno o carvone possui atividade larvicida reduzida (Figura 22). Katiki et al. (2017), também realizaram testes em combinações com monoterpenos e entre eles o carvone. Os autores observaram efeitos antagônicos entre os bioativos carvacrol + cinamaldeído + carvone e também entre as combinações com os compostos cinamaldeído + carvacrol + anetole + carvone frente ao TEO, contra isolados de *H. contortus*. Entretanto, resultados positivos em pesquisas com combinações também foram encontrados, como os de Ntalli et al. (2010), que testaram diversas combinações entre monoterpenos, identificaram efeitos sinérgicos entre carvone e *trans*-anetol, geraniol e *trans*-anetol, geraniol e carvacrol; e efeitos aditivos entre carvone e geraniol e, carvone e carvacrol.

Zhou et al. (2007) encontraram efeito sinérgico do cinamaldeído + carvacrol contra *Salmonella*. Os autores explicaram que o carvacrol poderia aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática e, provavelmente, permitir que o cinamaldeído fosse melhor transportado para a célula. Outro modo de ação do carvacrol é que isso poderia aumentar o número, tamanho ou duração da existência dos poros criados pela ligação de cinamaldeído a proteínas da membrana celular de *Salmonella*, suportando o efeito sinérgico quando esses dois compostos foram usados em combinação. Outro achado interessante com resultados sinérgicos foi o de Hoste et al. (2015), que também realizaram pesquisas combinando taninos condensados com flavonoides e identificaram efeitos sinérgicos entre esses taninos e a quercetina e a luteolina em termos de inibição *in vitro* contra L3 de *H. contortus*.

Após o teste com o bioativo carvone de forma isolada, é possível afirmar que a eficácia do OEMV possa estar relacionada com a presença desse bioativo em sua composição. Mediante a este fato, sugere-se que o carvone possua melhor eficácia quando testado de forma isolada do que como constituinte do OE, sendo que no

OEMV usado neste trabalho foi identificado o bioativo limoneno, já relatado aqui como um antagonista em potencial contra o carvone.

A combinação do OEMV em nanoemulsão com o antiparasitário Nitroxinil também foi testada (Tabela 18 e Figura 23), onde foi acrescido a CL50 do OEMV em nanoemulsão (0,10 mg/ml) com diferentes concentrações do antiparasitário. Foi observado um efeito aditivo ($p < 0,05$), na menor concentração do antiparasitário (4,8 mg/ml), onde a eficácia foi de 76,93%. Esse resultado é muito promissor, pois foi atingido com uma baixa concentração de medicamento em combinação com uma baixa concentração do OEMV. Nas últimas concentrações do Nitroxinil o efeito foi nulo ($p > 0,05$).

Os mecanismos de ação dos OEMP e OEMV e seus biocompostos não estão totalmente elucidados até o presente momento, porém Lei et al. (2010), buscaram identificar como acontecia o efeito anti-helmíntico de monoterpenos em *C. elegans* e determinaram que esses compostos agem sobre receptores de tiramina, inibindo a motilidade e o bombeamento da faringe do helminto, sendo esse um dos possíveis mecanismos de ação contra os NGL de ruminantes.

6.4 COMPARAÇÃO DAS CL50 DOS PRODUTOS ISOLADOS E EM COMBINAÇÕES

Na toxicologia, a CL50 indica a concentração necessária que pode causar morte de 50% de uma dada população de organismos em condições experimentais definidas. Quanto mais baixa a CL50 do químico, mais tóxico ele é para aquela determinada população em teste (OGA, 2008).

Ao analisar a Tabela 19, é possível observar que o OE de *M. villosa* não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre os anos 2017 e 2018 em que foram coletados, mesmo o OE coletado em 2018 possuindo em sua composição uma quantia maior do bioativo carvone. Já quando comparado com o OE de *M. villosa* testado em nanoemulsão é possível observar que não houve diferença estatística quanto a eficácia, porém nota-se uma redução na CL50, o que indica que a composição nanoestruturada do OE se mostrou muito superior, desde que foi testada já em uma menor concentração, e essa ação pode ser explicada justamente por essa capacidade que os agentes nanoestruturados possuem de liberação lenta do composto químico, fazendo com que

os níveis séricos das substâncias se mantenham constantes, podendo ocasionar, assim, em uma maior eficácia nesse tipo de teste *in vitro* (ZANOTO-FILHO et al., 2013).

Observando ainda a Tabela 19, é possível visualizar que a ação do OE da *M. piperita* não teve diferença significativa ($p>0,05$) dos OE da *M. villosa*, o que significa que nas concentrações testadas, as duas plantas apresentam uma atividade semelhante, mesmo tendo compostos majoritários diferentes.

Ao comparar a CL50 dos bioativos isolados, nota-se que o carvone se mostrou extremamente mais tóxico do que o limoneno ($p<0,05$), com CL50 de 1,96 mg/ml enquanto o limoneno foi de 14,27 mg/ml, ficando eminente uma melhor atividade larvívica proporcionada pelo carvone.

Nos testes de combinações entre os produtos, observa-se que houve interações muito promissoras entre algumas combinações. A adição da CL50 do OE da *M. piperita* em diferentes concentrações do Nitroxinil aumentou significativamente ($p<0,05$) a eficácia do medicamento, baixando a CL50 do antiparasitário de 11,81 para 7,16 mg/ml, o que significa que adicionando o OE junto com o antiparasitário é possível aumentar a eficácia frente as larvas testadas, podendo diminuir assim a quantidade de medicamento, o que promove retardo na seleção de parasitos resistentes, menor contaminação ambiental e maior bem estar animal (ATHANASIADOU et al., 2008).

A adição da CL50 do carvone juntamente ao Nitroxinil também foi positiva ($p<0,05$), sendo capaz de reduzir a CL50 do antiparasitário de 11,81 para 4,77 mg/ml, trazendo benefícios como os relatados no parágrafo anterior, ou seja, com a adição do carvone é possível obter eficácia semelhante ao antiparasitário de forma isolada, porém com menor concentração do medicamento.

As combinações entre o carvone e o Nitroxinil com o limoneno não surtiram diferenças positivas, pelo contrário, a combinação entre 1% do limoneno com o carvone resultou em uma perda significativa ($p<0,05$) da eficácia, aumentando também CL50 do carvone, que de forma isolada foi de 1,96 mg/ml e combinado com o limoneno subiu para 5,38 mg/ml. Esse resultado revela que a presença do limoneno reduziu a eficácia do carvone, podendo ter causado um efeito antagônico sobre esse bioativo.

A combinação do Nitroxinil com o limoneno não trouxe diferença estatística significativa entre a média das eficácias ($p>0,05$) (Tabela 19).

A CL50 do OE da *M. villosa* em nanoemulsão combinada com o antiparasitário Nitroxinil também foi positiva, aumentando significativamente ($p < 0,05$) a eficácia, e reduzindo em quase 50% a CL50 do Nitroxinil que, de forma isolada, foi de 18,02 mg/ml para 9,11 mg/ml na combinação.

Ao observar a tabela 19, fica claro que podem haver combinações positivas entre produtos vegetais com medicamentos sintéticos, podendo ser uma alternativa de controle eficaz contra endoparasitas de ruminantes. Resultados negativos também foram constatados, porém não são menos importantes, uma vez que a partir desses estudos também é possível descartar combinações que não apresentam resultados promissores na jornada em busca de novas moléculas com potencial antiparasitário.

De forma geral, todos os produtos testados apresentaram eficácia considerável contra L3 de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp., exceto o bioativo limoneno, que teve o pior resultado do estudo tanto de forma isolada, quanto combinado com outros produtos.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível observar a grande eficácia *in vitro* dos OE das duas espécies de menta (*M. villosa* e *M. piperita*), bem como do bioativo carvone, contra *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. O bioativo limoneno não apresentou eficácia relevante contra os nematoides no teste desenvolvido. O OEMV coletado em 2017 e sob nanoemulsão, demonstrou grande eficácia no controle dos parasitos, se mostrando extremamente superior ao OEMV, quando testado isolado.

Os resultados dos tratamentos em combinações, também foram positivos para as combinações entre OEMP e Nitroxinil e carvone e Nitroxinil, resultando em efeitos sinérgicos e aditivos. Efeito negativo entre os tratamentos em combinações se deu entre Nitroxinil e limoneno e carvone e limoneno, onde o bioativo limoneno atuou como antagonista dos outros produtos.

Conclui-se então, que os OE das duas plantas (*M. villosa* e *M. piperita*) e o bioativo carvone apresentaram eficácia frente ao TIML contra L3 dos nematoides *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp., bem como podem ser utilizadas em sinergia com o antiparasitário Nitroxinil, aumentando assim a eficácia obtida pelo fármaco e diminuindo a dose final do medicamento. Esse resultado é promissor na descoberta de novas moléculas antiparasitárias, promovendo assim a possibilidade de controle parasitário alternativo, retardando a seleção de organismos resistentes aos antiparasitários comerciais.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos devem ser conduzidos a partir dos dados apresentados; como o teste dos produtos em diferentes concentrações e em combinações com outros antiparasitários, desenvolvimento de formulações, ensaio de toxicidade com *Artemia salina*, assim como a realização de ensaios enzimáticos e testes *in vivo*. Testes com necropsia e histologia de larvas e adultos também seriam interessantes investigar possíveis alterações morfológicas, que nos permitam a descoberta do mecanismo de ação desses produtos.

Desta forma, acreditamos que a etapa que se encerra neste projeto foi vitoriosa, principalmente por ter atingido resultados que nos permitem refletir sobre um futuro promissor para estes produtos, com o desenvolvimento de formulações de medicamentos antiparasitários eficazes e que poderão trazer mais saúde e bem-estar aos animais.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois: **Allured Publishing Corporation**, 4.1 ed., 804 p., 2007.

AHMED, M.; LAING, M. D.; NSAHLAI, I. V. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of select medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep. **Journal of Helminthology**. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/article_S0022149X1200020X>. Acesso em: 15/09/2018.

AKKARI H., EZZINE O., DHAHRI S., B'CHIR F., REKIK M., HAJAJI S., DARGHOOUTH M.A., JAMÂA M.L.B.; GHARBI M. Chemical composition, insecticidal and *in vitro* anthelmintic activities of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**. V. 74, p. 745-751, 2015.

ALMEIDA, G. D; FELIZ, D. C.; BORGES, D.G.; ONIKUZA, M. K.; TAVARES, L. E.; PAIVA, F.; BOGES, F. A. Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia spp.* in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1-2, p. 59-65, 2013.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ M.A., PÉREZ GARCÍA J., BARTLEY D., JACKSON F.; ROJO-VÁZQUEZ F.A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 56-61, 2005.

AMARANTE, A. F. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 68-71, 2004.

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. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 52-58, 2016.

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. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 323-330, 2017.

ANZIANI, O. S.; SUAREZ, V.; GUGLIELMONE, A. A.; WARNKE, O.; GRANDE, H.; COLES, G. C. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 303-306, 2004.

ARAUJO, J. M. A. **Química de alimentos teoria e prática**. Editora UFV, 2 ed. 475 p. 1999.

ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.; KYRIAZAKIS, J. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 2-11, 2008.

AZEVEDO, M.M.M. Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas. Tese de doutorado do Departamento de físico química. **Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 153 p, 2005.

BASSETTO, C. C.; SILVA, B. F.; NEWLANDS, G. F.; SMITH, W. D.; AMARANTE, A. F. Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. **Parasitology Immunology**, v. 33, n. 7, p. 377-381, 2011.

BATISTA, L. F. RAMOS, L. F.; BRITO, S. N.; CASTRO, A. L. O.; ANTUNES, C. R.; OLIVEIRA, L. L. S. Resistencia anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais de ovinos. **Revista Pubvet**, v. 11, n. 12, p. 1245-1249. 2017.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475. 2008.

BARBIERI, A. M. E.; LOUVANDINI, H; ARAUJO, R. C; KATIKI, L. M. Potencial Anti-helmíntico de óleos essenciais em nematoides gastrintestinais de ovinos. Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, USP – Piracicaba/SP, 2014.

BESIER, R. B.; LOVE, R. A.; LYON, J.; VAN BURGEL, A. J. A targeted selective treatment approach for effective and sustainable sheep worm management: investigations in Western Australia. **Animal Production Science**, v. 50, p. 1034–1042, 2010.

BEDOUKIAN, R.; RAIANA, A.; FLORANCE, C.; LAX, A. Potential of natural products and their derivatives to control formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 5, p. 1746–1750, 2012.

BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D. MACALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209–228, 2008.

BIESKI, I. G. C. **Plantas Medicinais e Aromáticas no Sistema Único de Saúde da Região Sul de Cuiabá – MT**. Monografia (Especialização em Plantas Medicinais) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 92 p., 2005.

BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORDIM, E. L. Algumas considerações sobre a resistência de nematodas gastrintestinais de ruminantes aos anti-helmínticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 80-81, 2004.

BOWMAN, D. D; LYNN, R. C; EBERHARD, M. L; ALCARAZ, A. **Parasitologia Veterinária de Georgis - Helmitos**. 8 ed. Barueri, SP: Manole, 2006.

BRICARELLO, P. A.; ZAROS, L. G.; ROCHA, R. A.; KOOYMAN, F. N.; DE VRIES, E.; GOLÇALVES, J. R.; PIRES, A. V.; AMARANTE, A. F. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 272-278, 2007.

BROCKSOM, T. J.; BROCKSOM, U.; DE SOUSA, D. P., FREDERICO, D. Cycloheptenones from (R)-(-)-carvone: Intermediates for perhydroa- zulene terpenoids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 3628–3632, 2005.

BRUXEL, F. LAUX, M. WILD, L. B. FRAGA, M. KOESTER, L. S. TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUSKE, R.; SANTURINO, J. M.; DE OLIVEIRA, C. V.; BIANCHINI, L. A.; DA SILVA, J. H.; DE LA RUE, M. L. *In vitro* influence of temperature on the biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 473-478, 2012.

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

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTAC, T.C., MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B., BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 1-2, p. 167-170, 2008.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA M. F. G.; BEVILAQUA C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.

CANTON, C.; CEBALLOS, L.; FIEL, C.; MORENO, L.; YAGÜEZ, P. D.; BERNAT, G.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L. Resistant nematodes in cattle: Pharmaco-therapeutic assessment of the ivermectin-ricobendazole combination. **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 40-48, 2017.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105 n. 8, p. 1026-1032, 2010.

CARVALHO, C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Carvone: why and how should one brother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, p. 413-422. 2006.

CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L. G.; CHAVES, F. C.; STEPHAN, M. P.; BIZZO, H. R.; AMARANTE, A. F. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.

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 myrtoides* on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 70-76, 2017.

CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on

lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.

CHARLIER, J.; VANDE VELDE, F.; VAN DER VOORT, M.; CLAEREBOUT, E.; ECONOHEALTH: placing helminth infections of livestock in an economic and social context. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 62–67. 2015.

ÇINAR, K. A REVIEW ON NANOEMULSIONS: Preparation Methods and Stability. **Trakya University Journal of Engineering Sciences**, v. 18, n. 1, p. 73-83, 2017.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; MADRID, I.; FONSECA, A. O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.

COSGROVE, T. **Colloid Science**: principles, methods and applications. Bristol: Departament of Chemistry University of Bristol, 394 p., 2005.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1417–1450, 2006.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites) Chapter 24 - In- Biochemistry and Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. 2000, **American Society of Plant Physiologists**, p. 1250-1318, 2000.

CUNHA FILHO, L.F.C.; YAMAMURA, M.H. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Tamarana, Paraná, Brasil. **Ciência Biológica da Saúde**, v.1, n.1, p. 31-39, 1999.

DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; HERRERA, J. M.; PIZZOLITTO, R. P.; ARECO, V. A.; ZYGADLO, J. A. Terpenes: Natural products for controlling insects of importance to human health- a structureactivity relationship study. **Psyche**, v. 17, 2016.

DAL POZZO, M. Mastite bovina e caprina: suscetibilidade de isolados de *Staphylococcus* spp. frente aos óleos essenciais extraídos de condimentos / Dissertação de mestrado. 69 p., 2010.

DEMELEER, J.; KUTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A.; STAFFORD, K.; RYDZIK, A.; VARADY, M.; KENYON, F.; COLES, G.; HOGLUND, J.; JACKSON, F.; VERCRUYSSSE, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 58–64, 2010.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYANT, Z. N.; ELAM, G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

ELSENER, J.; VILLENUEVE, A.; DESCOTEAUX, L. Evaluation of a strategic deworming program in dairy heifers in Quebec based on the use of moxidectin, an endectocide with a long persistency. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 38-44, 2001.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Review report for the active substance carvone. **Unit E.3 Chemicals, contaminants, pesticides**. Jan. 22, 2008.

FARIAZ, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 263-288, 2003.

FERNANDES, J. I.; VEROCAI, G. G.; RIBEIRO, F. A.; MELO, R. M. P. S.; CORREIA, T. R.; VEIGA, C. C. P.; VIEIRA, V. P. C.; SCOTT, F. B. Eficácia acaricida de uma emulsão contendo 10% de óleo de nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Psoroptes ovis* em coelhos naturalmente infestados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1253-1256, 2012.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; KUHNLE, A. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion Colloids and Surfaces: **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERREIRA, L. E.; BENINCASA, B. I.; FACHIN, A. L.; FRANÇA, S. C.; CONTINI S. S. H. T.; CHAGAS A. C. S.; BELEBONI, R. O. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 288, p. 70-76, 2016.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1391-1402, 2013.

FUGH-BERMAN, A. Herb-drug interactions. **Lancet**, v. 355, p. 134–138, 2000.

FURTADO, S. K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 127 p., 2006.

GAÍNZA, Y. A., DOMINGUES, L. F.; PEREZ, O. P.; RABELO, M. D.; LÓPEZ, E. R.; CHAGAS, A. C. S. Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. **Industrial Crops and Products**. V. 76, p. 647-652, 2015.

GAÍNZA, Y. A.; FANTATTO, R. R.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. S. Piper aduncum against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 383-393, 2016.

GARLET, T. M. B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha L.*(*Lamiaceae*) cultivadas em hidroponia com variação de potássio**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 113p, 2007.

GEARY, T. G.; HOSKING, B. C.; SKUCE, P. J.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MAEDER, S.; HOLDSWORTH, P.; POMROY, W.; VERCRUYSSSE, J. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) guideline: anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 306–316, 2012.

GIARRATANA, F.; MUSCOLINO, D.; BENINATI, C.; GIUFFRIDA, A.; PANEBIANCO, A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis larvae*. **Experimental Parasitology**, v. 142, p. 7-10, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374- 381, 2007.

GONSALVES, J. K. M. C.; COSTA, A. M. B.; DE SOUSA, S. C. H.; CAVALCANTI, R. S. NUNES. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da co-acervação simples, **Scientia Plena**, v. 5, p. 1–8, 2009.

GRANDO, T. H.; BALDISSERA, M. D.; GRESSLER, L. T.; SÁ M. F.; BORTOLUZZI B. N.; SCHAFFER, A. S.; EBLING, R. C.; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R. C. V.; STEFANI, L. M., VAUCHER, R.; LEAL, M. L. R.; MONTEIRO, S. G. Melaleuca

alternifolia anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 177-183, 2016.

GRISI, L.; MASSARD, C.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B.; BORJA, G.; PEREIRA-LEAL, J. B.; MASSARD, C. L. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2014.

GROSS, S. J.; RYAN, W. G.; PLOEGER, H. W. Anthelmintic treatment of dairy cows and its effects on milk production. **Veterinary Record**, v. 144, n. 21, p. 581-587, 1999.

HENDRY, E. R.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B. R.; LAMBERT, P. A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1219–1225, 2009.

HIERRO, I.; VALERO, A.; NAVARRO, M. C. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. **Phytomedicine**, v. 13, n. 7, p. 527-531, 2006.

HÖFLING, J. F. ANIBAL, P. C.; OBANDO-PAREDA, G. A.; PEIXOTO, I. A.; FURLETTI, V. F.; FOGLIO, M. A.; GONÇALVES, R. B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.

HOSTE, H.; MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J. F.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1, p. 18-27, 2012.

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

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24, 2012.

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**, v. 228, p. 96-102, 2016.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lam meat. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 451-458, 2007.

Kaplan, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 477–481, 2004.

KARPANEN, T. J.; WORTHINGTON, E. R.; HENDRY, E. R.; CONWAY, B. R.; LAMBERT, P. A. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1031–1036, 2008.

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C. S.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four diferente *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

KATIKI, L.M.; BARBIERI, A. M. E.; ARAUJO, R. C.; VERÍSSIMO, C. J.; LOUVANDINI, H.; FERREIRA, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47-51, 2017.

KATIKI, L. M.; ARAUJO, R. C.; ZIEGELMEYER, L.; GOMES, A. C. P.; GUTMANIS, G.; RODRIGUES, L.; BUENO, M. S.; VERÍSSIMO, C. J.; LOUVANDINI, H.; FERREIRA, J. F. S.; AMARANTE, A. F. T. Evaluation of encapsulated anethole and carvone in lambs artificially- and naturally-infected with *Haemonchus contortus*, **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 36-42, 2019.

KLONGSIRIWET, C., QUIJADA, J., WILLIAMS, A.R., MULLER-HARVEY, I., WILLIAMSON, E. M., HOSTE, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal Parasitology: Drugs and Drug resistense**, v. 5, n. 3, p. 127-134, 2015.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 802–817, 2011.

KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 85-88, 2011.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R. F.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 715-720, 2002.

LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J. F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (ε-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2, p. 319-334, 2002.

LEI, J.; LESER M.; ENAN, E. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 7, p. 1062-1071, 2010.

LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**, New York: Marcel Dekker; v. 2, 1989.

LIMA, W. S.; FAKURI, E.; GUIMARÃES, M. P.; MALLACO, M. A. Dinâmica das helmintoses de bovinos de leite na região metalúrgica de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 97-103, 1997.

LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; BALLENT, M.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE, F.; PIS, A.; LANUSSE, C. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p.303-310, 2007.

LOPES, M. A.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 479-488, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e exóticas**. Ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002, p. 250-251.

LYNAGH, T.; CROMER, B. A.; DUFOUR, V.; LAUBE, B. Comparative pharmacology of flatworm and roundworm glutamate-gated chloride channels: Implications for potential anthelmintics. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 244-255, 2014.

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. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 93-98, 2010.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; AMÓRA, S. S. A. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 223-227, 2011.

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. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 268-275, 2015.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M.; DE OLIVEIRA, L. M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L.; MORAIS, S. M. MACHADO, L. K.; RIBEIRO, W. L. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.190, n. 3-4, p. 504-509, 2012.

MACHADO, M.; PIRES, P.; DINIS, A. M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M. C. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p. 325-327, 2008.

MAGGIORE, M. A.; ALBANESE, A. A.; GENDE, L. B.; EGUARAS, M. J.; DENEGRI, G. M.; ELISSONDO, M. C. Anthelmintic effect of *Mentha spp.* essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1103-1112, 2012.

MARIE-MAGDELEINE, C.; UDINO, L.; PHILIBERT, L.; BOCAGE, B.; ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of *Musa paradisiacal* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 127-132, 2014.

MARTIN, G.B.; KADOKAWA, H. "Clean, Green and Ethical" Animal Production. Case Study: Reproductive Efficiency in Small Ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 1, 2006.

MARTINS, A. P.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I.L.; MOURA, T. F.; NOVAK, C. S.; ÉHEN, Z. Preparation and characterization of *Mentha villosa* Hudson oil-B-cyclodextrin complex. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 8, n. 2, p. 363-371. 2007.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; BARBOSA, J. M.; LEITÃO DA CUNHA, E. V.; HIRUMA, C. A. **The essential oil of *Mentha villosa* Huds. From northeastern Brazil**. Universidade Federal do Ceará, Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza CE, 1999.

MAYER, S.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. Vitamin-E enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: factors influencing droplet size and stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 402, p. 122-130, 2013.

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. **Soft Matter**, v. 9, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MELLO, M. H. A.; DEPNER, R.; MOLENTO, M. B.; FERREIRA, J. J. Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 8-12, 2006.

MENDIBURU, F. agricolae: **Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.2-8. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>, 2017.

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. Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Parasitology Research**, v. 112, n. 9, p. 3161-3165, 2013.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M. B. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Sciences**, v. 19, n. 1, p. 29-35, 2014.

MOLAN, A. L.; FARAJ, A. M. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae). **Folha Parasitológica**, v. 57, n. 1, p. 62-68, 2010.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1469-1477, 2005.

MOLENTO, M. B. Resistência Parasitária. In: CAVALCANTE, A. C. R. et al. **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: Epidemiologia e controle**. 1ª Ed. Brasília – DR: Embrapa Informação Tecnológica, p. 331-366, 2009.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C.; TORRES-ACOSTA, J. F.; GELDHOFF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 126-132, 2011.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 117-121, 2001.

MOLENTO, M.; ARAÚJO, F. B. BUZATTI, A.; SANTOS, C.P. *In vitro* efficacy de *Duddingtonia flagrans* contra nematoides de ovinos com base em cálculo *in vivo*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 1, p. 86-89, 2018.

MONTE, F.J.Q.; OLIVEIRA, E.F. Triterpenóides pentacíclicos de *Mentha x villosa*: identificação estrutural e atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 491-500, 2001.

MONTEIRO, A. L. G. **Quantificação de resíduos de medicamento anti-helmíntico nas fezes e nos tecidos de cordeiros produzidos em ambientes pastoril**. Ministério da Educação: Universidade federal do Paraná, 2010.

MONTEIRO, L. M. Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofuril: preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida potencial. Dissertação para Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 2013.

MOREY, R. A.; KHANDAGLE, A. J. Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1799-1805, 2012.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle Biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PINTO, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporium canis*. **Journal de Mycologie Médicale**. V. 22. n. 2, p. 179-184, 2012.

MULLEN, K. A. E.; LEE, A. R.; LYMAN, R. L.; MASON, S. E.; WASHBURN, S. P.; ANDERSON K. L. An *in vitro* assessment of the antibacterial activity of plant-derived oils. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5587-5591. 2014.

MURRAY, M. J.; LINCOLN, D. E. The genetic basis of acyclic oil constituents in *Mentha citrate Ehrh*. **Genetics**, v. 65, p. 457-471, 1970.

MUSCATELLO, G.; LEADON, D. P.; KLAYT, M.; OCAMPO-SOSA, A.; LEWIS, D. A.; FOGARTY, U.; BUCKLEY, T.; GILKERSON, J. R.; MEIJER, W. G.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 5, p. 470-478, 2007.

NASCIMENTO, E. M. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa Huds.* (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos: **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 817-824, 2012.

NITROXINIL. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15532#section=Top>>. Acesso em: 19 Fev. 2019.

NTALLI, N.G., FERRARI, F., GIANNAKOU, I., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, v. 67, p. 341- 351, 2011.

NOGUEIRA, F. A.; FONSECA, L. D.; DA SILVA, R. B.; FERREIRA, A. V. P.; NERY, P. S.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. *In vitro* and *in vivo* efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 325-330, 2012.

NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; STINTZING, F. C.; CARLE, R.; SCHNITZLER, P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against *Herpes simplex virus* type 1 and type 2 *in vitro*. **Planta Medica**, v. 72, n. 15, p. 1378-1382, 2006.

OGA, SEIZI. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ed, São Paulo, SP, 677 p., 2008.

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

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 29-35, 2006.

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. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 155-160, 2011.

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. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n.3, p. 288-292, 2014.

PANDEY, A. K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 682-694, 2014.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174-187, 2015.

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. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 118-122, 2015.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol

against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 59-63, 2012.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)/ Universidade de São Paulo, p.1-10, 2004.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 491-502, 2007.

PIEDRAFITA, D. P.; DE VEER, M. J.; SHERRARD, J.; KRASKA, T.; ELHAY, M.; MEEUSEN, E. N. Field vaccination of sheep with larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. **Vaccine**, v. 30, n. 50, p. 7199-7204, 2012.

POTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulation: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 231-248, 2007.

PRICHARD, R. K.; HALL, C. A.; KELLY, J. D.; MARTIN, I. C.; DONALD, A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 239-250, 1980.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 515-523, 1990.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 445-453, 2001.

QI, H.; WANG, W. X.; DAI, J. L.; ZHU, L. In vitro *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 3-4, p. 223-227, 2015.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RADÜNS, L. L. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e composição dos óleos essenciais de guaco e hortelã comum.** Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. 89 p. 2004.

RANGEL, V. B. **Avaliação de derivados de lactonas macrocíclicas contra infestações naturais de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) e de helmintos gastrintestinais, em bovinos de corte.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2003.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RIBEIRO, W. L. C. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v.135, p. 24-29, 2013.

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. In vitro effects of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion on *Haemonchus contortus* and toxicity in rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3-4, p. 444-447, 2015.

RISSI, M. Limoneno. Disponível em: <<https://www.maconrissi.com/limoneno.htm>>. Acesso em: Jan, 2019.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R PLOS ONE, 10(12), e0146021, 2015.

ROEBER, F.; HASSAN, E. B.; SKUCE, P.; MORRISON, A.; CLAREBOUT, E.; CASAERT, E.; HOMER, D. R.; FIRESTONE, S.; STEVENSON, M.; SMITH, L.; LARSEN, J. An automated, multiplex-tandem PCR platform for the diagnosis of gastrointestinal nematode infections in cattle: An Australian-European validation study. **Veterinary Parasitology**, v. 239, n. 1-2, p. 62-75, 2017.

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

ROSSI, C. A.; SOARES, M.; LUCHESE, F. C.; SANTURIO, J. M. 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**, v.16, n. 1, p. 93-102, 2015.

SAGAVE, L.; GRESSLER, L. T.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B.; VARGAS, A. P. C.; LOVATO, M.; SANGIONI, L. A.; POTTER, L.; BOTTON, S. A. *Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.

SANTOS, C.; CAMPETRINI, L. H.; VIEIRA, D. L.; PRITSCH, I.; YAMASSAKI, F. T.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; MAURER, J. B. B.; MOLENTO, M. B. Chemical Characterization of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Hydroalcoholic Extract and Its Efficiency against Gastrointestinal Nematodes on Shep. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 80, 2018.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação: óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 26-30, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6º edição; Cap. 3. 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª. Edição. Editora da UFSC. 747p, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. 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. 2004.

SOUSA, P. J. C. LIMA, C. C.; OLIVEIRA, V. S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 6, p. 787-791, 1997.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; BELLATOL, V.; SARTOR, A. A.; SARTOR, C.; SCHELBAURLL, C. A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1363-1367, 2008.

SOKOVIC, M. D. Antifungal activity of the essential of *Mentha piperita*. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 7, p. 511-515, 2006.

SOLANS, C. IZQUIERDO, J. P.; NOLLA, N.; AZEMAR, M. J.; CARCIA, C. Nanoemulsions. **Current opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, p. 102-110, 2005.

SQUIRES, J. M.; Foster, J. G.; Lindsay, D. S.; Caudell, D. L.; Zajac, A. M. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 95-99, 2010.

STRONBERG, B. E.; GASBARRE, L. C.; WAITE, A.; BECHTOL, D. T.; BROWN, M. S.; ROBINSON, N. A.; OLSON, E. J.; NEWCOMB, H. *Cooperia punctata*: Effects on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 284-291, 2012.

SUAREZ, V. H.; BEDOTTI, D. O. Effects of an integrated control program with ivermectin on growth, carcass composition and nematode infection of beef cattle in Argentina's western pampas. **Research in Veterinary Science**, v. 50, n. 2, p. 195-199, 1991.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, p. 12-20, 2006.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TOLOZA, A. C.; ZYGADLO, J.; CUETO, G. M.; BIURRUN, F.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. I. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 889-895, 2006.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 205-210, 2010.

VAN DE DOOR, H.; KRATZ, P. D. A generalisation of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid chromatography. **Journal Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 277-306, 2004.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals, **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para a extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, v. 1, n. 1, p. 77-81, 1963.

WHELAN, M.; BLOENHOFF, Y.; FUREY, A.; SAYERS, R.; DANAHER, M. Investigation of the Persistence of Nitroxynil Residues in Milk from Lactating Dairy Cows by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7793-7797, 2011.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v. 8, p. 401-409, 2001.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE, J. B.; PANKAVICH, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 181-213, 1995.

WANG, J.; WANG, R.; YANG, X. Y. Efficacy of an *Arthrobotrys oligospora* N mutant in nematode trapping larvae after passage through the digestive tract of sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 3-4, p. 359-361, 2013.

XU, M.; MOLENTO, M. B.; BLACKHALL, W.; RIBEIRO, P.; BEECH, R.; PRICHARD, R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 2, p. 327-335, 1998.

ZANOTTO-FILHO, A.; BRAGANHOL, E.; EDELWEISS, M. I.; BEHR, G. A.; ZANIN, R.; SCHRÖDER, R.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A. M.; MOREIRA, J. C. The

curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth *in vitro* and in preclinical model of glioblastoma. **The Journal Nutritional of Biochemistry**, v. 23, p. 591-601, 2012.

ZHOU, F.; JI, B.; ZHANG, H.; JIANG, H.; YANG, Z.; LI, J.; YAN, W. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food-borne pathogen *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 620-624, 2007.

ZHU, L.; DAI, J. L.; YANG, L.; QIU, J. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (*Strongylida*). **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 112-117, 2013.

ZHU, L.; DAI, J.; YANG, L.; QIU, J. Anthelmintic activity of *Arisaema franchetianum* and *Arisaema lobatum* essential oils against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 311-316, 2013.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE ACEITE PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 088/2017, referente ao projeto “Utilização do extrato de *Mentha villosa* em fases de vida livre de nematóides gastrintestinais de ruminantes”, sob a responsabilidade de Marcelo Beltrão Molento – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 02/10/2017.

Vigência do projeto	Julho/2018 até Março/2019
Espécie/Linhagem	<i>Ovis aries</i> (ovino)/Suffolk
Número de animais	05
Peso/Idade	20 – 40 kg/1 ano
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos (LAPOC/UFPR) em Pinhais, Paraná, Brasil

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 088/2017, regarding the project “Use of *Mentha villosa* extract in free living stages of gastrointestinal nematodes of ruminants” under Marcelo Beltrão Molento supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 02/10/2017.

Duration of the project	July/2018 until March/2019
Specie/Line	<i>Ovis aries</i> (ovine)/Suffolk
Number of animals	05
Wheight/Age	20 – 40 kg/1 year
Sex	Male and female
Origin	Ovine and Goat Production Laboratory (LAPOC/UFPR) in Pinhais, Paraná, Brazil

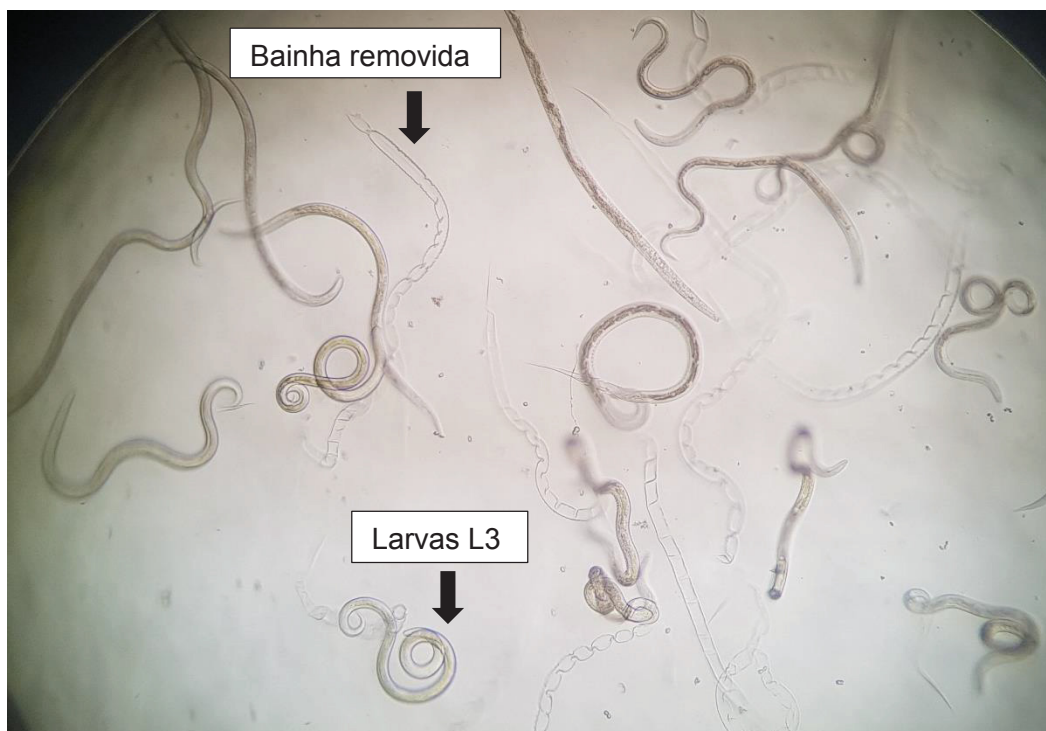
Curitiba, 02 de outubro de 2017.

Chayane da Rocha

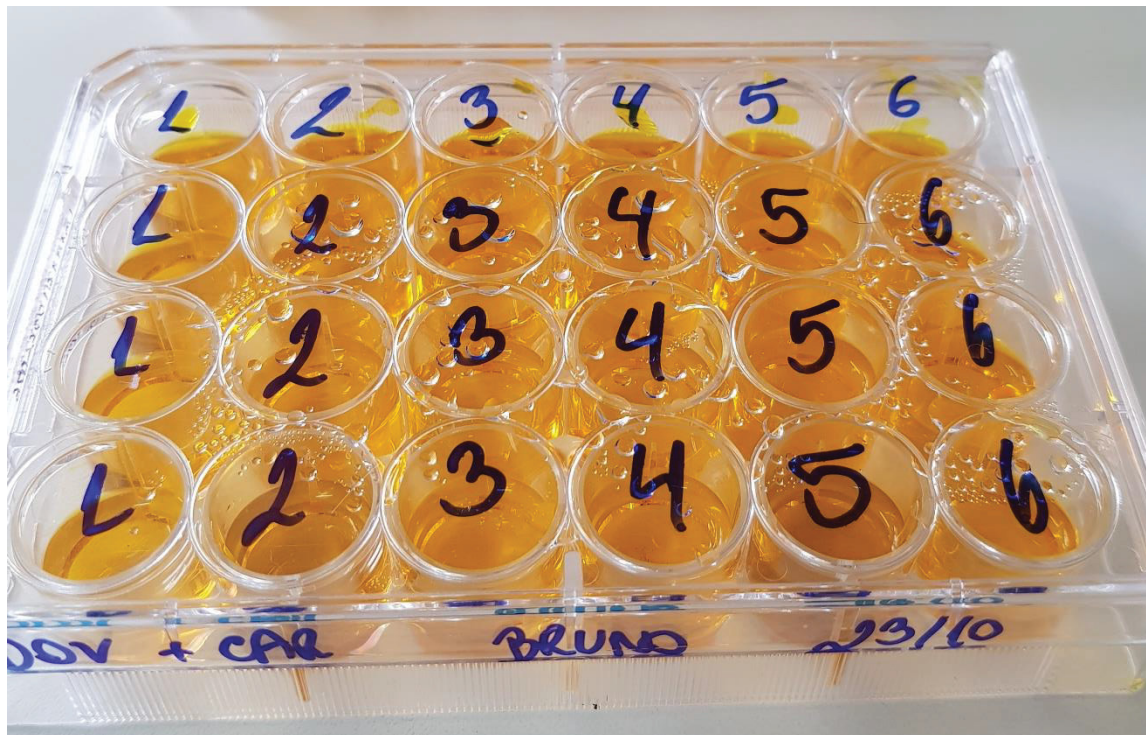
Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

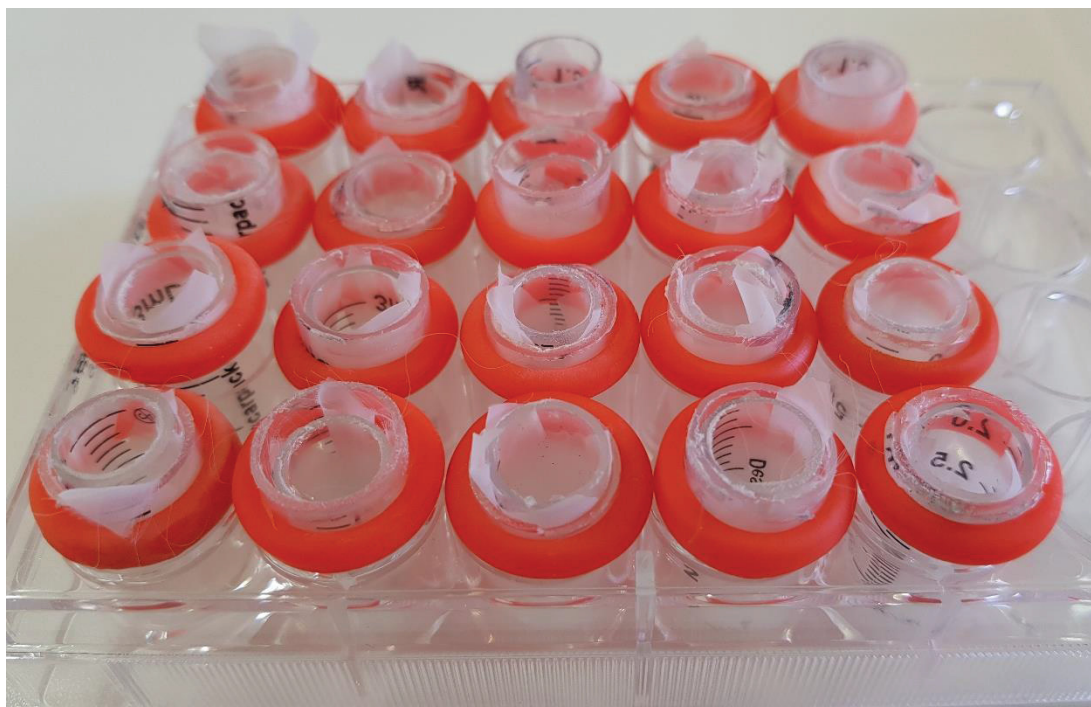
ANEXO 2 – LARVAS L3 DE *HAEMONCHUS* SPP. E *TRICHOSTRONGYLUS* SPP. TENDO SUAS BAINHAS REMOVIDAS COM HIPOCLORITO DE SÓDIO.



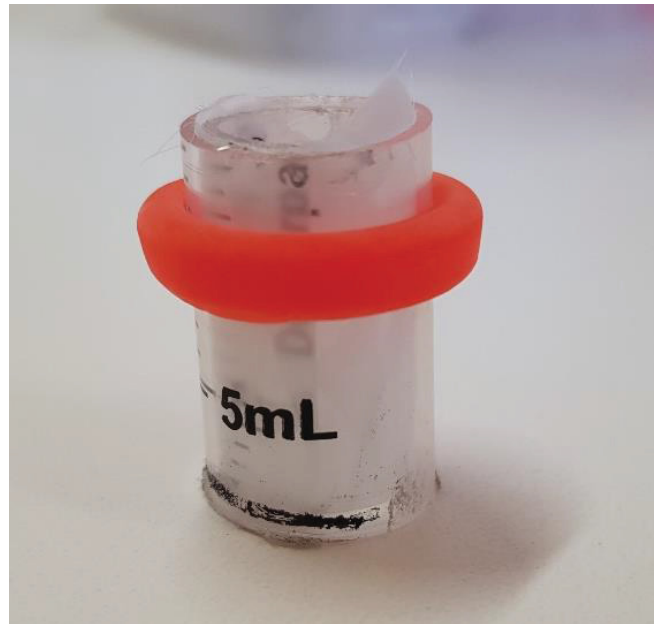
ANEXO 3 – INCUBAÇÃO DAS LARVAS L3 DE *HAEMONCHUS* SPP. E *TRICHOSTRONGYLUS* SPP. COM OS PRODUTOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



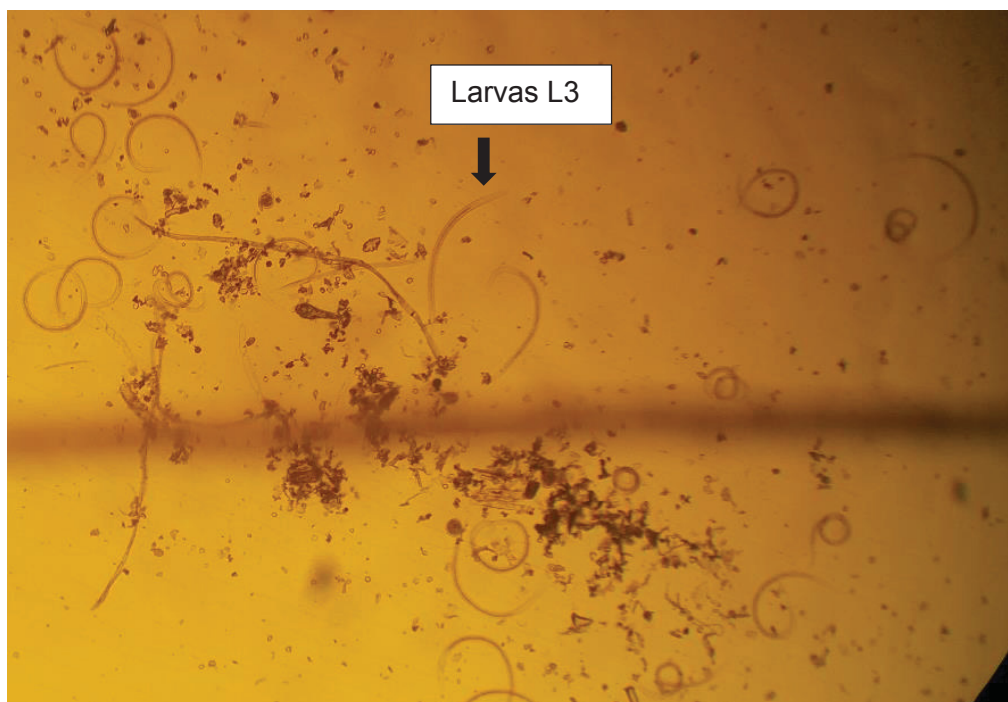
**ANEXO 4 – PLACAS DE 24 POÇOS COM OS APARATOS JÁ PREPARADOS
PARA MIGRAÇÃO LARVAR**



ANEXO 5 - APARATO DEVIDAMENTE PREPARADO. CONSISTE EM UMA SERINGA DE 5 ML CORTADA NO TAMANHO APROXIMADO DE 2 CM, COM OUTRA SERINGA DE 2 ML, TAMBÉM CORTADA COM TAMANHO PRÓXIMO DE 2 CM, ENVOLVIDA POR UMA MALHA COM ESPAÇAMENTO DE 25 MICRÔMETROS.



ANEXO 6 – CONTAGEM DE LARVAS MIGRADAS, UTILIZANDO O MICROSCÓPIO INVERTIDO.



ANEXO 7 – IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE LARVAS L3 DE NEMATODAS GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES. *HAEMONCHUS* SPP. A ESQUERDA E *TRICHOSTRONGYLUS* SPP. A DIREITA

