



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JULIANA RIVAS FIGUEREDO PEREIRA

**Avaliação do potencial anti-helmíntico de óleos essenciais livres e associados
a tiabendazol e ivermectina sobre *Haemonchus contortus***

SÃO LUÍS -MA

2022

JULIANA RIVAS FIGUREDO PEREIRA

Avaliação do potencial anti-helmíntico de óleos essenciais livres e associados a tiabendazol e ivermectina sobre *Haemonchus contortus*

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior

SÃO LUÍS - MA

2022

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

Figueredo Pereira, Juliana Rivas.

Avaliação do potencial anti-helmíntico de óleos essenciais livres e associados a tiabendazol e ivermectina sobre *Haemonchus contortus* / Juliana Rivas Figueredo Pereira, Juliana Rivas Figueredo Pereira. - 2022.

39 f.

Orientador(a): Lívio Martins Costa Junior.

Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Endoparasitas. 2. Produtos naturais. 3. Sinergismo. I. Figueredo Pereira, Juliana Rivas. II. Martins Costa Junior, Lívio. III. Título.

JULIANA RIVAS FIGURED O PEREIRA

**Avaliação do potencial anti-helmíntico de óleos essenciais livres e associados
a tiabendazol e ivermectina sobre *Haemonchus contortus***

Monografia apresentada à
Universidade Federal do
Maranhão, como requisito parcial
para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior – (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. Danilo Rodrigues Barros Brito – (Titular)
Instituto Federal do Maranhão – IFMA

Me. Dauana Mesquita Sousa – (Titular)
Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho a minha mãe, que sempre me incentivou a estudar, me deu força, coragem e dedicação em todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que sempre me conduziu com as devidas lições de amor, e me proporcionou saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus familiares, em especial minha mãe por toda paciência e incentivo e investimento na minha carreira acadêmica. E em especial também para minha prima/irmã, por ser minha companheira nos perrengues do dia a dia, de fé e de vida. Agradeço ao meu namorado por todo o incentivo e palavras encorajadoras, além da compreensão da minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos.

Meus agradecimentos ao meu orientador Lívio Martins, que possibilitou e incentivou a participação nesta jornada de conhecimentos, compartilhando suas ideias e reflexões e possibilitando assim o aperfeiçoamento no aprendizado. Um agradecimento especial a minha mãe da jornada científica, Dauana Mesquita, que foi essencial para que tudo isso ocorresse. Gratidão pelos conselhos e paciência que teve com todos os meus pedidos de socorro. Além da orientação, se tornou uma grande amiga que quero levar pra vida toda.

Um profundo agradecimento aos meus amigos da graduação (Bep), vocês tornaram minha graduação leve, e foram essenciais para não ocorrer desistências. Meus agradecimentos ao meu trio (helmincats), não consigo imaginar o que seria de mim sem vocês, pois foram especialistas em tornar os perrengues da trajetória em bons momentos com muitas gargalhadas. Amigos, sempre lembrarei de cada momento com carinho, até os bons e piores, pois ao lado de vocês tudo foi incrível.

Ao LCP, que é minha segunda casa, agradeço a todos os integrantes com muito carinho pela parceria, incentivo e suporte em todo o processo de construção do meu TCC. Com toda certeza vocês foram essências para minha evolução no meio científico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
2.1 Compostos e GC-MS.....	10
2.2 Manutenção da cepa de <i>Haemonchus contortus</i>	10
2.3 Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO).....	10
2.4 Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL).....	11
2.5 Combinação de anti-helmínticos sintéticos com Óleos essenciais.....	11
2.6 Análise Estatística.....	11
3. RESULTADOS.....	12
3.1 Análise GC-MS.....	12
3.2 Inibição na eclodibilidade de ovos.....	12
3.3 Inibição no desenvolvimento larval.....	13
3.4 Associação de Óleos essenciais com Tiabendazol.....	13
3.5 Associação de Óleos essenciais com Ivermectina.....	13
4. DISCUSSÃO.....	14
5. CONCLUSÃO.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	18
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	31
8. ANEXOS.....	39

1 **ARTIGO**

2 **Avaliação do potencial anti-helmíntico de óleos essenciais livres e associados a**
3 **tiabendazol e ivermectina sobre *Haemonchus contortus***

4
5 Juliana Rivas F. Pereira^a; Ruth Myrian M. Silva^a; Rayssa Q. Araújo^a; Dauana Mesquita
6 Sousa^b; Lívio Martins Costa Junior^c

7 a. Graduanda em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde,
8 Universidade Federal do Maranhão. (jurivas15@gmail.com)

9 b. Doutoranda pela Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão.

10 c. Orientador, Professor adjunto do Departamento de Patologia, Universidade Federal do
11 Maranhão.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

RESUMO

Haemonchus contortus constitui um dos principais nematoides parasitos de pequenos ruminantes, que induzem a grandes perdas econômicas. O controle desse parasito se baseia principalmente na utilização de anti-helmínticos sintéticos. Porém, o uso inadequado ocasionou a seleção de populações resistentes, estimulando, assim, a busca por novas alternativas. Os óleos essenciais apresentam uma diversidade de bioatividades e quando combinadas com compostos sintéticos podem aumentar a eficiência dos medicamentos atrasando surgimento de espécies resistentes e melhorando a eficiência. Dessa forma, objetivou-se explorar a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Eugenia caryophyllus*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon flexuosus* e *Citrus aurantium var. amara*, livres e combinados a compostos sintéticos como, tiabendazol e ivermectina. Os produtos foram avaliados *in vitro* por meio dos testes de eclosão de ovos (TEO) e desenvolvimento larvar (TDL). A análise estatística foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 para determinação das médias da IC₅₀ e o programa SynergyFinder Plus para avaliação das combinações com a classificação de sinergismo ou antagonismo. Os óleos essenciais com a melhor eficiência de acordo com TEO foi *C. cassia* (0,058 mg/mL), seguido de *E. caryophyllus* (0,065 mg/mL). Segundo os valores de TDL IC₅₀, os óleos com melhor desempenho foi *L. cubeba* (0,046 mg/mL) e *C. cassia* (0,055 mg/mL). Os óleos essenciais *C. flexuosus* e *C. winterianus* combinados com tiabendazol apresentaram um forte sinergismo (SC: 10.28; 9.50). E, a combinação de Ivermectina com o óleo essencial *C. aurantium var amara* apresentou o melhor sinergismo (SC: 7.2) oposto do óleo de *L. cubeba*, que apresentou um forte antagonismo (SC: -23.38). Em conclusão, os óleos essenciais exibiram atividade anti-helmíntica sobre ovos e larvas de *H. contortus*. A combinação com sintéticos apresentou interações sinérgicas e antagônicas. Portanto, futuros estudos devem ser realizados para elucidar melhor os mecanismos de interações e a viabilidade de sua eficácia *in vivo*.

Palavras-chave: Sinergismo. Antagonismo. Produtos naturais. Endoparasitas.

1. INTRODUÇÃO

65 *Haemonchus contortus* é um parasito gastrointestinal que afeta, particularmente, ovinos
66 e caprinos. A alta carga parasitaria reduz a produção de carne, leite e lã, afetando negativamente
67 a economia (Besier et al., 2016; Salle et al., 2019). A infecção pode se revelar de forma aguda
68 ou crônica, apresentando como principais sintomas clínicos: anemia e edema submandibular
69 (Selemon, 2018). O método de controle mais utilizado, se baseia na aplicação de anti-
70 helmínticos sintéticos com destaque para os benzimidazóis (BZs) e lactonas macrocíclicas
71 (LM) (Herath et al., 2021).

72 Os BZs agem sobre as β -tubulinas inibindo sua ligação e, conseqüentemente, a formação
73 de microtúbulos, um exemplo desta classe é o tiabendazol (Son et al., 2020). O grupo das
74 lactonas macrocíclicas é representado pelas avermectinas e milbemicinas, e tem como principal
75 meio de ação nos tecidos do trato digestivo e na abertura dos canais de cloro mediadas por
76 glutamato (Moreno et al., 2021). Dentro da classe das avermectinas, se destaca a Ivermectina,
77 proveniente dos produtos de fermentação da bactéria *Streptomyces avermitilis* (Martin et al.,
78 2021).

79 Entretanto, o uso frequente e aplicações irregulares de compostos anti-helmínticos,
80 acelerou a seleção de populações resistentes (Potârniche et al., 2021). A resistência anti-
81 helmíntica (RA) se caracteriza, como, uma perda hereditária da sensibilidade do anti-helmíntico
82 em uma população que anteriormente era suscetível (Fissiha e Kinde, 2021). A resistência a
83 ivermectina, se baseia em relatos de que os alvos do tratamento, como, os canais de cloro
84 tenham sofrido mutações nos genes responsáveis pela codificação de suas proteínas (Kotze et
85 al., 2014).

86 Nos últimos anos, foi relatado que os óleos essenciais (OEs) de várias espécies de
87 plantas apresentaram um grande potencial farmacológico (Sharifi-Rad et al., 2017). Esses se
88 caracterizam por ser líquidos oleosos que são extraídos de várias partes das plantas (folhas,
89 sementes, cascas, raízes, flores e frutos) (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2018). Em síntese,
90 destacam-se por apresentarem diferentes tipos de atividades biológicas incluindo
91 antibacteriana, antifúngica, anticancerígena e, também, anti-helmíntica (Álvarez-Martínez &
92 Barrajon-Catalán, 2021; Abd Rasehd et al., 2021; Sharma et al., 2022; Ferreira et al., 2018).

93 Os compostos bioativos dos OEs, possuem efeitos sinérgicos que intensificam a
94 atividade farmacológica (Ali-Shtayeh et al., 2019). Aliás, a sua combinação com drogas
95 sintéticas demonstra ser benéfica no combate à resistência parasitária em razão dos compostos
96 apresentarem mecanismos de ação diferentes (Lanusse et al., 2018). Portanto, o presente estudo
97

98 teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* dos óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*,
99 *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Eugenia caryophyllus*, *Cymbopogon winterianus*,
100 *Cymbopogon flexuosus* e *Citrus aurantium var. amara*, individualmente e associados com
101 tiabendazol e ivermectina sobre diferentes fases do ciclo de *Haemonchus contortus*.

102 .

103 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

104 **2.1. Compostos e GC-MS**

105 Os óleos essenciais foram adquiridos da Ferquima Ind. e Com. Ltda. (Vargem Grande,
106 São Paulo). O seu grau de pureza foi avaliado em cromatografia gasosa acoplada a
107 espectrometria de massa (GC-MS) em sistema Shimadzu QP 2010 ultra, com a injeção de 1
108 µL de solução 3:500 de óleo em hexano (Auto injetor AOC-20i), foi utilizado uma coluna
109 capilar de sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro
110 interno revestido com 5%-difênil/95%-dimetil-polisiloxano (0,25 µm de espessura do filme).
111 A temperatura do forno do CG foi programa de 60 °C a 240 °C (10 min) a 3 °C/min, as
112 temperaturas do injetor (split 1:20), linha de transferência e câmara de ionização foram de
113 250, 250 e 200 °C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de
114 1mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV com scans
115 automáticos (varredura) na faixa de 35 a 400 daltons a 0,30 scans/s. A identificação dos
116 componentes foi baseada no tempo e índice de retenção linear (série de n-alcenos C₈-C₄₀), na
117 interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas Adams 2006,
118 Nist 2011 e FFNSC 2. Os compostos sintéticos tiabendazol e ivermectina foram obtidos na
119 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

120

121 **2.2. Manutenção da cepa de *Haemonchus contortus***

122 Ovinos e caprinos mantidos na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), foram
123 infectados com uma população monoespecífica de *H. contortus* que se encontra no laboratório
124 de controle de parasito (LCP). Este projeto está inserido no Comitê de Ética em Experimentação
125 Animal da UFMA com o número de protocolo 23115.005443/2017-51.

126

127 **2.3. Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO)**

128 Ovos de *H. contortus* foram coletados de animais artificialmente infectados, conforme
129 descrito por Coles et al., (1992). As fezes frescas foram maceradas e processadas em peneiras

130

131 granulométricas (500 µm; 105 µm; 55 µm; 25 µm) para que os ovos sejam retidos. Os ovos
132 foram suspensos em solução salina saturada e lavado em água destilada posteriormente.

133 O teste foi baseado na metodologia de Coles et al. (1992). Cerca de 100 ovos por poço
134 foram adicionados em placas de 96 poços, com os tratamentos e controle. Os óleos essenciais
135 foram dissolvidos em Tween 80 a 3%, e o Tiabendazol em DMSO 5%, com diluição seriada de
136 50% para obtenção de 12 concentrações (10 a 0,005 mg/ml). As placas foram mantidas em
137 B.O.D. em torno de 27 °C por 48h. Após esse período, adicionou-se 10 µL de Lugol para leitura
138 em microscópio invertido. Todos os óleos, sintético e controles foram realizados em triplicata
139 e os que apresentaram a melhor média do índice de concentração letal (IC₅₀) foram
140 selecionados para combinação.

141

142 **2.4. Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL)**

143 O teste de desenvolvimento larvar seguiu o método descrito por Demeler et al., (2010).
144 Uma suspensão de 100 µL ovos foram adicionados em uma placa de 96 poços, armazenada em
145 B.O.D. sob 27 °C de temperatura e 80% de umidade. Após 24h foi adicionado meio nutritivo
146 com as 12 concentrações do produto (10 a 0,005 mg/ml) diluído em DMSO 1%. A incubação
147 permaneceu por mais 5 dias e a proporção de larvas de estágio L1 e L3 foram contadas em
148 microscópio invertido. Todos os óleos, sintético e controles foram realizados em triplicata e os
149 que apresentaram a melhor média do índice de concentração letal (IC₅₀) foram selecionados
150 para combinação.

151

152 **2.5. Combinação de anti-helmínticos sintéticos com Óleos essenciais**

153 O desenho experimental e o índice de combinação foram baseados nos métodos de Fu
154 et al. (2016), com a projeção de dados considerando 3 doses acima da IC₅₀ com diluições
155 seriadas de 50%.

156

157 **2.6. Análise Estatística**

158 Os resultados foram expressos em porcentagem de eficácia da inibição da eclosão de
159 ovos, e desenvolvimento larvar. Os experimentos foram analisados e calculados por meio do
160 programa GraphPad Prism 8.0. Para análise das combinações de drogas, foi utilizado o
161 programa SynergyFinder Plus (Zheng et al., 2022). O programa utiliza quatro modelos

162 matemáticos de referência a interação medicamentosa: agente único mais alto (HSA), que
163 quantificam o grau de sinergia como o excesso sobre a resposta máxima de um único
164 medicamento; definição de independência (Bliss), calcula o efeito multiplicativo de
165 medicamentos únicos como se eles agissem independentemente; modelo Loewe (Loewe)
166 calcula a resposta esperada correspondente a um efeito aditivo como se os medicamentos únicos
167 fossem os mesmos composto e potência de interação zero (ZIP) que calcula o efeito como se as
168 drogas isoladas não afetassem a potência uma da outra. O escore de sinergismo (SS) > 5 foi
169 categorizado como forte sinergia, e < 5 como forte antagonismo. Para definir a sensibilidade da
170 combinação dos compostos, utilizou-se um modelo de pontuação de sensibilidade de
171 combinação (CSS) que calcula a inibição relativa de uma combinação de drogas com base na
172 área sob as curvas de dose-resposta em escala log₁₀ das doses de IC₅₀ de cada constituinte
173 (Malyutina et al., 2019).

174

175 **3. RESULTADOS**

176 **3.1. Análise GC-MS**

177 A composição química de cada óleo é apresentada na Tabela 1. A análise por GC-MS
178 identificou os principais constituintes dos óleos de *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum*
179 *camphora*, *Litsea cubeba*, *Eugenia caryophyllus*, *Cymbopogon winterianus*, e *Cymbopogon*
180 *flexuosus*. Os majoritários de cada óleo foram Cinamaldeído (57.02%), 1,8 cineol (37.66%),
181 Citral (32,23%), Eugenol (82.94%), Citronelal (31.65%) e Citral (58.63%), respectivamente.

182

183 **3.2. Inibição na eclodibilidade de ovos**

184 A eficácia individual *in vitro* dos diferentes óleos foi avaliada neste estudo e todos
185 apresentaram atividade anti-helmíntica em TEO (Tabela 2). O controle negativo não apresentou
186 efeito sobre os ovos (índice de eclosão de ovos = 100%). Os OEs que apresentaram menor IC₅₀
187 foram: *C. cassia* (0,058 mg/mL) e *E. caryophyllus* (0,065 mg/mL). Em seguida, os demais óleos
188 exibiram as seguintes IC₅₀: *L. cubeba* (0,190 mg/mL), *C. flexuosus* (0,211 mg/mL) *C.*
189 *camphora* (0,736 mg/mL), *C. winterianus* (0,888 mg/mL). O OE de *C. aurantium var amara*
190 expressou a maior IC₅₀ (3,319 mg/ml), por isso não foi selecionado para combinação. A IC₅₀
191 para tiabendazol de acordo com TEO foi 0,000738 mg/ml (Tabela 2).

192

193

194 **3.3. Inibição no desenvolvimento larval**

195 Todos os óleos também apresentaram eficácia *in vitro* quando avaliadas no ensaio de
196 TDL (Tabela 3). Os OEs de *L. cubeba* e *C. cassia* exibiram a menor IC₅₀ (0,046 e 0,055 mg/mL,
197 respectivamente), seguido por *C. flexuosus* (0,100 mg/mL), *E. caryophyllus* (0,164 mg/mL), *C.*
198 *aurantium var amara* (0,555 mg/mL), e *C. winterianus* (0,609 mg/mL). Em contraste, *C.*
199 *camphora* apresentou a maior IC₅₀ (0,959 mg/mL), sendo excluída da combinação com
200 Ivermectina. A média da IC₅₀ de Ivermectina foi de 2,432 ng/mL de acordo com TDL (Tabela
201 3).

202

203 **3.4. Associação de Óleos essenciais com Tiabendazol**

204 A combinação de óleos essenciais com os sintéticos, foram avaliadas usando os ensaios
205 de TEO para associação com tiabendazol. Os mapas de sinergismo com os índices de
206 sensibilidade são apresentados na Figura 1A. Os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C.*
207 *winterianus* apresentaram um efeito altamente sinérgico quando combinado com Tiabendazol
208 (SS: 10,28; 9,50, respectivamente) com um escore de sensibilidade (CSS) de 67,72% e 65,15%,
209 nessa ordem. Em contraste a combinação de *L. cubeba* + TBZ (SS: -4.17; CSS: 52.44) e *C.*
210 *cassia* + TBZ (SS: -4.29; CSS: 58.73) exibiram efeitos antagônicos. As demais combinações
211 como: *C. camphora* + TBZ (SS: -5.84; CSS: 53.95) e *E. caryophyllus* + TBZ (SS: -7,41; CSS:
212 39,16) apresentaram os piores índices sinérgicos, sendo considerados altamente antagônicos
213 (Figura Sup.1).

214

215 **3.5. Associação de Óleos essenciais com Ivermectina**

216 A combinação dos OEs com Ivermectina foi realizada por meio do ensaio de TDL. Os
217 mapas de sinergismo e os índices de sensibilidade são apresentados na figura 1B. Somente a
218 combinação de *C. aurantium var amara* + IVM apresentou sinergismo (SS: 5,85; CSS de
219 60.66). As demais combinações como: *C. cassia* + IVM (SS:-2.09; CSS:58,83), *C. winterianus*
220 + IVM (SS: -4,81; CSS: 51.96), apresentaram antagonismo. *C. flexuosus* + IVM (SS: -10.89
221 CSS: 39.51) e *E. caryophyllus* + IVM (SS: -13.52; CSS: 58.18), foram altamente antagônicas
222 (Fig. Sup.5).

223

224

4. DISCUSSÃO

225

A estratégia de combinar sintéticos com produtos naturais surge como uma forma de melhorar sua eficácia, reduzir sua toxicidade e a combater a resistência anti-helmíntica (Lanusse et al., 2018). Além disso, o sinergismo entre dois ou mais componentes, reforça o efeito um do outro com a presença de dois ou mais mecanismos de ação (Ni et al., 2021).

229

No presente estudo, o OE de *C. cassia* e *E. caryophyllus* apresentaram a melhor IC₅₀ quando avaliados individualmente no teste de eclosão de ovos. Os seus principais constituintes, de acordo com o GC-MS foram cinamaldeído e eugenol respectivamente. Estes majoritários já têm sua atividade anti-helmíntica comprovada *in vitro* sobre ovos de *H. contortus* com IC₅₀ de 0,0018 e 0,57 mg/mL, na devida ordem (Katiki et al., 2014).

234

A quitina é um componente estrutural da parede celular da membrana do ovo de *H. contortus* (Gong et al., 2022). O modo de ação dos OEs e seus majoritário podem estar ligados a esta estrutura de proteção do ovo. O cinamaldeído diminui a síntese de quitina de *Geotrichum citriaurantii*, após uma exposição de 60 min (OuYang et al., 2019). O eugenol, também, exerce efeitos sobre a parede celular de *Alternaria sp*, com o aumento da atividade de β-1,3-glucanase, uma hidrólise responsável pela quebra de glicanos de algas, plantas e fungos (Ge et al., 2020).

240

Os óleos essenciais de *L. cubeba* e *C. flexuosus* apresentaram valores de IC₅₀ de 0,160 mg/ml; 0,214 mg/ml, respectivamente. Estes apresentam o mesmo constituinte majoritário, o citral. Este composto quando avaliado sobre ovos de *H. contortus* apresentou um valor alto de IC₅₀ 0,30 mg/mL (Sousa et al., 2021), comparado com os valores apresentados pelo óleo. Dessa forma, deve ser considerado, interações entre outros constituintes do óleo, com ações sinérgicas (Katiki et al., 2017).

246

O OE de *C. winterianus* teve IC₅₀ de 0,453 mg/ml, e o seu majoritário citronelal, pode ser o principal responsável por sua atividade anti-helmíntica. Este monoterpenóide quando avaliado sobre ovos de cepas suscetíveis de *H. contortus* obteve IC₅₀ de 0,3 mg/ml (Araújo-Filho et al., 2018). Contudo, vale ressaltar que em dosagens altas, esse constituinte se mostrou tóxico quando avaliado em camundongos (Araújo-Filho et al., 2019).

251

O gênero citrus são bem relatados por apresentar inúmeras atividades biológicas, incluindo suas aplicações medicinais e aromaterapeúticas (Dosoky et al., 2018). Apesar de *Citrus aurantium var amara* ter apresentado a maior IC₅₀ (3,319 mg/mL) no TEO, sua atividade foi melhor quando avaliado sobre o teste de desenvolvimento larval com uma IC₅₀ de 0,555 mg/mL. O óleo essencial de *C. aurantifolia* que, também, tem como principal componente o limoneno, apresentou melhor desempenho na inibição do desenvolvimento larval do que na

256

257 inibição da eclodibilidade de ovos (Ferreira et al., 2018). Assim, os mecanismos de ação desses
258 óleos e de seu principal constituinte, pode estar associado com a devida fase do parasito,
259 atuando melhor em larvas.

260 O óleo essencial de *L. cubeba* apresentou a melhor atividade na inibição do
261 desenvolvimento larval com IC₅₀ de 0,045 mg/mL. Seu bom desempenho pode estar associado
262 como inibição da permeabilidade da membrana celular e bloqueio do metabolismo respiratório,
263 o que impede a função normal do ácido nucléico (Dai et al., 2021). Em contraste, o óleo de *C.*
264 *camphora* apresentou a maior IC₅₀ (0,958 mg/mL) em TDL, assemelhando-se ao valor da IC₅₀
265 (0,972 mg/mL) para TEO. Com uma atividade exibida em dosagens altas, fica inviável sua
266 administração em teste *in vivo*. Devido a composição variável de componentes dos OEs, eles
267 podem ser altamente tóxicos para animais com doses muito altas (Lanzerstorfer et al., 2021).

268 Os OEs possuem a capacidade de interagir com os lipídeos da membrana, perturbando
269 a estrutura celular, facilitando a entrada e ação dos sintéticos (Sharma et al., 2020). A interação
270 entre o óleo de *C. flexuosus* e *C. winterianus* com o tiabendazol testado em ovos, apresentou o
271 maior índice de sinergismo (10.28; 9.50). A combinação de albendazol com monoterpenos
272 quando avaliados em ovos de *H. contortus*, demonstrou alterações estruturais, como aumento
273 da rugosidade da superfície do ovo (Silva et al., 2021). Desta forma, óleos essenciais e seus
274 principais constituintes induzem danos e lesões a estruturas dos ovos, facilitando a capacidade
275 do sintético em agir na polimerização dos microtúbulos, impedindo a falha na divisão celular
276 (Lima et al., 2010). Em relação às interações químicas da combinação, uma avaliação com
277 espectroscopia de infravermelho indicou uma forte interação entre compostos sintéticos com
278 monoterpenos (Silva et al., 2021).

279 A combinação de *C. aurantium* var. *amara* com Ivermectina foi a mais promissora
280 sinergicamente. O limoneno, que é o seu principal constituinte, aumentou a eficácia da
281 Ivermectina em isolados resistentes e sensíveis de *H. contortus* no teste de desenvolvimento
282 larval (Pacheco et al., 2022). Vermes adultos resistentes quando expostos à combinação de IVM
283 + limoneno, apresentou menor expressão de proteínas de transporte de transmembranas (PgP)
284 que livra as células de moléculas tóxicas, supondo que o limoneno pode modular esses genes
285 (Pacheco et al., 2022).

286 A combinação de *L. cubeba* + TBZ e *C. cassia* + TBZ, apresentaram atividade
287 antagônicas. Vale ressaltar que dentro da faixa de concentrações determinadas dosagens do
288 estudo, exibem escores de sinergismo. O mesmo acontece com as combinações de óleo de *C.*
289 *cassia* e *C. winterinaus* com Ivermectina, que exibiram uma média antagônica, mas

290 apresentaram doses de classificação sinérgicas. Com isto, fica evidente que algumas
291 combinações de drogas anti-helmínticas necessitam de concentrações efetivas para alcançar o
292 modo de ação no parasito, garantindo sua eficácia (Lifschitz et al., 2017).

293 A evidência de um forte antagonismo, também, foi relatada nas combinações de *C.*
294 *camphora*+TBZ e *E. caryophyllus* + TBZ. Os mecanismos responsáveis pelo antagonismo
295 entre essa combinação, são menos conhecidos e investigações devem ser realizadas. Sendo
296 assim, o que se pode hipotetizar é que os alvos das drogas acabam se sobrepondo, gerando uma
297 competição que influencia o efeito quando combinados (Ke et al., 2021). Além disso, as
298 combinações com efeitos altamente antagonistas podem ter produzido um produto inativo,
299 devido a interações químicas dos fármacos (Naish, 2018). Assim, os efeitos de uma determinada
300 combinação de compostos pode acabar alterando a atividade biológica de um dos componentes,
301 reduzindo a eficácia geral dos compostos em combinação (Caesar et al., 2019).

302 As combinações dos óleos de *C. flexuosus*, *E. caryophyllus* e *L. cubeba* com Ivermectina
303 também foram altamente antagônicas, e o escore sinérgico foi relativamente menor comparado
304 com Tiabendazol. A ivermectina atua como um modulador alostérico positivo, abrindo
305 seletivamente canais iônicos inibitórios de cloreto, controlados por glutamato nas membranas
306 de músculos faríngeos e nervos motores (Martin et al., 2021). Aliado a isso, recentemente foi
307 descoberto que terpenos atuam como moduladores alostéricos negativos em receptores
308 nicotínicos sensíveis ao levamisol, diminuindo a frequência de eventos de abertura (Hernando
309 et al., 2019). Dessa forma, as duas drogas atuam em diferentes receptores, exercendo ações
310 opostas, o que caracteriza um antagonismo fisiológico (Waller et al, 2021). Além do mais, se a
311 atividade for no mesmo receptor, deve levar considerar o princípio da exclusividade mútua
312 (apenas 1 ligante pode ocupar o receptor por vez). Com isto a atividade pode ser reduzida devido
313 a competitividade dos fármacos por um receptor.

314

315 5. CONCLUSÃO

316 Em conclusão, todos os óleos essenciais apresentaram eficácia sobre ovos e larvas de
317 *H. contortus*. Ademais, as combinações com sintéticos exibiu classificações sinérgicas e
318 também antagônicas. Quanto à atividade de eclosão de ovos, os óleos de *C. winterinaus* e *C.*
319 *flexuosus* em combinação com tiabendazol, apresentaram os melhores índices sinérgicos. No
320 que diz respeito ao desenvolvimento larval, apenas o óleo de *C. aurantium var amara* em
321 combinação com Ivermectina, demonstrou sinergismo. Nossos resultados fornecem evidências

322 promissoras da atividade anti-helmíntica de óleos essenciais, que pode ser usada em terapia
323 combinada com drogas sintéticas como tiabendazol e ivermectina, aumentando sua eficácia. O
324 devido uso desses compostos naturais em combinação apresentam doses efetivas menores,
325 evitando a toxicidade. Além disso, a complexidade dos mecanismos de ação, controla o
326 surgimento de populações resistentes do parasito. Futuros estudos devem ser realizados
327 avaliando formulações adequadas para investigar sua eficácia *in vivo*, comprovando sua
328 viabilidade para o controle de nematódeos gastrintestinais.

329

6. REFERÊNCIAS

- 331 Abd Rashed, A., Gunasegavan R. D.-N., Nasir, N. A. H. A., Rahman, A. Z. A. R. 2021.
332 Antifungal properties of essential oils and their compounds for application in fungal skin
333 infections: Conventional and unconventional approaches. *Molecules*. 26 (4), 1093.
334 <https://doi.org/10.3390/molecules26041093>
- 335 Ali-Shtayeh, M., Jamous, R., Abu-Zaitoun, S., 2019. Biological properties and bioactive
336 components of *Mentha spicata L.* Essential oil: focus on potential benefits in the
337 treatment of obesity, alzheimer's disease. *Evidence-based Complementary and*
338 *Alternative Medicine*, (2019) 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3834265>
- 339 Álvarez-Martínez, F., Barraji n-Catalán, E., 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and
340 essential oils: an updated review of their effects and supposed mechanisms of action.
341 *Phytomedicine*. 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>
- 342 Araújo-Filho, J. de, Ribeiro, W., André, W., 2018. Effects of eucalyptus citriodora essential
343 oil and its main component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible
344 and resistant to. *Industrial Crops and Products*. 124, 294-299.
345 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.059>
- 346 Araújo-Filho, J., W.L.C. Ribeiro, W.P.P. André, G.S. Cavalcante, T.T. Rios, G.M.
347 Schwinden, L.O. Rocha, I.T.F. Macedo, S.M. Morais, C.M.L. Bevilaqua, L.M.B.
348 Oliveira. 2019. Anthelmintic activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its main
349 component, citronellal, in gastrointestinal nematodes of sheep. *Revista Brasileira de*
350 *Parasitologia Veterin ria*, 28, 644-651. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019090>
- 351 Aumeeruddy-Elalfi, Z., Lall, N., Fibrich, B., 2018. Selected essential oils instill the main
352 physiological enzymes and have intracellular and extracellular antimelanogenic
353 properties *in vitro*. *Journal of food and drug analysis*, 26(1), 232-243.
354 <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.03.002>
- 355 Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., van Wyk, J.A. 2016. Chapter Four - The
356 Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus*. *Infection in*
357 *Small Ruminants*, in: Gasser, R.B., Samson-Himmelstjerna, G. von (Eds.), *Haemonchus*
358 *Contortus* and Hemonose. *Advances in Parasitology*. 93, 95–143.
359 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>
- 360 Caesar, L. K., Cech, N. B. 2019. Synergy and antagonism in natural product extracts: when
361 1+ 1 does not equal 2. *Natural product reports*, 36(6), 869-888. 10.1039/C9NP00011A.

362 Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller,
363 P. J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology
364 (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of
365 veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 44(1-2), 35-44.
366 [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)

367 Dai, J., Li, C., Cui, H., & Lin, L. 2021. Unraveling the anti-bacterial mechanism of *Litsea*
368 *cubeba* essential oil against *E. coli* O157: H7 and its application in vegetable
369 juices. *International Journal of Food Microbiology*, 338, 108989.
370 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108989>

371 Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., von Samson-
372 Himmelstjerna, G. 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the
373 detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of
374 ruminants. *Veterinary Parasitology*, 174(1-2), 58-64.
375 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.020>

376 Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. 2018. Biological activities and safety of *Citrus spp.* essential
377 oils. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1966.
378 <https://doi.org/10.3390/ijms19071966>

379 Ferreira, L.E., Benincasa, B.I., Fachin, A.L., Contini, S.H.T., França, S.C., Chagas, A.C.S.,
380 Beleboni, R.O. 2018. Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and
381 *Lavandula officinalis*: *in vitro* anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*.
382 *Parasitic Vectors*. 11, 269. <https://doi.org/10.1186/S13071-018-2849-X>

383 Fissiha, W., & Kinde, M. Z. 2021. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A
384 Review. *Infection and Drug Resistance*, 14, 5403. [10.2147/IDR.S332378](https://doi.org/10.2147/IDR.S332378)

385 Fu, J., Zhang, N., Chou, J. H., Dong, H. J., Lin, S. F., Ulrich-Merzenich, G. S., Chou, T. C.
386 2016. Drug combination *in vivo* using combination index method: Taxotere and T607
387 against colon carcinoma HCT-116 xenograft tumor in nude mice. *Synergy*, 3(3), 15-30.
388 <https://doi.org/10.1016/j.synres.2016.06.001>

389 Ge, D., Wei, Z., Tursunay, T., Pan, Y., Wang, F., 2020. Inhibiting effect of eugenol on
390 *Alternaria sp.* isolated from blueberry. *Shipin Kexue/Food Science*, 41(19), 68-73.
391 [10.7506/spkx1002-6630-20190909-112](https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20190909-112)

392 Gong, S., Meng, Q., Qiao, J., Huang, Y., Zhong, W., 2022. Biological Characteristics of
393 Recombinant *Arthrobotrys oligospora* Chitinase AO-801. *The Korean Journal of*
394 *Parasitology*, 60(5), 345-352. <https://doi.org/10.3347/kjp.2022.60.5.345>

395 Herath, H. D., Taki, A. C., Sleebs, B. E., Hofmann, A., Nguyen, N., Preston, S., Gasser, R. B.
396 2021. Advances in the discovery and development of anthelmintics by harnessing natural
397 product scaffolds. *Advances in Parasitology*, 111, 203-251.
398 <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.10.002>

399 Hernando, G., Turani, O., Bouzat, C., 2019. Cys-loop receptors of the *Caenorhabditis elegans*
400 muscle as new targets of terpenoids with potential anthelmintic activity. *PLoS neglected*
401 *tropical diseases*, 13(11), e0007895. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007895>

402 Katiki, L. M., Barbieri, A. M. E., Araujo, R. C., Veríssimo, C. J., Louvandini, H., Ferreira, J.
403 F. S. 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in*
404 *vitro*. *Veterinary Parasitology*, 243, 47-51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.008>

405 Katiki, L., Evangelista, A., Canova, E., Piza, A., Fornazari, B., Araujo, R., Louvandini, H.,
406 Amarante, A., Costa, R., Bueno, M., Lima, J., Verissimo, C., 2014. Anthelmintic activity
407 of anethol, carvone, carvacrol, thimol, linalool, limonen, eucalyptus, vanillin,
408 cinnamaldehyde and eugenol in *in vitro* tests. *Planta Medica*, 80 (16), P1L14.
409 <https://doi.org/10.1055/S-0034-1394672>

410 Ke, J., Li, M., Huo, Y., Cheng, Y., Guo, S., 2021. The synergistic effect of *Ginkgo biloba* 50
411 extract and aspirin against platelet aggregation. *Drug Design, Development and*
412 *Therapy*, 15, 3543. [10.2147/DDDT.S318515](https://doi.org/10.2147/DDDT.S318515)

413 Kotze, A. C., Hunt, P. W., Skuce, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Martin, R. J., Sager, H.,
414 Prichard, R. K. 2014. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches
415 to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor
416 interactions. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3),
417 164-184.

418 Lanusse, C., Canton, C., Virkel, G., Alvarez, L., 2018. Strategies to optimize the efficacy of
419 anthelmintics in ruminants. *Trends in parasitology*, 34(8), 664-682.
420 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.05.005>

421 Lanzerstorfer, P., Sandner, G., Pitsch, J., Mascher, B., Aumiller, T., Weghuber, J., 2021.
422 Acute, reproductive and developmental toxicity of essential oils evaluated with
423 alternative systems *in vitro* and *in vivo*. *Arch Toxicol.*95, 673–691.
424 <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02945-6>

425 Lifschitz, A., Lanusse, C., Alvarez, L., 2017. Host pharmacokinetics and accumulation of
426 anthelmintic drugs within helminth parasites targeted by ruminants. *New Zealand*
427 *Veterinary Journal*, 65(4), 176-184. <https://doi.org/10.1080/00480169.2017.1317222>

428 Lima, W. C., Athayde, A. C., Medeiros, G. R., Lima, D. A., Borburema, J. B., Santos, E. M.,
429 Azevedo, S. S. 2010. Nematode resistant to some anthelmintics in dairy goats in Cariri
430 Paraibano, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30, 1003-1009.

431 Malyutina, A., Majumder, M.M., Wang, W., Pessia, A., Heckman, C.A., Tang, J. 2019. The
432 sensitivity score of the combination of drugs facilitates the discovery of synergistic and
433 effective combinations of drugs in cancer. *PLoS computational biology*, 15(5),
434 e1006752. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1006752>

435 Martin, R. J., Robertson, A. P., & Choudhary, S. 2021. Ivermectin: an anthelmintic, an
436 insecticide, and much more. *Trends in parasitology*, 37(1), 48-64.
437 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.10.005>

438 Waller, D. G., Sampson, A., & Hitchings, A. 2021. *Medical pharmacology and therapeutics*
439 E-Book. Elsevier Health Sciences. Acesso em: 06/12/2022.

440 Moreno, Y., Geary, T. G., & Tritten, L. 2021. When secretomes meet anthelmintics: lessons
441 for therapeutic interventions. *Trends in Parasitology*, 37(6), 468-475.
442 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.01.007>

443 Naish, J. (Ed.). 2018. *Medical sciences*. Elsevier Health Sciences. Acesso em: 06/12/2022

444 Ni, Z., Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J. 2021. Recent updates on chemistry,
445 bioactivities, mode of action and industrial applications of plant essential oils. *Trends in*
446 *Food Science & Technology*, 110, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.070>

447 OuYang, Q., Duan, X., Li, L., Tao, N. 2019. Cinnamaldehyde exerts its antifungal activity by
448 disrupting the integrity of the cell wall of *Geotrichum citri-aurantii*. *Frontiers in*
449 *Microbiology*, 10, 55. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00055/FULL>

450 Pacheco, P. A., Louvandini, H., Giglioti, R., Wedy, B. C. R., Ribeiro, J. C., Verissimo, C. J.,
451 Katiki, L. M. 2022. Phytochemical modulation of P-Glycoprotein and its gene
452 expression in an ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* isolate in vitro. *Veterinary*
453 *Parasitology*, 305, 109713. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109713>

454 Potârniche, A.V., Mickiewicz, M., Olah, D., Cerbu, C., Spînu, M., Hari, A., Györke, A.,
455 Moroz, A., Czopowicz, M., Várady, M., Kaba, J. 2021. First report of anthelmintic
456 resistance in gastrointestinal nematodes in goats in Romania. *Animals*, 11(10), 2761.
457 <https://doi.org/10.3390/ani11102761>

458 Salle, G., Doyle, S. R., Cortet, J., Cabaret, J., Berriman, M., Holroyd, N., Cotton, J. A. 2019.
459 The global diversity of *Haemonchus contortus* is shaped by human intervention and

460 climate. Nature communications, 10 (1), 1-14. [https://doi.org/10.1038/s41467-019-](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12695-4)
461 12695-4

462 Selemon, M. 2018. Review on control of *Haemonchus contortus* in sheep and goat. Journal of
463 Veterinary Medicine and Research. Acesso em: 06/12/2022.

464 Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Iriti, M.
465 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional
466 healing systems. Molecules, 22(1), 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>

467 Sharma, K., Guleria, S., Razdan, V. K., & Babu, V. 2020. Synergistic antioxidant and
468 antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination
469 and with synthetic compounds. Industrial Crops and Products, 154, 112569.
470 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112569>

471 Sharma, M., Grewal, K., Jandrotia, R., Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K. 2022.
472 Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery
473 mechanisms, and immune system enhancement. Biomedicine & Pharmacotherapy, 146,
474 112514. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112514>

475 Silva, C. R., Lifschitz, A. L., Macedo, S. R., Campos, N. R., Viana-Filho, M., Alcântara, A.
476 C., Costa-Junior, L. M. 2021. Combination of synthetic anthelmintics and monoterpenes:
477 Assessment of efficacy, and ultrastructural and biophysical properties of *Haemonchus*
478 *contortus* using atomic force microscopy. Veterinary Parasitology, 290, 109345.
479 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109345>

480 Son, D. S, Lee, E. S and Adunyah, S. 2020. The antitumor potentials of benzimidazole
481 anthelmintics as reuse drugs. Immune network , 20 (4). 10.4110/in.2020.20.e29

482 Sousa, A. I. P., Silva, C. R., Costa-Júnior, H. N., Silva, N. C. S., Pinto, J. A. O., Blank, A. F.,
483 Costa-Júnior, L. M. 2021. Essential oils from *Ocimum basilicum* cultivars: analysis of
484 their composition and determination of the effect of the major compounds on
485 *Haemonchus contortus* eggs. Journal of Helminthology, 95.
486 <https://doi.org/10.1017/S0022149X21000080>

487 Zheng, S., Wang, W., Aldahdooh, J., Malyutina, A., Shadbahr, T., Tanoli, Z., Tang, J. 2022.
488 SynergyFinder plus: toward better interpretation and annotation of drug combination
489 screening datasets. Genomics, Proteomics & Bioinformatics.
490 <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.01.004>

Composto	RI ^a	Composição do óleo						
		<i>C. cassia</i>	<i>E. caryophyllus</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. winterinaus</i>	<i>C. camphora</i>	<i>C. aurantium var amara</i>
Benzaldeído	6.494	7.47	-	-	-	-	-	-
Anisalaldeído	17.42	1.77	-	-	-	-	-	-
Cinamalaldeído	18.543	57.02	-	-	-	-	-	-
Cumarina	25.274	4.79	-	-	-	-	-	-
Acetato de cinamil	25.687	8.37	-	-	-	-	-	-
Ácido cinâmico	25.995	7.57	-	-	-	-	-	-
2-Metoxicinamalaldeído	29.121	4.78	-	-	-	-	-	-
Hexan-2-one	3.067	0.04	0.03	-	0.04	0.02	-	0.07
Hexan-3-ol	3.126	0.02	0.02	-	-	0.02	-	-
Sabinene	6.903	0.05	0.04	0.27	0.13	0.05	4.85	0.38
n-decano	7.637	0.02	-	0.07	0.25	0.10	0.02	-
p-cimene	8.492	0.03	-	0.74	-	-	12.88	0.15
Acetofenona	10.140	0.62	-	-	-	-	-	-
Benzilformato	10.362	0.05	-	-	-	-	-	-
orto-guaiacol	10.826	0.38	-	-	-	-	-	-
Álcool fenetílico	11.755	0.11	-	-	-	-	-	-
Hidrocinaideído	13.760	0.16	-	-	-	-	-	-
Benzoato de etila	14.243	0.71	-	-	-	-	-	-
Fenil formato	14.327	0.74	-	-	-	-	-	-
Formato de isobornila	16.578	0.11	-	-	-	-	-	-
Ácido fenilacético	17.733	0.13	-	-	-	-	-	-
Acetato de feniletil	17.787	0.19	-	-	-	-	-	-
orto-acetanisole	19.337	0.04	-	-	-	-	-	-
Ciclosativeno	22.465	0.03	-	-	-	-	-	-
Ácido-o-anísico	27.141	0.06	-	-	-	-	-	-
Benzoato de benzila	37.789	0.16	-	-	-	-	-	-

Tabela 1. Cont.

Composto	RI ^a	Composição do óleo						
		<i>C. cassia</i>	<i>E. caryophyllus</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. winterinaus</i>	<i>C. camphora</i>	<i>C. aurantium var amara</i>
Benzoato de fenetil	40.874	0.09	-	-	-	-	-	-
Fenetil cinamato	51.040	0.36	-	-	-	-	-	-
Estragole	15.328	-	0.04	-	-	-	-	-
Chavicol	17.697	-	0.11	-	-	-	-	-
Eugenol	22.426	-	82.94	-	-	0.47	-	-
dihidroeuugenol	22.630	-	0.04	-	-	-	-	-
α -copaeno	22.979	-	0.08	-	-	-	-	-
Vanilina	23.775	-	0.15	-	-	-	-	-
Metileugenol	24.104	-	0.08	-	-	-	-	-
β -longipipeno	24.248	-	0.08	-	-	-	-	-
β -isocomeno	24.483	-	0.40	-	-	-	-	-
(E)-cariofileno	24.795	-	9.63	-	-	0.16	-	-
γ -elemeno	25.235	-	0.49	-	-	-	-	-
α -guaiano	25.642	-	0.09	-	-	-	-	-
α -humuleno	26.145	-	2.25	-	-	0.11	-	-
Aromadendreno	26.245	-	0.12	-	-	-	-	-
α -muruuleno	28.025	-	0.05	-	-	0.59	-	-
óxido de cariofileno	31.237	-	1.37	1.49	2.72	-	-	-
Humuleno epóxido II	32.233	-	0.18	-	0.23	-	-	-
Triciclono	5.547	-	-	0.12	0.29	-	0.02	-
α -pineno	5.833	-	-	0.85	0.26	0.02	8.54	0.45
Campheno	6.238	-	-	0.68	2.63	-	0.96	-
β -pineno	7.028	-	-	1.16	-	0.05	2.19	-
Sulcatona	7.221	-	-	3.04	1.15	0.05	0.10	-
Limoneno	8.659	-	-	-	0.33	2.98	19.79	56.81
1,8 cineol	8.744	-	-	4.16	-	-	37.66	-
Isoamil-piruvato	9.469	-	-	0.14	-	-	-	-

Tabela 1. Cont.

Composto	RT ^a	Composição do óleo						
		<i>C. cassia</i>	<i>E. caryophyllus</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. winterinaus</i>	<i>C. camphora</i>	<i>C. aurantium var amara</i>
Óxido de linalol cis-furanóide	10.213	-	-	1.25	-	-	-	0.11
Óxido de linalol trans-furanóide	10.807	-	-	1.17	0.35	-	-	0.07
Linalool	11.236	-	-	1.48	0.99	0.68	-	0.31
trans-2,8-p-menthadien-2-ol	12.074	-	-	0.22	-	-	-	-
cis-2,8-p-menthadien-2-ol	12.659	-	-	0.11	-	-	-	-
α -campholenal	12.315	-	-	0.11	-	-	0.10	-
cis- β -terpineol	13.062	-	-	0.14	-	-	-	-
Citronellal	13.400	-	-	0.16	-	-	-	-
Óxido de linalol cis-piranoide	14.075	-	-	0.22	-	-	-	-
Óxido de linalol trans-piranoide	14.276	-	-	0.20	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	14.440	-	-	0.11	-	-	-	-
α -terpineol	14.994	-	-	0.30	0.13	0.05	-	-
Citronellol	16.589	-	-	0.29	-	11.53	-	-
Neral	17.125	-	-	12.75	21.85	0.28	-	-
Carvona	17.242	-	-	0.58	-	-	-	5.31
Piperitona	17.676	-	-	0.92	-	-	-	-
Geranial	18.403	-	-	19.48	36.78	0.69	-	-
formato de citronelila	18.614	-	-	0.11	-	0.04	-	-
Ácido nerânico	20.693	-	-	0.57	0.23	-	-	-
Ácido gerânico	22.249	-	-	7.18	2.29	-	-	-
4-heptanona	4.357	-	-	-	0.04	-	-	-
n-octanal	7.735	-	-	-	0.09	-	-	0.14

Tabela 1. Cont.

Composto	RI ^a	Composição do óleo						
		<i>C. cassia</i>	<i>E. caryophyllus</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. winterinaus</i>	<i>C. camphora</i>	<i>C. aurantium var amara</i>
4-nonanona	10.182	-	-	-	3.49	-	-	-
Borneol	13.960	-	-	-	0.24	-	-	-
(E)-isocitral	14.644	-	-	-	0.12	-	-	-
Geraniol	17.716	-	-	-	4.40	22.04	-	-
formato de geranila	19.770	-	-	-	0.79	0.08	-	-
Ciclosativeno	22.572	-	-	-	0.14	-	-	-
Acetato de geranila	23.219	-	-	-	3.91	4.78	-	-
β -bourbonene	23.320	-	-	-	0.10	-	-	-
cubebol	27.777	-	-	-	0.17	0.14	-	-
γ -cadineno	28.564	-	-	-	2.68	0.65	-	-
butanoato de geranilo	30.339	-	-	-	0.19	-	-	-
Mirceno	7.372	-	-	-	-	0.03	0.95	0.10
Bergamal	9.484	-	-	-	-	0.21	-	-
Isopulegol	13.095	-	-	-	-	1.8	-	-
Formato de citronelila	18.606	-	-	-	-	0.04	-	-
Ácido citronelico	20.326	-	-	-	-	0.28	-	-
neo-mentol-8-hydroxy	21.014	-	-	-	-	0.09	-	-
Acetato de citronelila	21.930	-	-	-	-	3.51	-	-
β -elemeno	23.601	-	-	-	-	3.74	-	-
γ -muuroleno	27.045	-	-	-	-	0.23	-	-
Germacreno D	27.224	-	-	-	-	1.21	-	-
β -selineno	27.426	-	-	-	-	0.08	-	-
Germacreno A	28.188	-	-	-	-	0.10	-	-
Δ -candineno	28.920	-	-	-	-	2.02	-	-
α -candineno	29.458	-	-	-	-	0.12	-	-
Elemol	29.929	-	-	-	-	5.44	-	-
Germacreno D-4-ol	30.924	-	-	-	-	0.68	-	-
(Z)-Sesquilavandulol	32.496	-	-	-	-	0.15	-	-

Tabela 1. Cont.

Composto	RI ^a	Composição do óleo						
		<i>C. cassia</i>	<i>E. caryophyllus</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. winterinaus</i>	<i>C. camphora</i>	<i>C. aurantium var amara</i>
γ -eudesmol	33.053	-	-	-	-	0.37	-	-
α -epi-muurolol	33.435	-	-	-	-	0.60	-	-
α -muurolol	33.593	-	-	-	-	0.07	-	-
β -eudesmol	33.732	-	-	-	-	0.44	-	-
Cadin-4-en-10-ol	33.896	-	-	-	-	1.04	-	-
(2Z,6E)-Farnesol	36.336	-	-	-	-	0.05	-	-
α -tujeno	5.627	-	-	-	-	-	0.21	-
α -fencheno	6.195	-	-	-	-	-	0.11	-
Heptan-2-ol	6.300	-	-	-	-	-	0.21	-
cis-pineno	7.117	-	-	-	-	-	0.02	-
Δ -2-careno	7.725	-	-	-	-	-	0.05	-
cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	7.820	-	-	-	-	-	0.03	0.16
1,4 cineol	8.179	-	-	-	-	-	0.44	-
Isobutirato de prenila	9.477	-	-	-	-	-	0.03	-
Fenchone	10.822	-	-	-	-	-	0.03	-
Epoximirceno	10.971	-	-	-	-	-	0.03	-
α -óxido-pineno	11.221	-	-	-	-	-	0.22	-
Perileno	11.304	-	-	-	-	-	0.04	-
trans-2,8-p-menthenediol	12.072	-	-	-	-	-	0.17	0.86
cis-óxido-limoneno	12.597	-	-	-	-	-	0.76	1.07
trans-óxido-limoneno	12.781	-	-	-	-	-	0.46	3.06
trans-verbenol	13.068	-	-	-	-	-	0.17	-
Sabinacetona	13.579	-	-	-	-	-	0.05	-
Pinocarvona	13.807	-	-	-	-	-	0.14	-
Criptona	14.766	-	-	-	-	-	0.55	-
Mirtenal	15.222	-	-	-	-	-	0.28	-

Tabela 1. Cont.

Composto	RI ^a	Composição do óleo						
		<i>C. cassia</i>	<i>E. caryophyllus</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. winterinaus</i>	<i>C. camphora</i>	<i>C. aurantium var amara</i>
Verbenona	15.755	-	-	-	-	-	0.14	-
trans-carveol	16.171	-	-	-	-	-	0.35	-
cis-carveol	16.672	-	-	-	-	-	0.09	1.09
cuminaldeído	17.053	-	-	-	-	-	0.13	-
trans-ascaridolglicol	18.295	-	-	-	-	-	0.20	-
p-cimen-7-ol	19.237	-	-	-	-	-	0.09	-
trans-p-menth-6-em-2,8-diol	2.904	-	-	-	-	-	0.12	-
Limona cetona	12.493	-	-	-	-	-	-	0.08
cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	12.650	-	-	-	-	-	-	0.54
Nonanol	14.156	-	-	-	-	-	-	0.06
acetofenona	14.695	-	-	-	-	-	-	0.13
cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	16.555	-	-	-	-	-	-	0.16
Perilaldeído	18.526	-	-	-	-	-	-	0.25
trans-óxido-carvona	18.708	-	-	-	-	-	-	0.50
Limonen-10-ol	19.230	-	-	-	-	-	-	0.09
Álcool perfílico	19.590	-	-	-	-	-	-	0.46
Isoascaridole	19.850	-	-	-	-	-	-	0.03
NI ^b	60.661	4.05	1.76	27.81	13	0.98	6.19	23.04
Total		100	100	100	100	100	100	100

493 a Índice de retenção linear. b. Compostos não identificados.

494 **Tabela 2.** A média e o desvio padrão das concentrações de inibição necessárias para atingir
 495 50% (IC₅₀) da eclosão dos ovos de *H. contortus*, com respectivos intervalos de confiança de
 496 95% (IC95%).

Óleos Essenciais	IC ₅₀ ±SD (mg/mL)	IC95%	R ²
<i>C. cassia</i>	0,046±0,025 ^{aA}	0,042-0,050	0,97
<i>E. caryophyllus</i>	0,060±0,019 ^{aA}	0,054-0,064	0,97
<i>L. cubeba</i>	0,160±0,008 ^{aA}	0,145-0,177	0,98
<i>C. flexuosus</i>	0,214±0,007 ^{aA}	0,195-0,236	0,98
<i>C. winterianus</i>	0,453±0,005 ^{aA}	1,071-0,480	0,99
<i>C. camphora</i>	0,972±0,014 ^{aA}	0,865-1,098	0,98
<i>C. aurantium var amara</i>	3,319±0,005 ^{bB}	3,117-3,538	0,98
Sintético	IC ₅₀ ±SD (ug/mL)	IC95%	R ²
Tiabendazol	0,73±0,094 ^A	0,630-0,880	0,91

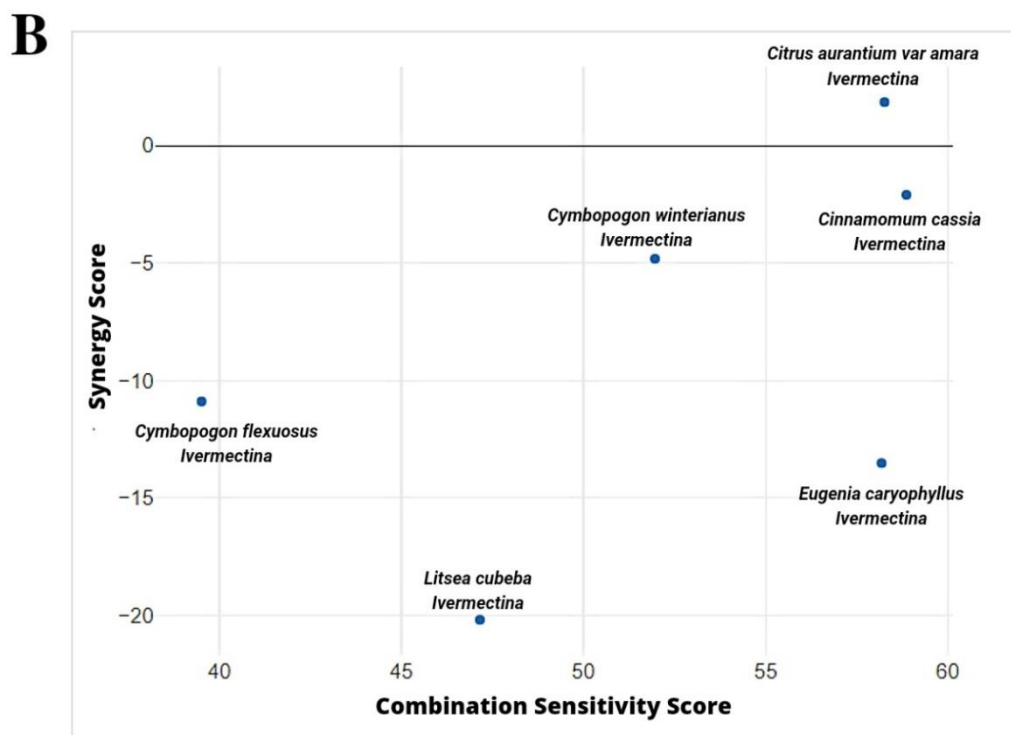
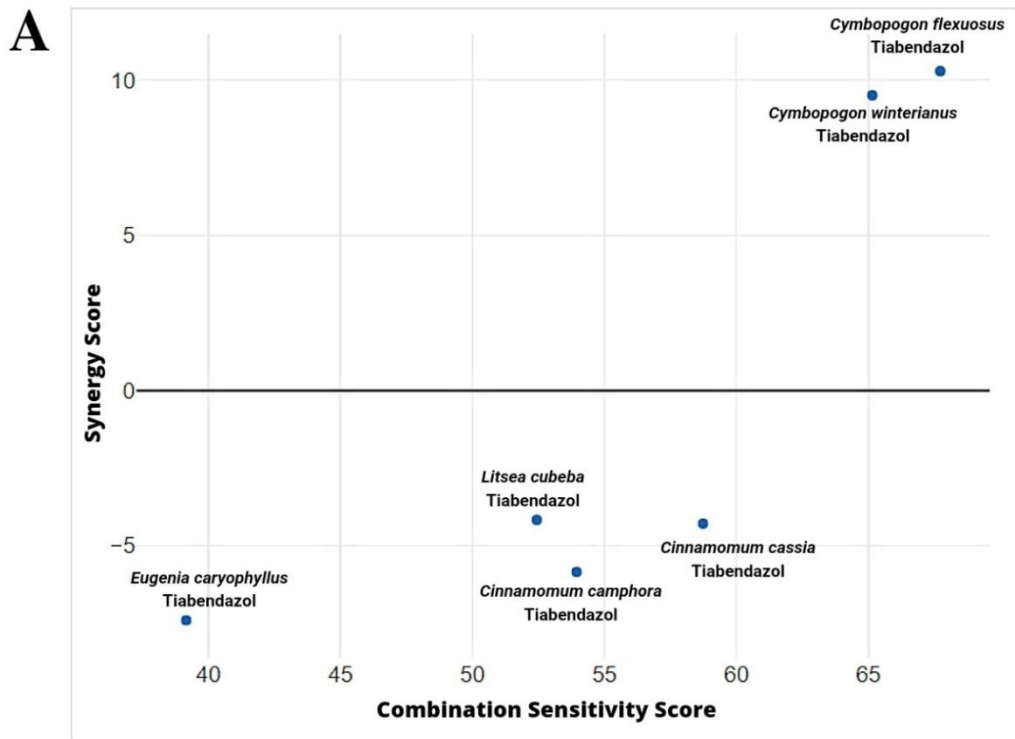
497 R² = coeficiente de regressão. O valor de R² quantifica a qualidade do ajuste não-linear da
 498 curva de regressão realizada para estimar a IC₅₀. Valores com letras minúsculas diferentes são
 499 significativamente distintos entre os óleos e com letras maiúsculas entre o sintético.

500

501 **Tabela 3.** A média e o desvio padrão das concentrações de inibição necessárias para atingir
 502 50% (IC₅₀) do desenvolvimento larval de *H. contortus*, com respectivos intervalos de confiança
 503 de 95% (IC95%).

Óleos Essenciais	IC ₅₀ ±SD (mg/mL)	IC95%	R ²
Ivermectina	2,432e ⁻⁶ ±0,053 ^A	2,174e ⁻⁶ -2,731e ⁻⁶	0,96
<i>C. cassia</i>	0,054±0,003 ^{aA}	0,049-0,060	0,98
<i>E. caryophyllus</i>	0,164±0,029 ^{abA}	0,149-0,180	0,96
<i>L. cubeba</i>	0,045±0,003 ^{aA}	0,040-0,050	0,98
<i>C. flexuosus</i>	0,100±0,002 ^{aA}	0,092-0,108	0,99
<i>C. winterianus</i>	0,609±0,006 ^{abA}	0,545-0,680	0,98
<i>C. camphora</i>	0,958±0,004 ^{bB}	0,885-1,037	0,98
<i>C. aurantium var amara</i>	0,554±0,006 ^{abA}	0,515-0,597	0,99
Sintético	IC ₅₀ ±SD (ng/mL)	IC95%	R ²
Ivermectina	2,432±0,053 ^A	2,174-2,731	0,96

504 R² = coeficiente de regressão. O valor de R² quantifica a qualidade do ajuste não-linear da
 505 curva de regressão realizada para estimar a IC₅₀. Valores com letras minúsculas diferentes são
 506 significativamente distintos entre os óleos e com letras maiúsculas entre o sintético.



507 **Figura 1.** Mapa de sensibilidade de sinergismo. (A) Combinação de óleos essenciais com
 508 Tiabendazol. (B) Combinação de óleos essenciais com Ivermectina. O modelo de referência
 509 utilizada é de aditividade de Loewe.
 510

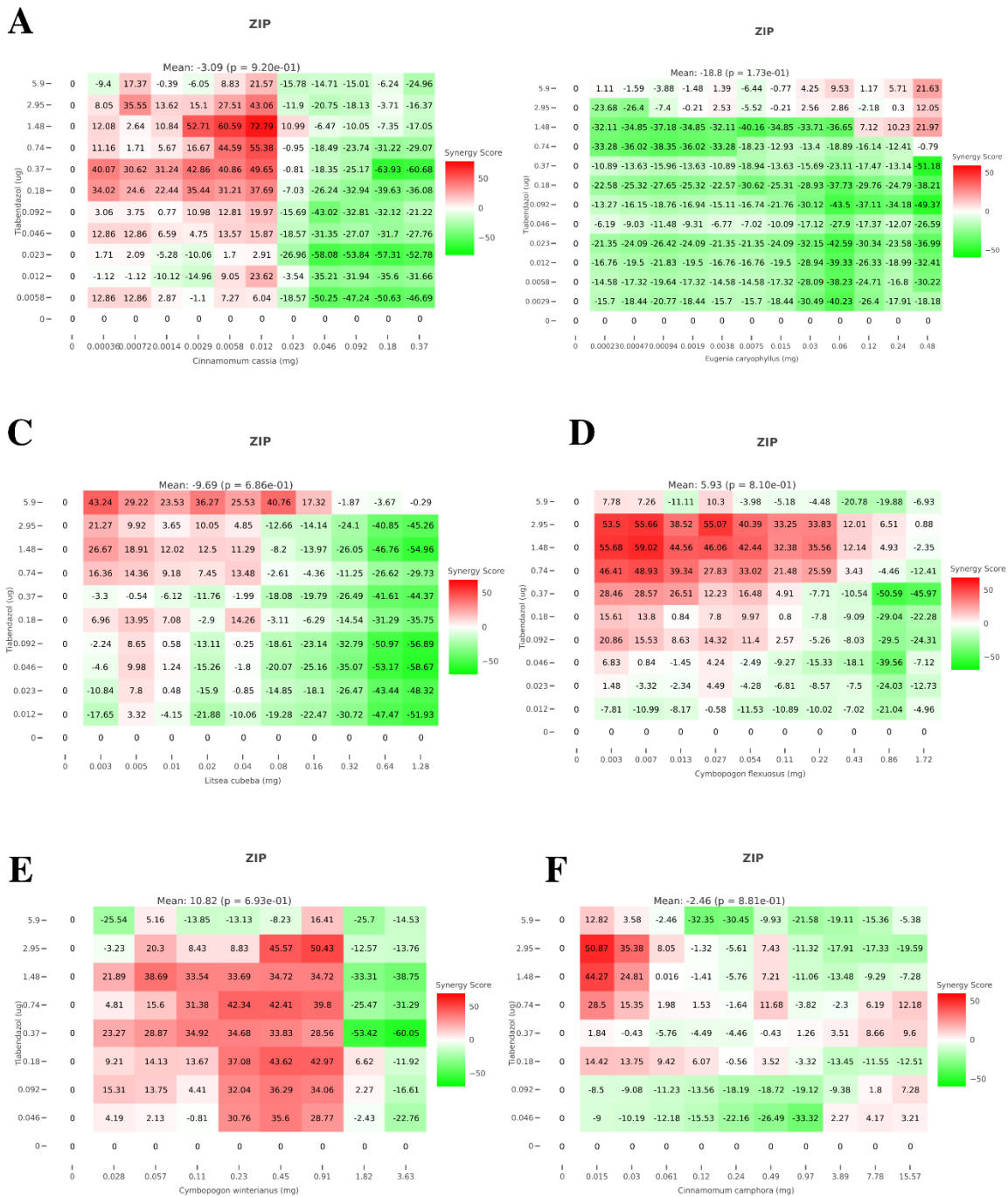
7. MATERIAL SUPLEMENTAR



512

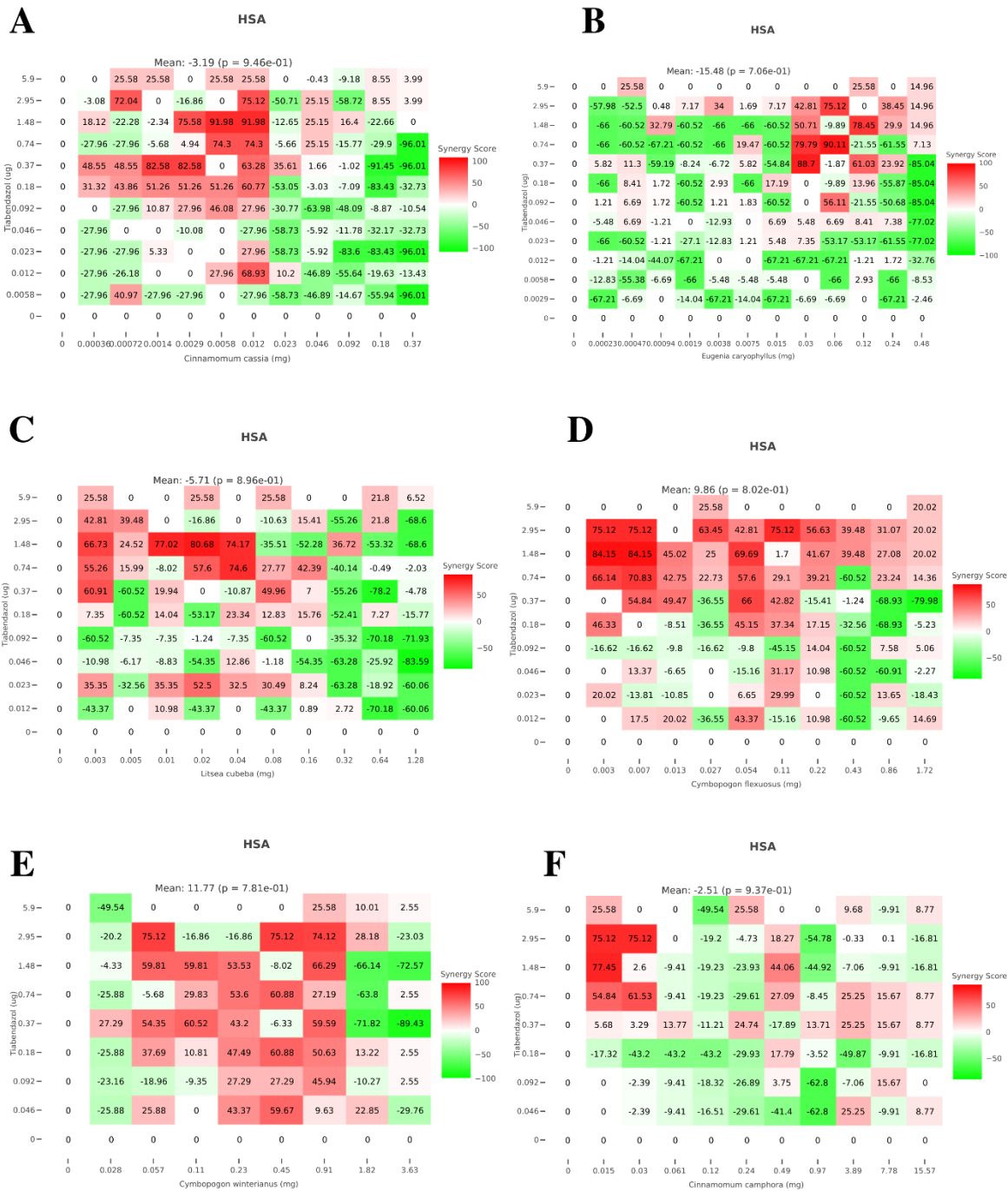
513 **Figura Sup. 1.** Mapa de calor com pontuações de sinergismo de acordo com Loewe. **(A)**514 Combinação de *C. cassia* com Tiabendazol. **(B)** Combinação de *E. caryophyllus* com515 Tiabendazol. **(C)** Combinação de *L. cubeba* com Tiabendazol. **(D)** Combinação de *C.*516 *flexuosus* com Tiabendazol. **(E)** Combinação de *C. winterianus* com Tiabendazol. **(F)**517 Combinação de *C. camphora* com Tiabendazol. A cor vermelha indica sinergismo e a verde

518 antagonismo.



519

520 **Figura Sup. 2.** Mapa de calor com pontuações de sinergismo de acordo com potência de
 521 interação zero (ZIP). **(A)** Combinação de *C. cassia* com Tiabendazol. **(B)** Combinação de *E.*
 522 *caryophyllus* com Tiabendazol. **(C)** Combinação de *L. cubeba* com Tiabendazol. **(D)**
 523 Combinação de *C. flexuosus* com Tiabendazol. **(E)** Combinação de *C. winterianus* com
 524 Tiabendazol. **(F)** Combinação de *C. camphora* com Tiabendazol. A cor vermelha indica
 525 sinergismo e a verde antagonismo.



528 **Figura Sup. 3.** Mapa de calor com pontuações de sinergismo de acordo com agente único
 529 mais alto (HSA). (A) Combinação de *C. cassia* com Tiabendazol. (B) Combinação de *E.*
 530 *caryophyllus* com Tiabendazol. (C) Combinação de *L. cubeba* com Tiabendazol. (D)
 531 Combinação de *C. flexuosus* com Tiabendazol. (E) Combinação de *C. winterianus* com
 532 Tiabendazol. (F) Combinação de *C. camphora* com Tiabendazol. A cor vermelha indica
 533 sinergismo e a verde antagonismo.



534

535 **Figura Sup. 4.** Mapa de calor com pontuações de sinergismo de acordo com definição de
 536 independência (Bliss). **(A)** Combinação de *C. cassia* com Tiabendazol. **(B)** Combinação de *E.*
 537 *caryophyllus* com Tiabendazol. **(C)** Combinação de *L. cubeba* com Tiabendazol. **(D)**
 538 Combinação de *C. flexuosus* com Tiabendazol. **(E)** Combinação de *C. winterianus* com
 539 Tiabendazol. **(F)** Combinação de *C. camphora* com Tiabendazol. A cor vermelha indica
 540 sinergismo e a verde antagonismo.



541

542 **Figura Sup. 5.** Mapa de calor com pontuações de sinergismo de acordo com Loewe. **(A)**

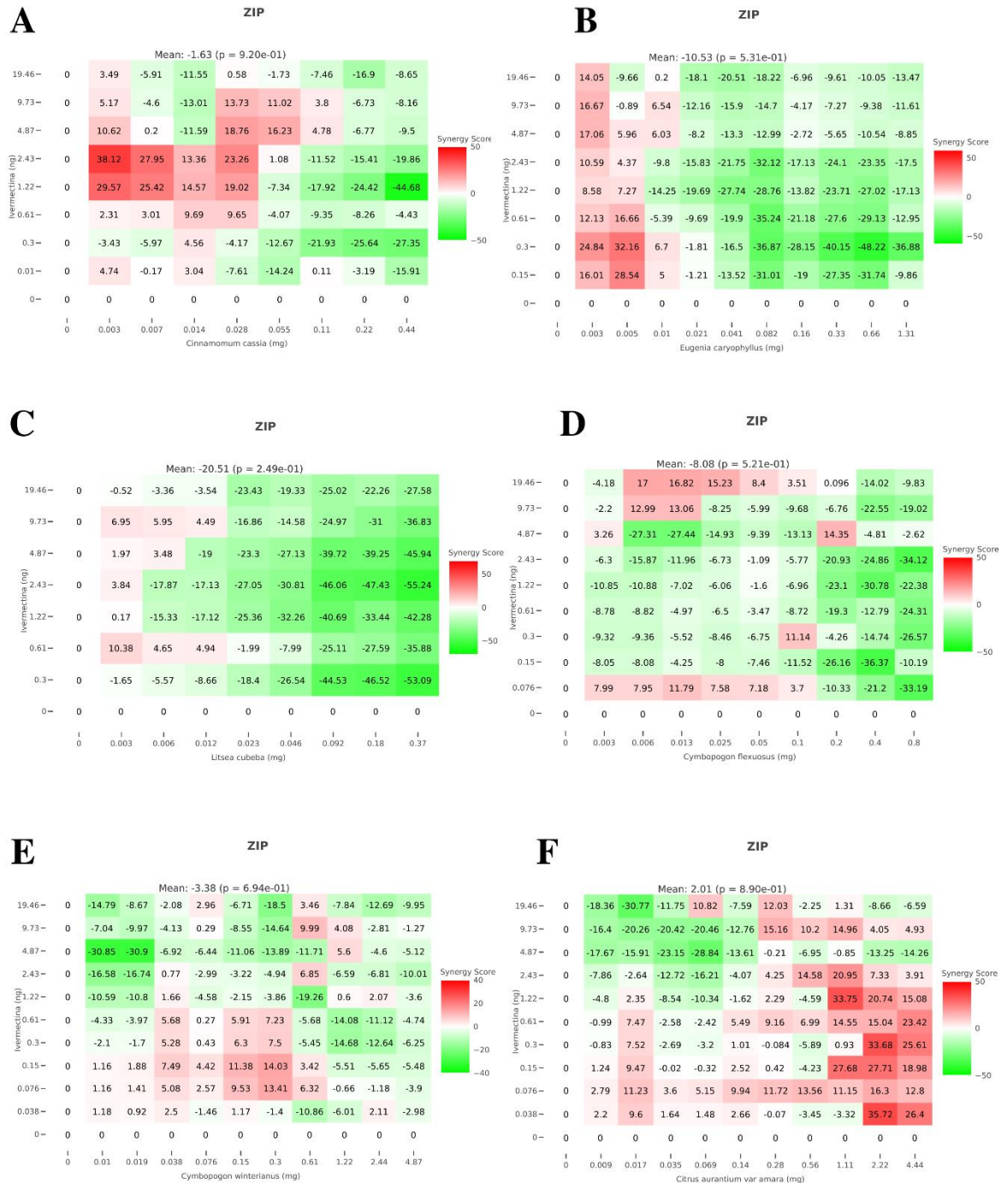
543 Combinação de *C. cassia* com Ivermectina. **(B)** Combinação de *E. caryophyllus* com

544 Ivermectina. **(C)** Combinação de *L. cubeba* com Ivermectina. **(D)** Combinação de *C.*

545 *flexuosus* com Ivermectina. **(E)** Combinação de *C. winterianus* com Ivermectina. **(F)**

546 Combinação de *C. camphora* com Ivermectina. A cor vermelha indica sinergismo e a verde

547 antagonismo.



548

549 **Figura Sup. 6.** Mapa de calor com pontuações de sinergismo de acordo com potência de
550 interação zero (ZIP). **(A)** Combinação de *C. cassia* com Ivermectina. **(B)** Combinação de *E.*
551 *caryophyllus* com Ivermectina. **(C)** Combinação de *L. cubeba* com Ivermectina. **(D)**
552 Combinação de *C. flexuosus* com Ivermectina. **(E)** Combinação de *C. winterianus* com
553 Ivermectina. **(F)** Combinação de *C. camphora* com Ivermectina. A cor vermelha indica
554 sinergismo e a verde antagonismo.



555

556 **Figura Sup. 7.** Mapa de calor com pontuações de sinergismo de acordo com agente único
 557 mais alto (HSA). **(A)** Combinação de *C. cassia* com Ivermectina. **(B)** Combinação de *E.*
 558 *caryophyllus* com Ivermectina. **(C)** Combinação de *L. cubeba* com Ivermectina. **(D)**
 559 Combinação de *C. flexuosus* com Ivermectina. **(E)** Combinação de *C. winterianus* com
 560 Ivermectina. **(F)** Combinação de *C. camphora* com Ivermectina. A cor vermelha indica
 561 sinergismo e a verde antagonismo.

