

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AÇÃO *in vitro* OVICIDA E LARVICIDA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*, LIVRE E  
NANOESTRUTURADO, E TERPINEN-4-OL SOBRE O  
*Haemonchus contortus***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Thirssa Helena Grandó**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**AÇÃO *in vitro* OVICIDA E LARVICIDA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*, LIVRE E  
NANOESTRUTURADO, E TERPINEN-4-OL SOBRE O  
*Haemonchus contortus***

**Thirssa Helena Grandó**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof.<sup>a</sup> Silvia Gonzalez Monteiro**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Grando, Thirssa Helena

Ação in vitro ovicida e larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, livre e nanoestruturado, e terpinen-4-ol sobre o *Haemonchus contortus* / Thirssa Helena Grando.-2015.

52 p.; 30cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. ovinos 2. fitoterápicos 3. ovicida 4. larvicida  
5. in vitro I. Gonzalez Monteiro, Silvia II. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Thirssa Helena Grando. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Fone: (55) 3220-8958 - e-mail: thirssa\_thi@hotmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Organizadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AÇÃO *in vitro* OVICIDA E LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Melaleuca alternifolia*, LIVRE E NANOESTRUTURADO, E TERPINEN-4-  
OL SOBRE O *Haemonchus contortus***

elaborada por,  
**Thirssa Helena Grandó**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Silvia Gonzalez Monteiro** (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

---

**Virginia Cielo Rech** (UNIFRA)

---

**Luis Antonio Sangioni** (UFSM)

Santa Maria, 13 de fevereiro de 2015.

*Dediquei...  
Dedico...  
e sempre dedicarei  
minhas conquistas  
à minha mãe.  
“Mãe sempre te amarei”.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer...

... a Deus pela vida, e por me dar forças para superar as dificuldades e forças para nunca desistir dos meus objetivos.

... a minha Mãe que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos e alcançar meus objetivos, sei que independente em que universo ela esteja ela continua me mandando luz e força para seguir em frente.

...a minha Mana Suelem, minha parceira, que me incentiva e acredita em mim sempre, não medindo esforços pra me ajudar mesmo estando longe, meu amor por ela é infinito.

... a minha Família, base de tudo, que sempre deu suporte para que eu nunca desistisse dos estudos.

...ao meu namorado Marcelo, meu companheiro, meu amigo, meu amor, que me acompanhou e estimulou desde a época da graduação, um grande companheiro, sempre insistindo e me ajudando a estudar, e foi um dos grandes incentivadores para meu ingresso no mestrado. Agradeço também a família Farias, que sempre me acolheu como sendo da família, esse carinho com certeza ajudou a amenizar a saudade e a distância da minha casa.

...aos meus amigos e irmãos da Família e do Grupo Santa Lúcia, que me deram um apoio afetivo imprescindível para se seguir em frente, nos tornamos uma verdadeira família. Nossos laços vão desde as festas, almoços, jantares, junções até a hora de estar lá torcendo e aplaudindo as conquistas de cada um.

...a UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade, pela excelente infraestrutura, pelo qualificado corpo docente, pelo eficaz corpo técnico administrativo, É um orgulho poder tido à oportunidade de cursar a graduação e o mestrado nessa instituição.

...a minha Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Silvia Gonzalez Monteiro, pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pelos conselhos, enfim, pela oportunidade e confiança de me acolher como sua aluna e orientada, serei eternamente grata.

...ao Laboratório de Parasitologia Veterinária, LAPAVET, agradeço imensamente. os estagiários, os pós-graduandos e os professores, sem vocês nada seria possível. Agradeço: a orientação, a paciência, a ajuda nos experimentos, a parceria, as risadas na salinha, as ideias, enfim agradeço por tudo.

...ao Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa (CPPSul) e ao Laboratório de Microbiologia da UNIFRA, pela parceria, suporte e orientação para a realização deste estudo.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AÇÃO *in vitro* OVICIDA E LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*, LIVRE E NANOESTRUTURADO, E TERPINEN-4-OL SOBRE O *Haemonchus contortus***

AUTOR: THIRSSA HELENA GRANDO  
ORIENTADORA: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO  
Santa Maria, 13 de fevereiro de 2015.

As parasitoses gastrointestinais são um dos maiores problemas sanitários enfrentados na criação de ovinos, limitando consideravelmente sua rentabilidade, devido tanto aos gastos com as medidas de controle, bem como pela queda na sua produtividade. Dentre estas parasitoses podemos destacar o helminto *Haemonchus contortus*, devido principalmente a sua patogenicidade e a resistência aos fármacos existentes no mercado. Com o avanço da resistência parasitária, a procura por métodos alternativos de tratamento e por produtos anti-helmínticos mais eficazes, vem sendo amplamente estudados. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da administração *in vitro* do óleo essencial de *Melaleuca* (*Melaleuca alternifolia*) (OEM), de um nanocarreador lipídico feito a partir deste óleo (nanoOEM), e do Terpinen-4-ol (terp-4-ol), componente majoritário do óleo, sobre o nematoide *Haemonchus contortus*. Para avaliação da eficácia *in vitro*, cinco concentrações diferentes do OEM, da nanoOEM e do terp-4-ol foram testados em ovos e larvas infectantes de *H. contortus* por meio do Teste de Eclodibilidade Larval (TEL), que avalia o poder ovicida e do Teste de Inibição da Migração Larval (TIML), para avaliar o poder larvicida das soluções testadas. Todos os grupos foram testados em sextuplicata no TEL e em quadruplicata no TIML, juntamente com um controle positivo e negativo para a validação dos testes. Após a leitura dos testes observou-se que no TEL, a porcentagem de inibição da eclodibilidade foi de 100 % para o OEM e o terp-4-ol na concentração de 3,5 mg/mL, com uma CL50 de 0,43 e 0,63 mg/ml e de CL90 de 1.75 mg/mL e 3.12 mg/mL, respectivamente. A nanoOEM obteve uma menor atividade, com 82,63 % de inibição na mesma concentração de 3,5 mg/mL. No TIML, foi necessário utilizar concentrações das soluções um pouco mais elevadas, mas mesmo assim foi observada atividade larvicida. O OEM e a nanoOEM obtiveram uma atividade semelhante com 88,04 % e 84,80 % de inibição, respectivamente, na concentração de 56 mg/mL. O terp-4-ol apresentou um efeito maior sob as larvas, pois manteve uma inibição de 85,74 % na concentração de 56 mg/mL e de 82,40 % na de 3,5 mg/mL, demonstrando uma elevada atividade na menor concentração testada. Portanto, os resultados indicam que todas as substâncias testadas apresentaram atividade ovicida e larvicida sobre o *H. contortus*. O terpinen-4-ol, por ser o componente majoritário e pelos resultados apresentados pode ser considerado um dos componentes responsáveis pela ação anti-helmíntica do óleo. O OEM, o terp-4-ol e a nanoOEM, podem ser alvos para estudos *in vivo*, além de serem uma linha de pesquisa promissora no controle e tratamento das endoparasitoses gastrointestinais de ovinos.

**Palavras-chave:** Ovinos. Fitoterápicos. Ovicida. Larvicida. *In vitro*.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### ***In vitro* OVICIDAL AND LARVICIDAL ACTION OF THE ESSENCIAL OIL *Melaleuca alternifolia*, FREE AND NANOSTRUCTURED, AND TERPINEN-4-OL ON *Haemonchus contortus***

AUTHOR: THIRSSA HELENA GRANDO  
ADVISER: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO  
Santa Maria, February 13rd, 2015.

Gastrointestinal parasites are a major sanitary problems faced in the sheep, considerably limiting their profitability, due both to spending on the control measures, well as decrease in their productivity. Among these we can emphasize the helminth *Haemonchus contortus*, due to their pathogenicity and resistance to existing drugs in the market. With the advancement of parasite resistance, the search for alternative methods and effective anthelmintic products, has been widely studied. In this context, the objective of this study is to evaluate the influence of *in vitro* administration, the essential oil of Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) (TTO), a solid lipid nanocarrier made from this oil (nanoTTO), and Terpinen-4-ol (terp-4-ol), major component of the oil on the nematode *Haemonchus contortus*. To assess the *in vitro* efficacy of five different concentrations of TTO, and the nanoTTO Terp-4-ol were tested in eggs and infective larvae of *H. contortus* by means of Larval Hatching Test (LHT), that evaluates the power ovicidal and the Larval Migration Inhibition Test (LMIT), to evaluate the power larvicide of the solutions tested. All groups were tested in sextuplicate in TEL and in quadruplicate in TIML, along with a positive and negative control for the validation of tests. After reading the tests it was observed In LHT, the percentage of inhibition of hatching was 100 % for TTO and terp-4-ol in the concentration of 3.5 mg/mL, with LC50 of 0.43 and 0.63 mg/mL; LC90 of 1.75 mg/mL and 3.12 mg/mL, respectively. NanoTTO obtained less activity, with 82.6 % inhibition at the same concentration. As for LMIT, TTO and nanoTTO had a similar activity with 88.0 % e 84.8 % inhibition, respectively, at a concentration of 56 mg/mL. Terp-4-ol had a greater effect on larvae and, therefore, maintained 85.7 % inhibition at a concentration of 56 mg/mL and 82.4 % at 3.5 mg/mL, demonstrating a high activity in the lower concentration tested. Therefore, the results indicate that all substances that were tested showed ovicidal and larvicidal activity on *H. contortus*. The terpinen-4-ol being the major component and the results may be presented as one of the components responsible for the anthelmintic action of the oil. TTO, terp-4-ol and nanoTTO may be targets for *in vivo* studies, besides being a promising line of research in the control and treatment of endoparasitism.

**Keywords:** Sheep. Phytotherapeutic. Ovicidal. Larvicidal. *In vitro*.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figure 1 Formas adultas de *H. contortus* em abomaso de ovino altamente parasitado (Foto: Andressa Schafer) ..... 15
- Figura 2 Procedimentos do Teste de Inibição da Migração Larvar. A: Larvas infectantes incubadas. B: Larvas colocadas sobre peneiras de 25  $\mu\text{m}$ . C: Larvas imóveis que não migraram pela peneira. Fonte: Arquivo pessoal. .... 20
- Figure 3 Ilustração da planta *Melaleuca alternifolia*. Fonte: Domínio público (google) .... 22
- Figure 4 Ilustração de molécula de terpinin-4-ol. Fonte: Domínio público (google) ..... 23

### CAPÍTULO I

- Figure 1 Dose-response curve of the activity of the essential oil of *M. alternifolia* (TTO), essential oil nanoparticle of *M. alternifolia* (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol) on *H. contortus*, from the Egg Hatch Assay (EHA). The LC50 and LC90 of the tested solutions are exhibited by the legend. .... 43
- Figure 2 Dose-response curve of the activity of the essential oil of *M. alternifolia* (TTO), essential oil nanoparticle of *M. alternifolia* (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol) on *H. contortus*, from Larval Migration Inhibition Assay (LMIA). The LC50 and LC90 of the tested solutions are exhibited by the legend..... 43

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

Table 1	Qualitative and quantitative analysis of the essential oil of <i>Melaleuca alternifolia</i> , using gas chromatography (GC) by means of the system Agilent Technologies 6890N GC- FID, equipped with a DB-5 capillary column.. The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages. The benchmarks used are from the <i>International Organization for Standardization</i> (ISO) number 4730. ....	40
Table 2	Percentage of larval hatching (mean $\pm$ SD) of the controls and the percentage of the inhibition of hatching (mean $\pm$ SD) of the controls, of the essential oil of <i>M. alternifolia</i> (TTO), nanoparticle of essential oil of <i>M. alternifolia</i> (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol). ....	41
Table 3	Percentage of larval migration (mean $\pm$ SD) of the controls and the percentage of the inhibition of larval migration (mean $\pm$ SD) of the controls, of the essential oil of <i>M. alternifolia</i> (TTO), nanoparticle of essential oil of <i>M. alternifolia</i> (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol). ....	42

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1 Endoparasitoses gastrointestinais em ovinos.....	13
2.2 <i>Haemonchus contortus</i> .....	14
2.3 Controle das endoparasitoses.....	15
2.4 Resistência a anti-helmínticos na criação de ovinos .....	16
2.5 Efeito anti-helmíntico em extratos de plantas .....	20
2.6 Nanotecnologia.....	23
<b>CAPÍTULO I - .....</b>	<b>26</b>
Summary.....	27
Introduction .....	28
Materials and methods.....	29
Results .....	31
Discussion.....	33
Conclusions .....	35
References .....	36
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico submetido no periódico *Journal of Helminthology* disponível no capítulo I. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA desta dissertação.

## INTRODUÇÃO

As parasitoses gastrointestinais são um dos maiores problemas sanitários enfrentados na criação de ovinos, limitando consideravelmente sua rentabilidade, devido tanto aos gastos com as medidas de controle, bem como pela queda na sua produtividade. Dentre estas parasitoses podemos destacar o helminto *Haemonchus contortus*, por ser prevalente em diversas regiões do Brasil e ter hábito hematófago. Sua elevada patogenicidade proporciona uma queda na produção animal, com diminuição do ganho de peso, perda de qualidade de seus produtos finais, além de altas taxas de mortalidade.

Além disso, o avanço da resistência parasitária, devido à utilização incorreta dos antiparasitários, a deficiente ação dos produtos disponíveis no mercado, e a falta de novos fármacos, são outros agravantes encontrados na ovinocultura. Devido a isso, várias estratégias vêm sendo desenvolvidas para melhorar o controle das parasitoses gastrointestinais, tanto referentes ao manejo quanto ao tratamento desses animais. As medidas de manejo estão relacionadas à rotação de pastagens, ao tratamento seletivo, aos sistemas de criação, a seleção de raças resistentes, entre outras. Novas alternativas de tratamento estão sendo pesquisadas, como o uso de fungos nematófagos, nanofármacos, fitoterápicos e o desenvolvimento de vacinas e imunoterápicos.

O presente trabalho baseou-se nesses métodos alternativos para o tratamento e controle dessas parasitoses. As pesquisas com fitoterápicos e/ou extratos de plantas podem desvendar novas moléculas antiparasitárias, servir de terapia de suporte, ou ainda ser subsídio para o desenvolvimento de nanofármacos para o transporte dos princípios ativos convencionais, melhorando sua farmacocinética e farmacodinâmica. Todas essas alternativas buscam um controle parasitário lucrativo, mais eficiente e sustentável.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação *in vitro* do óleo essencial de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), de um nanocarreador lipídico sólido feito com óleo essencial de Melaleuca, e do Terpinen-4-ol, componente majoritário do óleo, sobre os ovos e larvas de *Haemonchus contortus*.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Endoparasitoses gastrointestinais em ovinos

Os ovinos são considerados uma espécie cosmopolita, isto é, se adaptam às mais variadas condições de meio ambiente, sendo, por isto, criados em todas as partes do mundo (CARVALHO et al., 1993). A ovinocultura pode ser considerada o setor mais lucrativo da pecuária, proporcionando um rápido retorno do capital empregado (DORNELLES, 2002). Entretanto, a infecção por nematoides gastrintestinais tem se apresentado como uma das principais causas de perdas econômicas para os produtores de pequenos ruminantes no Brasil e em outras partes do mundo (COOP; KYRIAZAKIS, 2001).

Parasitoses por nematoides gastrointestinais estão entre as doenças mais comuns, e por ocasionar perdas econômicas importantes de animais mantidos em regime de pastagem (PERRY et al. , 2002). Essas parasitoses são consideradas uma das principais causas de doenças sub-clínicas, queda na produção e perda econômica para o setor da ovinocultura (MOLENTO et al., 2011), devido principalmente, à redução do crescimento, do ganho de peso e da diminuição da produção e qualidade de seus subprodutos, como carne, leite e lã, (COSTA et al., 2007). Esse problema é acentuado nos países em desenvolvimento, pois as fontes nutricionais são frequentemente insuficientes para os pequenos ruminantes e, como consequência, a imunidade natural é comprometida, resultando em baixa produtividade e elevado índice de mortalidade (KNOX et al., 2006). Além disso, os animais jovens demonstram ser mais susceptíveis a esses parasitos quando comparados aos animais adultos, e isso se deve, principalmente, a fraca ou menor resposta imunológica (AMARANTE, 2009).

E esse elevado parasitismo pode ser em decorrência histórica, pois os ovinos surgiram em regiões desérticas da Ásia Central que era considerado um ambiente desfavorável aos parasitos, portanto os animais não eram expostos a esses patógenos e isto determinou que os animais não desenvolvessem resposta imunitária etária. Além disso, na natureza, esses animais apresentavam comportamento migratório e dificilmente pastejavam no mesmo local. O que mudou completamente quando a criação passou a ser mais intensiva, onde os animais passaram a pastar nos mesmos locais, favorecendo, assim, o parasitismo (SOTOMAIOR et al., 2009).

Os animais afetados por esses parasitos apresentam diversos sinais clínicos, como: perda de apetite, diarreia, andar cambaleante, respiração acelerada, perda de peso e condição corporal, letargia, mucosas pálidas, e ocasionalmente, presença de edema submandibular e ventral. Esses sinais clínicos podem variar em intensidade, podendo ser brandos ou graves, e em última instância ocasionar mortalidade (MOLENTO et al., 2011; ATHANASIADOU; KYRIAZAKIS, 2004). Os ovinos podem ser parasitados simultaneamente por várias espécies de nematoides gastrintestinais (AMARANTE, 2009). No Brasil, os nematódeos de maior importância para os pequenos ruminantes são: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides spp.*, *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al., 2004).

## **2.2 *Haemonchus contortus***

*Haemonchus contortus* é um endoparasita gastrintestinal predominante em diversas regiões do Brasil, sendo considerado o principal parasito que infecta os ovinos (FERNANDES et al. 2004) devido, principalmente, à sua alta patogenicidade (AMARANTE et al., 2009). Este nematoide pertence ao Filo Nematelminthes, Classe Nematoda, Ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae, Gênero *Haemonchus* (MONTEIRO, 2011).

O ciclo de vida do *H. contortus* apresenta duas fases: vida livre e vida parasitária. A fase de vida livre ocorre nas pastagens e consiste na eclosão larval dos ovos eliminados junto às fezes e no desenvolvimento da larva L1 (primeiro estágio) até o estágio infectante (terceiro estágio, L3). Este desenvolvimento compreende uma série de etapas e processos, que sofre influência constante das condições climáticas e do microclima da pastagem (O'CONNOR et al., 2006). A fase de vida parasitária ocorre logo após a ingestão das L3 pelo hospedeiro junto à pastagem. As larvas L3 sofrem duas mudas no abomaso, para larva de quarto estágio (L4) e larva de quinto estágio (L5), e se diferenciam em machos e fêmeas (forma adulta). Os parasitas adultos são encontrados preferencialmente parasitando o abomaso e, após a cópula, uma fêmea do parasita pode liberar junto às fezes aproximadamente 5.000 ovos/dia (Le JAMBRE, 1983).

O *H. contortus* é essencialmente hematófago, ou seja, durante a sua vida parasitária, alimenta-se de sangue do seu hospedeiro, migrando pela mucosa gástrica durante sua

alimentação (Fig. 1) (MOLENTO et al., 2011). Os animais portadores de grande carga parasitária apresentam um quadro grave de anemia, levando a uma elevada perda proteica, desenvolvendo muitas vezes um edema submandibular devido a hipoproteinemia (AMARANTE et al., 2004). Em infecções maciças e severas, pode ocasionar mortalidade nos rebanhos, por isso torna-se imprescindível a implementação de um controle parasitário visando minimizar o quadro clínico do animal parasitado (AMARANTE, 2001).

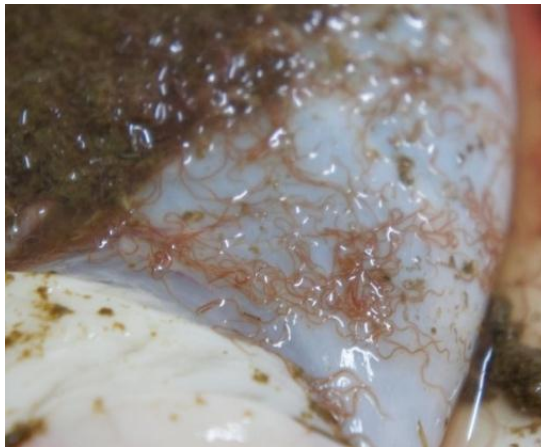


Figure 1 Formas adultas de *H. contortus* em abomaso de ovino altamente parasitado (Fonte: Andressa Schafer)

### 2.3 Controle das endoparasitoses

O controle das endoparasitoses é essencial para o sucesso da produção de pequenos ruminantes. Algumas práticas zootécnicas contribuem para reduzir estas parasitoses como a manutenção de bom estado corporal, separação de lotes de animais por idade e lotação adequada nas pastagens (RODA et al., 1986). O acometimento das parasitoses não ocorre de forma semelhante em todos os animais do rebanho. Alguns fatores podem interferir no desenvolvimento do parasito no hospedeiro, sejam estes relacionados ao parasito (espécies mais patogênicas e condições ambientais favoráveis) ou ao próprio hospedeiro (raças resistentes e animais imunocompetentes) (SOUZA, 2011).

A principal medida de controle adotada para reduzir os efeitos do parasitismo é o uso de anti-helmínticos, principalmente os fármacos dos grupos químicos das Avermectinas, Milbemicina, Benzimidazóis, Imidazóis e Salicilanidas, visando reduzir os níveis de infecção



dos animais e diminuir o grau de contaminação das pastagens. Porém, devido à falta de conhecimento no que se refere à biologia e à epidemiologia desses parasitos, a maioria dos produtores não fornecem o tratamento antiparasitário de forma adequada ao seu rebanho (MOLENTO et al., 2004).

Existem alguns métodos alternativos e fatores operacionais que contribuem para o controle desses parasitos, a fim de se evitar as doenças ou sua propagação. Destacam-se o pastejo alternado entre ovinos e bovinos; administração de anti-helmíntico na dose correta; utilização dos grupos de anti-helmínticos em esquema de rodízio anual; avaliação periódica da presença de nematoides resistentes através de OPG; melhoramento genético do rebanho; controle biológico com a utilização de fungos nematófagos; utilização de homeopatia; e, utilização de fitoterapia (OLIVEIRA, 2013).

Outro controle parasitário que vem sendo bastante utilizado é o método Famacha<sup>®</sup>, que consiste em tratamento seletivo dos animais através da observação da coloração da conjuntiva ocular. Essa metodologia consiste em tratar somente os animais que apresentam sinais de anemia e que realmente estão necessitando de tratamento, e prevê o descarte de animais que são mais susceptíveis ao parasitismo. Por isso, que o objetivo deste método é identificar clinicamente animais resistentes, resilientes e sensíveis às infecções parasitárias, otimizando o tratamento de forma seletiva em situações reais no campo, sem a necessidade de recursos laboratoriais. Este método é um recurso importante no controle de *H. contortus* e sua vantagem mais significativa é a redução do número de tratamentos aplicados, o que auxilia na diminuição do desenvolvimento da resistência a anti-helmínticos (MOLENTO et al., 2004).

Decorrente do uso de antiparasitários sem base técnica ou mesmo de informações inadequadas referentes à frequência de tratamento e a utilização correta das drogas antiparasitárias em ruminantes, foi observado que começou a se selecionar rapidamente nematoides resistentes às drogas disponíveis no mercado diminuindo a eficácia destes produtos (SILVA, 2007)

## **2.4 Resistência a anti-helmínticos na criação de ovinos**

Nas últimas décadas, o uso intensivo de anti-helmínticos pertencentes aos grupos dos benzimidazóis, dos imidazotiazóis (levamisole) e das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) vem sendo a forma mais desastrosa de controle, devido a seleção e propagação

de parasitos resistentes (FORTES; MOLENTO, 2013). A resistência parasitária é definida como um aumento significativo na habilidade de uma população de parasitos sobreviver a doses de um determinado composto químico, que antes seria capaz de eliminar a maioria dos indivíduos de uma população susceptível (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008).

A primeira ocorrência de resistência a antiparasitários foi descrita por Drudge et al. (1964) e, desde então, os relatos de resistência anti-helmíntica em nematoides de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas mais comumente utilizados, benzimidazóis, levamisóis e lactonas macrocíclicas, têm crescido rapidamente em diferentes regiões do mundo (FORTES; MOLENTO, 2011). No Brasil, o aumento de relatos de resistência múltipla a drogas em vários locais, como as regiões Sul (CEZAR et al. 2010), Sudeste (VERÍSSIMO et al. 2012) e Centro-Oeste (SCZESNY-MORAES et al. 2010).

Os genes para resistência parasitária são de baixa frequência (em torno de 5 %) dentro de uma população, e isso ocorre devido a modificações bioquímicas e moleculares que determinam a diminuição do efeito da droga contra o parasito. O anti-helmíntico, quando utilizado pela primeira vez, apresenta eficácia elevada, no entanto, o uso frequente do mesmo princípio ativo aumenta a proporção de indivíduos resistentes e, conseqüentemente, reduz-se a eficácia do produto (MOTTIER; LANUSSE, 2001). Além de fatores genéticos, outros podem influenciar na maior ou menor disseminação da resistência, como os fatores operacionais. A subdosagem, a frequência de tratamentos e a rotação rápida de princípio ativo, podem desencadear uma aceleração no desenvolvimento da resistência (HENNON, 1993).

#### 2.4.1 Monitoramento da resistência anti-helmíntica

O monitoramento da resistência anti-helmíntica é um requisito fundamental para o controle sustentável dos rebanhos ovinos. A fim de retardar a propagação da resistência nestas espécies de parasitos, torna-se importante a capacidade de detectar a resistência a níveis baixos e tão cedo quanto possível. Por isso, testes *in vivo* e *in vitro* para a detecção de resistência têm sido desenvolvidos nos últimos 30 anos (TAYLOR et al., 2002). Estudos com PCR, vem sendo utilizados, pois possibilitam a identificação primária do individuo geneticamente resistente (SANGSTER et al., 2002).

Por muitos anos, o teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) foi usado como o padrão ouro para se testar a eficácia *in vivo* dos antihelmínticos. Porém, esta técnica

possui inúmeras desvantagens, como: os animais necessitam ser amostrados duas vezes; a produção de ovos pelas fêmeas nem sempre se correlaciona com a carga parasitária real; os ovos não são distribuídos uniformemente no bolo fecal; entre outras (EYSKER; PLOEGER, 2000; VIDYASHANKAR et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que TRCOF só é capaz de detectar resistência depois que mais de 25 % da população de nematoides adquire o alelo de resistência (MARTIN et al., 1989).

Testes *in vitro* são, na maioria das vezes, mais rápidos, mais econômicos e menos trabalhosos quando comparado com os testes *in vivo* (DEMELER et al. 2012), além de anularem os efeitos causados pela interferência do hospedeiro no estabelecimento da infecção parasitária e pela variação na farmacodinâmica das drogas no animal (CHAGAS et al. 2011). Em geral, esses testes baseiam-se na incubação de estágios de vida livre do parasito em uma série de concentrações do anti-helmíntico ou extratos de plantas, seguido da avaliação de seus efeitos sobre os nematoides (FORTES; MOLENTO, 2013).

Vários testes *in vitro* foram desenvolvidos para a detecção da resistência e para avaliação da atividade de fitoterápicos sobre os parasitos (TAYLOR et al, 2002; Von SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). O Teste de Desenvolvimento Larval (TDL) que foi desenvolvido para detectar efeitos das substâncias sobre os músculos da faringe das larvas (Gill et al., 1995), Teste de Inibição da Migração Larval (TIML) (DEMELER et al., 2010) e o Teste de Migração de Larvas em Ágar (MOLENTO; PRICHARD 2001), para substâncias que causam paralisia nos músculos somáticos, o Teste de Eclosão Larval (TEL) (Von-SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009), que foi desenvolvido para avaliar a eclodibilidade larvar, após a incubação dos ovos desses parasitos, entre outros.

#### 2.4.1.1 Teste de eclodibilidade larval

O teste de eclodibilidade larval é baseado no método descrito por Von Samson-Himmelstjerna et al. (2009), onde as concentrações teste (mg/ml) são adicionadas as placas de 24 poços e em seguida 100 µl de suspensão de ovos contendo aproximadamente 100 ovos são incubados por 48 horas a 27° C. O teste é conduzido com dois controles: o negativo com água destilada e o positivo com Tiabendazole a 50 µg/ml. Após o período de incubação, gotas de lugol são adicionadas em cada poço, para cessar o processo de eclodibilidade, e os ovos e larvas de primeiro estágio (L1) são quantificadas para o cálculo da porcentagem de inibição

da eclodibilidade larval. A leitura é realizada em microscópio óptico invertido utilizando objetiva de 10x. Os dados são computados quando no controle negativo tiver mais de 90% de L1.

#### 2.4.1.2 Teste de inibição da migração larval

Recentemente Demeler et al. (2010) padronizaram este teste a fim de detectar a resistência à Ivermectin em nematoides de ruminantes. Este teste avalia a capacidade migratória de larvas de terceiro estágio ( $L_3$ ) após contato prévio com as diferentes concentrações das soluções a serem testadas.

Inicialmente, as larvas são desembainhadas artificialmente com hipoclorito de sódio (0,3 %). Cerca de 150 larvas são incubadas nas diferentes concentrações a 28° C, durante 24h (utilizando-se as linhas A e C de placas de cultivo celular de 24 poços)(Fig. 2 A), o volume final deverá ser de 1000 $\mu$ L por poço. O teste é conduzido com dois controles: o negativo com água destilada e o positivo com Ivermectina a 50  $\mu$ g/mL. Depois das primeiras 24 horas são retirados os 1000  $\mu$ l de cada poço, acopladas as peneiras de 25  $\mu$ m sobre os poços e recolocados os 1000  $\mu$ L contendo a solução + larvas incubando-se novamente a 28°C, durante 24 horas (Fig. 2 B). Após a segunda incubação, as peneiras são cuidadosamente retiradas e o remanescente de larvas que não migraram serão lavadas com água destilada no poço imediatamente abaixo ao que foi utilizado (linhas B e D). Finalmente, as placas são lidas em microscópio óptico invertido. Assim teremos a quantidade de larvas que migraram e as que não migraram (Fig 2 B) através da malha separadas em cada poço, e será possível calcular a percentagem de inibição da migração. Os dados são computados quando no controle negativo tiver mais de 90 % de larvas que migraram.

Com o avanço desses tipos de monitoramento, foi possível observar a real situação da resistência parasitária. Muitas alternativas vêm sendo pesquisadas tanto na busca da manutenção da eficácia das drogas antiparasitárias como em um controle antiparasitário eficaz. Dentre estas alternativas, destaca-se a fitoterapia, por utilizar plantas bioativas ricas em compostos com potencial anti-helmíntico (MAX et al., 2009), além do uso de carreadores como as nanomoléculas e os nanofármacos.

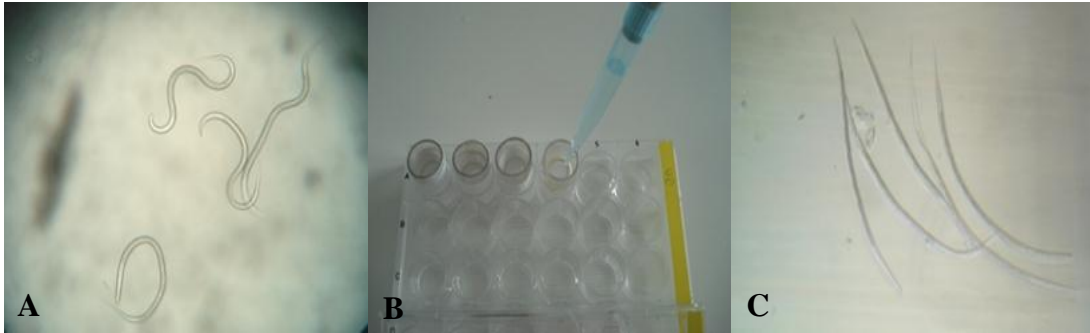


Figura 2 Procedimentos do Teste de Inibição da Migração Larvar. A: Larvas infectantes incubadas. B: Larvas colocadas sobre peneiras de 25µm. C: Larvas imóveis que não migraram pela peneira. Fonte: Arquivo pessoal.

## 2.5 Efeito anti-helmíntico em extratos de plantas

A crescente preocupação mundial dos consumidores com a presença de resíduos de drogas em produtos animais está levando a realização de novas pesquisas, com o intuito de explorar o que pode ser utilizado para reduzir o uso exclusivo da química anti-helmíntica, para um controle mais sustentável destes parasitas (WALLER, 1999). Sendo assim, o uso de plantas medicinais, com ação anti-helmíntica, surge como uma possibilidade de tratamento simples, barato e mais sustentável (NOGUEIRA et al., 2006). Além, de poder ser utilizada como terapia de suporte juntamente com o tratamento químico, aumentando a eficácia do controle parasitário.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de validar o uso de extratos de plantas, além de avaliar cientificamente estas plantas, a fim de assegurar sua eficácia e segurança, para a administração em organismos vivos (VASCONCELOS, 2006). Diversos trabalhos têm demonstrado resultados promissores com a utilização de componentes extraídos de plantas para o controle de diferentes parasitos de importância médico-veterinária (MACHADO et al., 2010). Muitas dessas plantas, conhecidas como possuidoras de atividade antiparasitária, necessitam, entretanto, que sua eficácia seja cientificamente comprovada, pois muitas vezes desempenham um papel importante, ao serem associadas a outros métodos de controle, promovendo o controle sustentável dessas parasitoses (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

Duas abordagens têm sido empregadas para avaliar o efeito anti-helmíntico dos fitoterápicos: o fornecimento de plantas a animais experimentalmente ou naturalmente infectados; e a preparação de extratos dessas plantas para avaliação *in vitro*

(ATHANASIADOU et al., 2007). Na última década, acumularam-se resultados indicando que algumas plantas bioativas poderiam possuir propriedades anti-helmínticas, representando assim uma alternativa promissora no controle dessas endoparasitoses (DÍAZ, 2011). Pode-se citar uma gama enorme de plantas já pesquisadas recentemente com ação sobre nematoides gastrointestinais, com mais de 98 % de eficácia, como: *Cocos nucifera* (nome popular: coco), *Plectranthus punctatus*, *Maesa lanceolata*, *Eucalyptus globulus* (nome popular: Eucalipto), *Musa spp.* (nome popular: Bananeiras), *Emulsão de óleo de laranja*, *Artemisia lancea*, *Senna occidentali* (nome popular: Fedegoso), entre outras. (OLIVEIRA et al., 2009; TADESSE et al., 2009; MACEDO et al., 2009; ZHU et al., 2013; EGUALE et al., 2011).

### 2.5.1 Óleo de melaleuca

O óleo essencial de melaleuca (OEM) é extraído de uma planta medicinal bastante conhecida e pesquisada. Esta planta é popularmente conhecida como “Tea tree” ou chá de árvore, e é um óleo essencial destilado a partir da planta nativa australiana *Melaleuca alternifolia* (Fig 3). Esta planta é um exemplar da medicina tradicional aborígine da Austrália e era usada comumente para contusões, picadas de insetos, e infecções de pele (BUDHIRAJA et al., 1999).

O óleo é extraído por hidrodestilação ou destilação por arraste de vapor. Este óleo possui cerca de 100 compostos ativos diferentes. Os principais constituintes são: terpinen-4-ol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol, p-cimeno e álcoois sesquiterpênicos. Tanto a farmacopéia, quanto a ISO4730 exigem que o óleo deva ser obtido por destilação a vapor e apresente um teor mínimo de 30 % de terpinen-4-ol e um teor máximo de 15 % de 1,8-cineol (CARSON, 2006).

O OEM é incorporado como ingrediente ativo em muitas das formulações tópicas utilizadas para o tratamento de diversas doenças da pele, e com muitas outras prescrições sendo amplamente comercializado na Austrália, Europa, e América do Norte (CARSON et al., 2006). Dentre as possíveis propriedades descritas dessa planta pode-se citar: atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e analgésica, anti-neoplásica, inseticida e antiparasitário (CARSON; RILEY, 1993; HART et al., 2000; HAMMER et al., 2003; CALDEFIE-CHE'ZET et al., 2006; BALDISSERA et al., 2014).

Além destes, vários outros estudos demonstraram atividade antimicrobiana do OEM contra bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, gram-negativa, *Escherichia coli*, e leveduras, *Candida albicans* (CARSON & RILEY, 1995; RAMAN et al., 1993; CALLANDER & JAMES, 2012). Há também relatos de atividade antiparasitária, contra: protozoários como: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* e *Trichomonas vaginalis* (VIOLLON, et al., 1996; MIKUS et al., 2000; BALDISSERA et al., 2014) e contra ectoparasitos, *Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei*, *Lucilia cuprina*, *Bovicola ovis* e *Rhipicephalus microplus* (WALTON et al., 2004; NEVES et al., 2012; CALLANDER; JAMES, 2012; JAMES; CALLANDER, 2012; PAZINATO et al., 2014) , porém há poucos dados e informações sobre alguma atividade contra helmintos.



Figure 3 Ilustração da planta *Melaleuca alternifolia*. Fonte: domínio público (google)

### 2.5.2 Terpinen-4-ol

Uma área de interesse atual é a pesquisa de metabólitos secundários de plantas (ISMAN, 2006). Estes compostos são conhecidos por defender plantas contra insetos herbívoros e contra outras infecções por microrganismos (WINK, 1988). Óleos essenciais de plantas contêm inúmeros metabólitos secundários ativos, tais como: terpenos e compostos aromáticos (BAKKALI et al., 2008). Estes metabólitos são pesquisados, agindo independentes ou em sinergia com outros compostos, produzindo efeito inseticida ou repelente (YANG et al., 2003). Podem ainda, ser alvos de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos químicos.

A composição química do OEM é bem caracterizada e definida, sendo que o terpinen-4-ol pode constituir cerca de 40 % da composição do óleo, tornando-se o componente majoritário (COX et al., 2001). Este componente é o principal responsável pelas propriedades medicinais apresentadas pelo OEM. Existem estudos que revelam que seu mecanismo de ação consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, ocorrendo assim uma perda de material intracelular, incapacitando células microbianas de manter a homeostase. Ele também atua na inibição da respiração celular (SOUZA, 2014)

A atividade do OEM, do terpinen-4-ol e de outros componentes deste óleo já foi testada em vários microrganismos. Existem relatos de atividade sobre *Sarcoptes scabiei*, sendo que o terpinen-4-ol demonstrou maior atividade que o óleo de melaleuca (WALTON, 2004). Em experimento semelhante, avaliando-se o efeito sobre *Candida albicans*, também foi observada uma ação ligeiramente melhor no seu componente majoritário, o terpinen-4-ol (NINOMIYA et al., 2012). No experimento de James & Callander (2012), também foi observado a eficácia do óleo e do terpinen-4-ol contra formas adultas e em ovos do piolho *Bovicola ovis*.

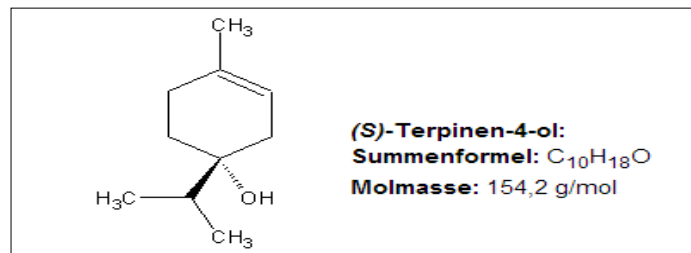


Figure 4 – Ilustração de molécula de (s) terpinin-4-ol. Fonte: Domínio público (*google*)

## 2.6 Nanotecnologia

A nanotecnologia é o estudo que abrange diversas áreas do conhecimento, dentre estas destacamos os fármacos. Uma nova abordagem no uso de fitoterápicos é a implantação da nanotecnologia. As nanopartículas configuram-se como uma opção para o aumento da biodisponibilidade de fitoterápicos. Uma vez que, podem proporcionar maior penetração em membranas plasmáticas devido ao seu tamanho reduzido, tornam-se excelentes transportadoras de medicamentos, possibilitando assim, a liberação controlada dos princípios ativos convencionais (KURIEN et al., 2007; IRACHE et al., 2011).



O desenvolvimento de sistemas inovadores de liberação de fármacos e outras substâncias ativas de interesse vêm impulsionando muitas pesquisas (SOPPIMATH et al., 2001). Sistemas nanoestruturados consistem em sistemas coloidais dispersos de diâmetro particular submicrométrico ( $< 1 \mu\text{m}$ ). Esses sistemas incluem as emulsões submicrônicas, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos que são capazes de carrear fármacos lipofílicos e hidrofílicos (OLIVEIRA, 2014).

As nanopartículas lipídicas sólidas ou nanocarreadores lipídico sólidos são partículas constituídas por lipídios sólidos a temperatura ambiente, apresentando tamanho médio de partícula entre 100 a 300 nm. O objetivo principal dessas nanoestruturas é de desenvolver sistemas capazes de controlar a liberação de fármacos e aumentar a sua estabilidade (SAUPE e RADES et al., 2006).

As nanopartículas possuem um futuro promissor na indústria farmacêutica, pois podem ser sintetizadas para melhorar as propriedades farmacológicas e terapêuticas dos fármacos. Essas nanoestruturas apresentam um controle de liberação sustentado, em uma maior seletividade (aumentando assim o índice terapêutico), uma diminuição dos efeitos colaterais e uma proteção da degradação no trato gastro-intestinal, aumentando assim a biodisponibilidade (MONALISA et al., 2013). Os sistemas nanoestruturados podem ser administrados pelas vias intravenosa, subcutânea, intramuscular, ocular, oral e tópica. A principal vantagem destes sistemas é a capacidade de modificar consideravelmente a penetração intracelular das substâncias a eles associadas (OLIVEIRA, 2014).

#### 2.6.1 Nanoestrutura de *M. alternifolia*

O óleo de *M. alternifolia* apresenta alguns problemas relacionados às suas propriedades físicas, como a miscibilidade em água e volatilização, resultando em baixa estabilidade (CARSON et al, 2006). Neste sentido, a nanoestruturação de alguns produtos de origem natural resulta em uma maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada, diminuição significativa da toxicidade, maior tempo de permanência na circulação, proteção contra mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (SOUZA, 2014).

Em uma pesquisa realizada por Low et al. (2013), os autores produziram lipossomas de óleo de *M. alternifolia*, e esses lipossomas demonstraram uma liberação controlada

melhorando a sua eficácia antimicrobiana, bem como reduzindo a concentração eficaz necessária. Oliveira et al. (2011) também obtiveram sucesso, no preparo de nanoemulsões de óleo de melaleuca e palmitato de vitamina A, obtendo partículas medindo entre 86-96 nm, por meio do método de inversão de fase, utilizando surfactantes não – iônicos. Na dissertação de Souza (2014) observou-se que a administração de óleo e das nanopartículas de óleo de *M. alternifolia* reduziram significativamente o biofilme formado por várias espécies de *Candida*. Sendo assim, o uso de nanoestruturas de óleo de melaleuca torna-se um bom alvo de estudo envolvendo infecções bacterianas.

## CAPÍTULO I -

(Artigo submetido ao periódico *Journal of Helminthology*)

### **Activity of the essential oil of the free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on *Haemonchus contortus***

Thirssa Helena Grando, Mariângela Facco de Sá, Matheus Dellaméa Baldissera, Camila Belmonte Oliveira, Márcia Ebling de Souza, Renata Platchek Raffin, Roberto Christ Vianna Santos, Alessandro Pelegrine Minho, Marta Lizandra do Rêgo Leal and  
Silvia Gonzalez Monteiro

**Activity of the essential oil of the free and nanostructured *Melaleuca alternifolia*  
and of terpinen-4-ol on *Haemonchus contortus***

Thirssa Helena Grando<sup>a\*</sup> Mariângela Facco de Sá<sup>a</sup>, Matheus Dellaméa Baldissera<sup>a</sup>, Camila Belmonte Oliveira<sup>b</sup>, Márcia Ebling de Souza<sup>c</sup>, Renata Platchek Raffin<sup>c</sup>, Roberto Christ Vianna Santos<sup>c</sup>, Alessandro Pelegrine Minho<sup>d</sup>, Marta Lizandra do Rêgo Leal<sup>e</sup> and Silvia Gonzalez Monteiro<sup>a\*</sup>

a Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal Santa Maria, Brazil

b Universidade do Oeste de Santa Catarina, Brazil

c Centro Universitário Franciscano, Brazil

d Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brazil

e Department of Large Animal, Universidade Federal Santa Maria, Brazil

## Summary

*Haemonchus contortus* is the main parasite of sheep and is responsible for significant economic and production losses. This disease lacks effective anthelmintic products, and so the search for new compounds to replace synthetic anthelmintics has been extensively studied. The present study aimed to assess the activity *in vitro* of the essential oil of *Melaleuca* (*M. alternifolia*), free (TTO) and nanostructured (nanoTTO) and of terpinen-4-ol (terp-4-ol) on the eggs and larvae of *H. contortus*. To assess the *in vitro* efficacy, TTO, nanoTTO and terp-4-ol underwent Larval Hatching Test (LHT) and the Larval Migration Inhibition Test (LMIT). In LHT, the percentage of inhibition of hatching was 100% for TTO and terp-4-ol in the concentration of 3.5 mg/mL, with LC50 of 0.43 and 0.63 mg/mL; LC90 of 1.75 mg/mL and 3.12 mg/mL, respectively. NanoTTO obtained less activity, with 82.6% inhibition at the same concentration. As for LMIT, TTO and nanoTTO had a similar activity with 88.0% e 84.8% inhibition, respectively, at a concentration of 56 mg/mL. Terp-4-ol had a greater effect on larvae and, therefore, maintained 85.7% inhibition at a concentration of 56 mg/mL and 82.4% at 3.5 mg/mL, demonstrating a high activity in the lower concentration tested. Therefore, the results indicate that all substances that were tested showed ovicidal and larvicidal activity on

*H. contortus*. TTO, terp-4-ol and mainly nanoTTO may be targets for *in vivo* studies, besides being a promising line of research in the control and treatment of endoparasitism.

Keywords: sheep; phytotherapy medicines; larvicidal; ovicidal; *in vitro*

## Introduction

Endoparasitism caused by gastrointestinal nematodes is one of the biggest problems faced in the production of sheep. This is primarily due to the impact on productivity and cost control measures, considerably limiting their profitability (Acharya *et al.*, 2014). The *Haemonchus contortus* is a parasite of utmost importance in this context (Fernandes *et al.*, 2004), being the most pathogenic, which can trigger an acute disease characterized by anorexia, diarrhea, anemia and, in severe cases, death of the animal (Athanasiadou & Kyriazakis, 2004; Molento *et al.*, 2004).

To compound the deleterious role of such endoparasitism, the description of cases of gastrointestinal nematodes resistant to antiparasitic drugs has become frequent, which are the primary means of control and treatment of this infection (Torres-Acosta & Hoste, 2008). These observations have led researchers to develop alternatives such as the use of phytotherapy medicines and nanotechnology.

The essential oil of *Melaleuca*, popularly known as "tea tree oil" (TTO), is an essential oil obtained from the leaves of the native Australian plant *Melaleuca alternifolia* (Mulla & Su, 1999). This plant is commonly used to treat bruises, insect bites, and skin infections (Budhiraja *et al.*, 1999). Among the possible properties described for this plant, antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, analgesic, anti-neoplastic, and insecticide activities have been reported (Carson & Riley, 1993; Hart *et al.*, 2000; Hammer *et al.*, 2003; Caldefie-Che'zet *et al.*, 2006). One of its main components and of the highest concentration is terpinen-4-ol, which also has demonstrated medicinal properties and has been the subject of many studies (Furneri *et al.*, 2006).

To change the biodistribution and kinetics of drugs and phytotherapy medicines aimed at increasing efficiency in human and veterinary therapeutics, nanotechnology is an alternative that has some advantages over the use of drugs/conventional products such as the slow, gradual, and controlled drug release, increased bioavailability and reduced toxicity and side effects (Roco, 2001; Verma & Garg, 2001; Irache *et al.*, 2011).

Given that this endoparasitism is responsible for severe infections associated with large economic losses, and also the few studies of nanostructured systems in the therapy of this disease, the aim of this study was to assess the *in vitro* activity of free and nanostructured TTO and of terpinen-4-ol on the eggs and larvae of *H. contortus*.

## **Materials and methods**

### *Preparation of test solutions*

TTO was purchased from Importadora Química Delaware Ltda® (Porto Alegre, Brazil). The nanoparticles of the essential oil of Melaleuca (nanoTTO) were obtained from the company Inventiva® (Porto Alegre, Brazil). The solid lipid nanoparticles were prepared with 7.5% TTO using a method based on a very high pressure homogenization. The other compounds used terpinen-4-ol (terp-4-ol), Tween 80 (TW), Tiabendazol (TBZ), and Levamisol (LEV) were acquired from Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO USA). To dilute solutions at different concentrations, distilled water was used, and to facilitate the dilution of TTO and Terp-4-ol, TW was used as an emulsifier.

### *Analysis of TTO and nanoTTO*

The composition and yield of the oil were analyzed using gas chromatography (GC) by means of the system Agilent Technologies 6890N GC- FID, equipped with a DB-5 capillary column. The relative concentrations of the components of the oil were calculated from the GC peak areas without the use of correction factors and their identifications were based on the retention index, comparing with the search library of Adams mass spectrum (1995). The nanoparticles obtained a total solids concentration of 18.6% and the particle size and the zeta potential were measured on diluted samples (500x), using Zeta Sizer.

### *Haemonchus contortus*

The infective third stage larvae (L3) and eggs were obtained by means of a donor sheep, infected and maintained with a mono-specific pure culture of *H. contortus*. The eggs were recovered according to the methodology described by Coles *et al.*, (1992), modified by Biziminyera *et al.*, (2006). Feces were homogenized in water and filtered through a set of sieves (250, 75, 43, 25  $\mu\text{m}$ ), and the eggs were separated by means of centrifugation (in 3000 rpm, for 5 minutes) with a sodium chloride saturated solution. After this step, the eggs were washed and used in the study. The L3 were obtained by stool test (fecal culture), following

the technique of Roberts and O'Sullivan modified by Ueno & Gonçalves, (1994); larvae were stored for a maximum of 21 days at room temperature until the performance of the tests. The experimental protocol was approved by Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Ethics Committee on Animal Use) of Universidade Federal de Santa Maria, under registration number 043/2014.

#### *Larval Hatch Test (LHT)*

This *in vitro* test was based on the method described by Coles et al., (1992) and standardized by Von Samson-Himmelstjerna *et al.*, (2009), and assesses the ovicidal activity of the tested solutions. Five concentrations of TTO, NanoTTO and Terp-4-ol (3.5; 1.7; 0.85; 0.4; 0.2 mg/mL) were prepared. In addition, three controls were done: negative control, with distilled water; positive control, with a solution of 0.05 µg of TBZ; and a control with TW. A suspension of 500 µL containing approximately 100 eggs was distributed in cell culture plates of 24 wells; afterwards, 500 µL of the test solutions were added per well. Subsequently, the plates were incubated in an oven for 24 hours at 27°C. After the incubation period, drops of low Lugol (1%) were added to each well, and the eggs and larvae of first stage (L1) were quantified using an inverted optical microscope reading and a 10x objective. The test was validated when the negative control and the control of TW had a greater than 90% hatching. To calculate the percentage of inhibition of larval hatching (Coles *et al.*, 2006), the formula  $(\%) \text{ inhibition} = (A - B) / (A) \times 100$  was used, where: A = % of larvae hatched in the negative control and B = % of hatching in test solutions. The tests were performed in sextuplicate.

#### *Larval Migration Inhibition Test (LMIT)*

This test determines the larvicidal effect of the test substances, by assessing the motility and/or migration of infective larvae (L3) according to the methodology described by Demeler *et al.*, (2010). For testing, a serial dilution of TTO, NanoTTO and Terp-4-ol was performed in five concentrations (56; 28; 14; 7; 3.5 mg/mL). In addition, three controls were prepared: negative control, with distilled water; positive control, with a solution of 20 µg de LEV; and a control with TW. Before starting the test, L3 were drawn with a solution of sodium hypochlorite (0.3%). Approximately 150 larvae were incubated in a greenhouse in different concentrations in quadruplicate, for 24 hours at 28°C (using rows A and C of cell culture plates of 24 wells) in a final volume of 1000 µL per well. After the first 24 hours, the 1000 µL of each well were withdrawn, and 25 µm sieves were mounted on wells. In each well a 1000 µL aliquot of the solution containing the larvae was repositioned, incubating again at

28°C for 24 hours. After the second incubation, the sieves were carefully removed and the remaining larvae that did not migrate were washed with distilled water in the well just below the one that was used (rows B and D). Finally, the migrating larvae (rows A and C) and those that did not migrate (rows B and D) were read in the inverted optical microscope at 10X magnification. The percentage of inhibition of larval migration was calculated by the inhibition formula (%) =  $(A - B) / A \times 100$ , where: A = number of larvae migrating in the negative control and B = number of larvae migrating in the corresponding treatments.

#### *Statistical analysis*

Data were subjected to post hoc Tukey's one-way analysis of variance (ANOVA) to verify the accuracy of the data. Significant values of  $p < 0.05$  were considered. Then, the dose-response curve and LC50 were described, calculated from Graphpad Prism 5.0.

## **Results**

#### *Characterization of TTO and of nanoTTO*

Fifteen components were identified in TTO, representing 95.86% of the total composition. As demonstrated in Table 1, the results indicated that the most representative compounds were terpinen-4-ol (41.98%), followed by  $\gamma$ -terpinen (20.15 %),  $\alpha$ -terpinene (9.85%), 1,8-cineole (6.03%) and terpinolene (4.15%). The physicochemical properties of the TTO nanostructure were determined: particle size was  $287 \pm 2$  nm, polydispersity rate of  $0.203 \pm 0.022$ , demonstrating uniformity in size of the nano particles and zeta potential of  $-14.2 \pm 1.7$  mV, indicating that the nanostructure has a negative electrical charge, and a good stability and suitability of the nano system.

#### *LHT*

The mean percentages of hatching and hatching inhibition are described in Table 2. The negative control and the TW control had a hatching of 94.11% and 91.35%, respectively, validating the test performed, and proving that the TW had no effect on the eggs. All solutions tested, in the four highest concentrations, demonstrated the inhibition of hatching of larvae of *H. contortus* compared to the control, and in the highest concentration (3.5 mg/mL), TTO and terp-4ol obtained a total inhibition (100%) at hatching of the larvae equal to the TBZ, which was used as positive control for this test. NanoTTO, in its highest concentration, obtained



lesser inhibition with 82.63%, thereby showing a lower activity at all the concentrations compared to TTO and terp-4-ol.

From the dose-response curve chart of LHT (Figure 1), LC50 and LC90 can be seen, where TTO obtained the lowest concentration 0.43mg/mL (LC50) and 1.75mg/mL (LC90), thereby being considered as the most effective solution tested. Then again, with approximate data, terp-4-ol showing, 0.63mg/mL (LC50) and 3.12mg/mL (LC90), and lastly, with a lower activity, since it requires a higher concentration, nanoTTO with 1.81 mg/mL (LC50) and 6,29 mg/mL (LC90).

### *LMIT*

From Table 3, it is possible to observe the mean percentages of migration and inhibition of migration of solutions used. This test can also be validated, since the negative and TW controls had a migration of 93.51% and 91.07%, respectively, suggesting that the larvae used were viable. TTO and nanoTTO had a similar activity on the inhibition of larval migration, whereas in the higher concentrations the inhibition percentages were 88.04% and 83.80%, respectively. This result was similar to that observed in the positive control with LEV (20 µg/mL), with an inhibition of 86.03%, with no significant differences. As for the low concentrations, there was a reduced inhibition of 20.56% (TTO) and 19.51% (nanoTTO) and it was possible to notice a certain effect on the larvae when comparing these values with the value of the negative control (6.49% of migration inhibition).

In tests with terp-4-ol, no difference was noticed in larval migration for the different concentrations tested 85.74%; 84.95%; 84.72%; 84.69% and 82.40% in the respective concentrations of 56; 28; 14; 7; 3.5 mg/mL. This inhibition was equivalent to positive control (LEV), namely, terp-4-ol had a large effect on larvae, which is higher when compared to TTO and nanoTTO.

Figure 2 shows a graph of the dose-response curve in LMIT, where it is possible to observe again, that TTO and nanoTTO obtained a similar activity under the larvae with 10.68mg/mL (LC50), 60,32mg/mL (LC90) and 12.64 mg/mL (LC50), 111,9mg/mL (LC90), respectively. It was not possible to calculate LC50 and LC90 of terp-4-ol because its action at a lower concentration (3.5 mg/mL) was higher than 50% inhibition.

## Discussion

The *M. alternifolia* oil is commonly marketed in the pharmaceutical and cosmetic industries and there are a number of standards to define and limit the variation observed in this heterogeneous mixture (Hammer *et al.*, 2006). Currently, the composition of the TTO is regulated by an international standard, which defines maximum and/or minimum values for 14 components of the oil, ISO 4730 (International Standards Organization 1996). In this study, the phytochemical characterization of the oil confirms its suitability, besides verifying the high concentration of its major compound, terpinen-4-ol. This compound has been appointed to be responsible for several therapeutic functions performed by the essential oil of *M. alternifolia*. There are reports of its action against *Pediculus humanus*, *Sarcoptes scabiei*, *Bovicola ovis*, among others (Priestley *et al.*, 2006; Walton *et al.*, 2004; James & Callander, 2012).

The use of essential oils represents other option of phytotherapeutic approach and are between the substance classes that reported antiparasitic activity (Anthony *et al.*, 2005), and the essential oil of *M. alternifolia* has an extensive medicinal activity already consolidated. In the literature, there are reports of action against protozoa as: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* and *Trichomonas vaginalis* (Viollo *et al.*, 1996; Mikus *et al.*, 2000; Baldissera *et al.*, 2014) and ectoparasites, *Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei*, *Lucilia cuprina*, *Bovicola ovis* and *Rhipicephalus microplus* (Walton *et al.*, 2004; Neves *et al.*, 2012; Callander & James, 2012; Pazinato *et al.*, 2014), but studies on action on endoparasites are still insufficient. Payne *et al.* (2013), when assessing the action of extracts of Australian native plants on the larval development of cyathostominae of horses, observed a small activity of plants of the genus *Melaleuca*, such as *M. artroviridis*, *M. stereophloia* and *M. uncinata*.

To date, studies with an anthelmintic effect of TTO in gastrointestinal nematodes of sheep are unknown, but this study showed that TTO and terp-4-ol showed an ovicidal effect, inhibiting the full hatching of larvae (100%) at the highest dose tested (3.5 mg/mL). Many studies have been performed to assess the *in vitro* efficacy of products with anthelmintic activity; according to the recommendations by the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.), potential anthelmintics are considered highly effective if their efficacy exceeds 98 %, effective if they average in the range 90-98 %, moderately effective in the range 80-89 % and ineffective if efficacy is less than 80 % (Wood *et al.*, 1995). Therefore, TTO and terp-4-ol were highly effective against eggs, and moderately effective against the larvae of *H. contortus*.

There are several studies assessing the efficacy of different plant extracts using LHT and LMIT. The essential oils of *Eucalyptus citriodora* and of *Eucalyptus globulus* have already been described with a reduction in the hatching of larvae of 98.8% and 99.3%, respectively (Macedo *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2011); the aqueous leaf extract of soursop (*Annona muricata*) showed an inhibition of 89.08% in the larval migration when tested at a concentration of 12% (Ferreira *et al.*, 2013), similar to the results found in this study. In a study of 40 medicinal plants at a concentration of 50 mg/mL, the extracts of *Ericameria nauseosa* and *Rhus aromática* were those with the highest level of inhibition of larval migration with 75.2% and 67.6%, respectively (Acharya *et al.*, 2014), a larvicidal effect being lower than in the TTO, nanoTTO and in terp-4-ol in the concentrations of 56 and 28 mg/mL.

In some experiments, wherein the phytotherapy medicines exhibit activity on eggs and larvae, the LC50, LC90 and LC95 are described. This fact should be taken into account, because the higher the concentration the greater the amount of material required to achieve the desired effect. The LC50 and LC90 for the inhibition of hatching of larvae found were 0.43; 1.81; 0.63 mg/mL and 1.75; 6.29; 3.12 mg/mL for TTO, nanoTTO and terp-4-ol, respectively. This LC50 can be classified as low if it is taken into consideration what Silveira *et al.* (2012), when testing *Agave sisalana* on the eggs, found a LC50 of 6.9 mg/mL and LC95 of 24.79 mg/ml, ready LC50 found is equivalent to LC90 of nanoTTO, demonstrating that *A. sisalana* showed a lower activity. Kamaraj & Abdul (2011) obtained a LC50 of 5.32 mg/mL when assessing *Solanum torvum*, as for Katiki *et al.* (2011) they found a LC50 of only 0.04 mg/mL when assessing the essential oil of *C. schoenanthus* against trichostrongylidae parasites.

Zhu *et al.* (2013) performed an experiment similar to this one, using the essential oil of *Artemisia lancea* and their major constituents, 1,8-Cinelone and Camphor. The oil of *A. lancea* and 1,8-Cinelone at a dose of 10 mg/mL, had an ovicidal activity of 99.4% and 74.8% and a LC50 of 1.82 and 4.64 mg/mL, respectively. When comparing the results obtained in this study, it can be said that the solutions tested had more action, since the inhibition of hatching was 100% in the concentration of 3.5 mg/mL, and that the LC50 were 0.52 and 0.78 mg/mL for TTO and terp-4-ol, respectively. For the inhibition of larval migration, terp-4-ol also demonstrated higher activity in relation to 1,8-Cinelone, which showed an inhibition of only 60.3% at the dose of 10 mg/mL, and it should be kept in mind that at the dose of 3.5 mg/mL (lower dose assessed), terp-4-ol inhibited 82.40% of the migration of the larvae of *H. contortus*.

Because there are no reports of action of TTO on nematodes, the action mechanism related to the effect on *H. contortus*, demonstrated in this work, is still unknown. However, most of the components of this oil are terpenes, and these types of compounds have an ecological importance as pesticides to plants and have already been isolated and assessed for their toxicity against different insects in their larval and adult forms (Júnior, 2003). The mechanism of acaricide action of this oil has not been elucidated either; however, Barker & Altman (2011) suggested that the death of the mites is by asphyxiation, by blocking the respiratory spiracles. Another possible mechanism of action described in antiprotozoal activity is related to sesquiterpenes; Saeidnia *et al.* (2013) claim that these compounds target the mitochondria, leading to increased oxygen reactive species, causing damage to the cell membrane and DNA, resulting in the death of the parasite (Desoti *et al.*, 2012; Saeidnia *et al.*, 2013).

NanoTTO showed a weaker action at the highest dose, compared with the TTO and terp-4-ol, with an inhibition of hatching of 82.63%. However, taking into account the duration of the LHT, this minor action can be justified, since the TTO nanoparticles have a characteristic of slow and gradual release, as observed by Zanoto-Filho *et al.* (2013), where the test substance in its free form quickly reached peak concentrations; as for the nanoparticles, they showed a gradual release, but their serum levels remained for a longer time. Other tests of a longer duration or even *in vivo* tests are necessary to better assess the action of nanoTTO; in addition, *in vitro* tests do not estimate 100% activity *in vivo* of an anthelmintic compound.

## Conclusions

The essential oil of *M. alternifolia* in free and nanostructured forms, as well as its main component, Terpinen-4-ol, had a positive effect on the inhibition of hatching and the migration of the larvae of *H. contortus*. Terpinen-4-ol showed excellent results and can be considered as one of the compounds responsible for the activity displayed by the oil. The therapeutic success demonstrated in this study suggests that the essential oil of *M. alternifolia*, terpinen-4-ol and, mainly, the nanostructured form obtained from the oil, can be targeted in *in vivo* studies, besides being a promising line of research within the control and treatment of endoparasitism, which is one of the biggest problems facing the world sheep industry.

## References

- Acharya, J., Hildreth, M.B. & Reese, R.N.** (2014) *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **201**, 75-81.
- Adams, R.P.** (1995) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA. 456p.
- Anthony, J.P., Fyfe, L. & Smith, H.** (2005) Plant active components—a resource for antiparasitic agents? *Trends. Parasitol.* **21**, 462–468.
- Athanasiadou, S. & Kyriazakis, I.** (2004) Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 631-639.
- Baldissera, M.D., Da Silva, A.S., Oliveira, C.B., Santos, R.C., Vaucher, R.A., Raffin, R.P., Gomes, P., Dambros, M.G., Miletto, L.C., Boligon, A.A., Athayde, M.L. & Monteiro, S.G.** (2014) Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model, *Exp. Parasitol.* **141**, 21-27.
- Barker, S.C., Altman & P.M.** (2011) An *ex vivo*, assessor blind, randomized, parallel group, comparative efficacy trial of the ovicidal activity of three pediculicides after a single application-melaleuca oil and lavender oil, eucalyptus oil and lemon tea tree oil, and a “suffocation” pediculicide. *BMC Dermatol.* **11**, 2–7.
- Bizimenyera, E.S., Githiori, J.B., Eloff, J.N. & Swan, G.E.** (2006) *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* **142**, 336-343.
- Bowman, D.D., Georgi, J.R. & Lynn, R.C.** (2003) *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. 8ed. Saunders Publishing Company. St. Louis. Missouri. p.422.
- Budhiraja, S.S., Cullum, M.E., Sioutis, S.S., Evangelista, L. & Habanova, S.T.** (1999) Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. *J Manipulative Physiol Ther.* **22**, 447-453.
- Caldefie-Che'zet, F., Fusillier, C., Jarde, T., Laroye, H., Damez, M., Vasson, M.P. & Guillot, J.** (2006) Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother. Res.* **20**, 364–370.
- Callander, J.T. & James, P.J., 2012.** Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. *Vet. Parasitol.* **184**, 271–278.
- Carson, C.F. & Riley, T.V.** (1993) Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 49–55.
- Coles, G.C., Bauerb, C., Borgsteedec, F.H.M., Geertsd, S., Kleie, T.R., Taylora, M.A. & Wallerf, P.J.** (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **44**, 35-44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre, A., Taylor, M.A. & Vercruysec, J.** (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **136**, 167-185.
- Corwin, R.M.** (1997) Economics of gastrointestinal parasitism in cattle. *Vet. Parasitol.* **72**, 451-460.
- Demeler, J., Küttlerb, U., El-Abdellatic, A., Staffordd, K., Rydzike, A., Varadyf, M., Kenyong, F., Colesd, G., Höglunde, J., Jacksong, F., Vercruysec, J. & von Samson-Himmelstjerna, G.** (2010). Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Vet. Parasitol.* **174**, 58–64.

- Desoti, V.C., Lazarin-Bidóia, D., Sudatti, D.B., Pereira, R.C., Alonso, A., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Nakamura, C.V. & Silva, S.O.** (2012) Trypanocidal action of (-)- elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. *Mar. Drugs* **10**, 1631–1646.
- Fernandes, L.H., Seno, M.C.Z., Amarante, A.F.T., Souza, H. & Belluzzo, C.E.C.** (2004) Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. *Arq. Bras. Vet. Zootec.* **56**, 733-740.
- Ferreira, L.E., Castro, P.M., Chagas, A.C., França, S.C. & Belebony R.O.** (2013) *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Exp. Parasitol.* **134**, 327-332
- Furneri, P.M., Paolino, D., Saija, A., Marino, A. & Bisignano, G.** (2006). *In vitro* antimycoplasmal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 706–707.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T.V.** (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 853–860.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. & Nielsen J.B.** (2006) A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 616-625.
- Hart, P.H., Brand, C., Carson, C.F., Riley, T.V., Prager, R.H. & Finlay-Jones, J.J.** (2000). Terpin-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.* **49**, 619–626.
- Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S. & Wanner, M.** (2002) Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitol.* **125**, 65–70.
- Irache, J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M. & Espuelas, S.** (2011) Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology.* **180**, 47-71.
- ISO 4730.** International Standards Organization. 1996. Oil of *Melaleuca*, terpinen- 4-ol type (tea tree oil).
- James, P.J. & Callander, J.T.** (2012) Bioactivity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against sheep lice (*Bovicola ovis* Schrank) *in vitro*. *Vet. Parasitol.* **187**, 498–504.
- Junior C.V.** (2003) Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova.* **26**, 390-400.
- Kamaraj, C. & Abdul, R.A.** (2011) Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* **91**, 400-404.
- Katiki, L.M., Chagas, A.C.S., Bizzo, H.R., Ferreira, J.F.S. & Amarante, A.F.T.** (2011) Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Vet. Parasitol.* **183**, 103–108.
- Macedo, I.T., Bevilaqua, C.M.L., Oliveira, L.M.B., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Vieira, L.S., Oliveira, F.R., Queiroz Júnior, E.M., Portela, B.G., Barros, R.S. & Chagas, A.C.S.** (2009) Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **18**, 62-66.
- Macedo, I.T., Bevilaqua, C.M., Oliveira, L.M., Camurça-Vasconcelos, A.L., Vieira Lda S. & Amóra Sdos, S.** (2011) Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **20**, 223-227.
- Mikus, J., Harkenthal, M., Steverding, D. & Reichling, J.** (2000) *In vitro* effect of essential oils and isolated mono – and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med.* **66**, 366–368.

- Molento, M.B., Tasca, C., Gallo, A., Ferreira, M., Bononi, R. & Stecca E.** (2004) Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em Pequenos ruminantes. *Cienc. Rural.* **34**, 1139-1145.
- Mulla, M.S. & Su T.** (1999) Activity and biological effects of NET products against arthropods of medical and veterinary importance. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **15**, 133–152.
- Neves, R.C.S.M., Ferraz, R.H.S., Mendonça, A.J., Lima, S.R. & Barros, L.A.** (2012) Acaricide effect of the *Melaleuca alternifolia* essential oil on *Otodectes cynotis*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **19**, 144–148.
- Payne, S.E., Kotze, A.C., Durmic, Z. & Vercoe P.E.** (2013) Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins *in vitro*. *Vet. Parasitol.* **196**, 153-60.
- Pazinato, R., Klauck, V., Volpato, A., Tonin, A.A., Santos, R.C., de Souza, M.E., Vaucher, R.A., Raffin, R., Gomes, P., Felippi, C.C., Stefani, L.M. & Da Silva A.S.** (2014) Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* **63**, 77-83.
- Priestley, C.M., Burgess, I.F. & Williamson, E.M.** (2006) Lethality of essential oil constituents towards the human louse *Pediculus humanus* and its eggs. *Fitoterapia.* **77**, 303–309.
- Roco, M.C.** (2001). International strategy for nanotechnology research and development. *J. Nanopart. Res.* **3**, 353–360.
- Saeidnia, S., Gohari, A.R. & Haddadi A.** (2013) Biogenic trypanocidal sesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs – a mini review. *J. Pharm. Sci.* **21**, 35–44.
- Silveira, R.X., Chagas, A.C.S., Botura, M.B., Batatinha, M.J.M., Katiki, L.M., Carvalho, C.O., Bevilaqua, C.M.L., Branco, A., Machado, E.A.A., Borges, S.L. & Almeida, M.A.O.** (2012) Action of sisal (*Agave sisalana*, Perrine) extract in the *in vitro* development of sheep and goat gastrointestinal nematodes. *Exp. Parasitol.* **131**, 162-168.
- Torres-Acosta, J.F.J. & Hoste, H.** (2008) Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rum. Res.* **77**, 159-173.
- Ueno, H. & Gonçalves, P.C.** (1994) Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 3. Ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency. 166p.
- Verma, R.K. & Garg, S.** (2001) Current status of drug delivery technologies and future directions. *International Research Journal of Pharmacy.* **25**, 1–14.
- Viollon, C.D., Mandi, D. & Chaumont, J.P.** (1996) Activitiés antagonists, *in vitro*, de quelques huiles essentielles et de composes naturelles volatils vis á vis de la croissance de *Trichomonas vaginalis*. *Fitoterapia* **67**, 279–281.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G.C., Jackson, F., Bauer C., Borgsteede, F., Cirak, V.Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruyse, J. & Wirtherle, N.** (2009) Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Res.* **105**, 825–834.
- Walton, S.F., Mckinnon, M., Pizzutto, S., Dougall, A., Williams, E. & Currie, B.J.** (2004) Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil – *in vitro* sensitivity of *Sarcoptes scabiei* var *hominis* to terpinen-4-ol. *Arch. Dermatol.* **140**, 563–566.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B.Jr., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O. & Taylor S.M.** (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in 20 ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* **58**, 181-213.

- Zanotto-Filho, A., Braganhol, E., Edelweiss, M.I., Behr, G.A., Zanin, R., Schröder, R., Simões-Pires, A., Battastini, A.M., Moreira, J.C.** (2012) The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth *in vitro* and in preclinical model of glioblastoma. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 591-601.
- Zhu, L., Dai, J.L., Yang, L., Qiu, J.** (2013) *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Vet. Parasitol.* **195**, 112-117.



Table 1 Qualitative and quantitative analysis of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, using gas chromatography (GC) by means of the system Agilent Technologies 6890N GC- FID, equipped with a DB-5 capillary column.. The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages. The benchmarks used are from the *International Organization for Standardization* (ISO) number 4730.

Compounds	(%) Qty	(%) Standard -ISO 4730-
$\alpha$ -Pinene	3,51	1 – 6
Sabinene	0,46	Tr – 3,5
$\alpha$ -Terpinene	9,85	5 – 13
p-Cymene	2,27	0,5 – 8,0
Limonene	1,39	0,5 – 1,5
1.8-Cineole	6,03	Tr – 15
$\gamma$ -Terpinene	20,15	10 – 28
Terpinen-4-ol	41,98	30 – 48
Terpinolene	4,17	1,5 – 5
$\alpha$ -Terpineol	2,43	1,5 – 8
Aromadendrene	1,04	Tr – 3
Ledene	0,80	Tr – 3
$\delta$ -Cadinene	0,63	Tr – 3
Globulol	0,97	Tr – 1
Viridiflorol	0,18	Tr – 1
<b>Total identified (%)</b>	<b>95,86</b>	

Tr = Traces

Table 2 Percentage of larval hatching (mean  $\pm$  SD) of the controls and the percentage of the inhibition of hatching (mean  $\pm$  SD) of the controls, of the essential oil of *M. alternifolia* (TTO), nanoparticle of essential oil of *M. alternifolia* (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol).

Concentration (sextuplicate)	(%) Hatching	(%) Inhibition of hatching		
		TTO	NanoTTO	Terp-4-ol
Negative control	94,11 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	5,89 $\pm$ 1,57 <sup>e</sup>	5,87 $\pm$ 1,57 <sup>fg</sup>	5,89 $\pm$ 1,57 <sup>f</sup>
TW (0,1 %)	91,35 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	8,65 $\pm$ 0,55 <sup>e</sup>	8,65 $\pm$ 0,55 <sup>f</sup>	8,65 $\pm$ 0,55 <sup>f</sup>
TBZ (12,5 g/mL)	0,0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	100,0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100,0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100,0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
3,5 mg/mL		100,0 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	82,63 $\pm$ 3,63 <sup>bB</sup>	100,0 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>
1,7 mg/mL		98,04 $\pm$ 1,24 <sup>aA</sup>	41,52 $\pm$ 2,59 <sup>cC</sup>	82,80 $\pm$ 3,34 <sup>bB</sup>
0,8 mg/mL		62,90 $\pm$ 4,37 <sup>bA</sup>	21,19 $\pm$ 4,07 <sup>dC</sup>	51,21 $\pm$ 6,34 <sup>cB</sup>
0,4 mg/mL		53,45 $\pm$ 7,36 <sup>cA</sup>	15,22 $\pm$ 3,95 <sup>eC</sup>	36,42 $\pm$ 6,68 <sup>dB</sup>
0,2 mg/mL		20,24 $\pm$ 2,36 <sup>dA</sup>	3,50 $\pm$ 2,96 <sup>fgB</sup>	20,94 $\pm$ 4,96 <sup>eA</sup>
0,1 mg/mL		9,99 $\pm$ 2,12 <sup>eA</sup>	2,77 $\pm$ 2,75 <sup>gC</sup>	10,08 $\pm$ 2,28 <sup>fA</sup>

Means followed by the same lowercase letters in the same column and means followed by the same capital letters in the same row have no statistical difference using Tukey's test for  $p < 0.05$ .

Table 3 Percentage of larval migration (mean  $\pm$  SD) of the controls and the percentage of the inhibition of larval migration (mean  $\pm$  SD) of the controls, of the essential oil of *M. alternifolia* (TTO), nanoparticle of essential oil of *M. alternifolia* (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol).

Concentration (quadruplicate)	(% ) Migration	(% )Inhibition of migration		
		TTO	NanoTTO	Terp-4-ol
Negative control	93,51 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	6,49 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	6,49 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	6,49 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
TW (3%)	91,07 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	8,92 $\pm$ 2,25 <sup>e</sup>	8,92 $\pm$ 2,25 <sup>e</sup>	8,92 $\pm$ 2,25 <sup>b</sup>
LEV (20 $\mu$ g/mL)	13,97 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>	86,03 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	86,03 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	86,03 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>
56 mg/mL		88,04 $\pm$ 2,96 <sup>a A</sup>	84,80 $\pm$ 4,42 <sup>a A</sup>	85,74 $\pm$ 6,66 <sup>a A</sup>
28 mg/mL		73,03 $\pm$ 1,12 <sup>b B</sup>	67,28 $\pm$ 5,96 <sup>b B</sup>	84,95 $\pm$ 4,56 <sup>a A</sup>
14 mg/mL		66,58 $\pm$ 2,89 <sup>b B</sup>	48,73 $\pm$ 4,79 <sup>c C</sup>	84,72 $\pm$ 1,62 <sup>a A</sup>
7 mg/ml		31,39 $\pm$ 8,71 <sup>c B</sup>	40,83 $\pm$ 3,39 <sup>c B</sup>	84,69 $\pm$ 1,78 <sup>a A</sup>
3,5 mg/mL		20,56 $\pm$ 4,91 <sup>d B</sup>	19,51 $\pm$ 3,13 <sup>d B</sup>	82,40 $\pm$ 7,72 <sup>a A</sup>

Means followed by the same lowercase letters in the same column and means followed by the same capital letters in the same row have no statistical difference using Tukey's test for  $p < 0.05$

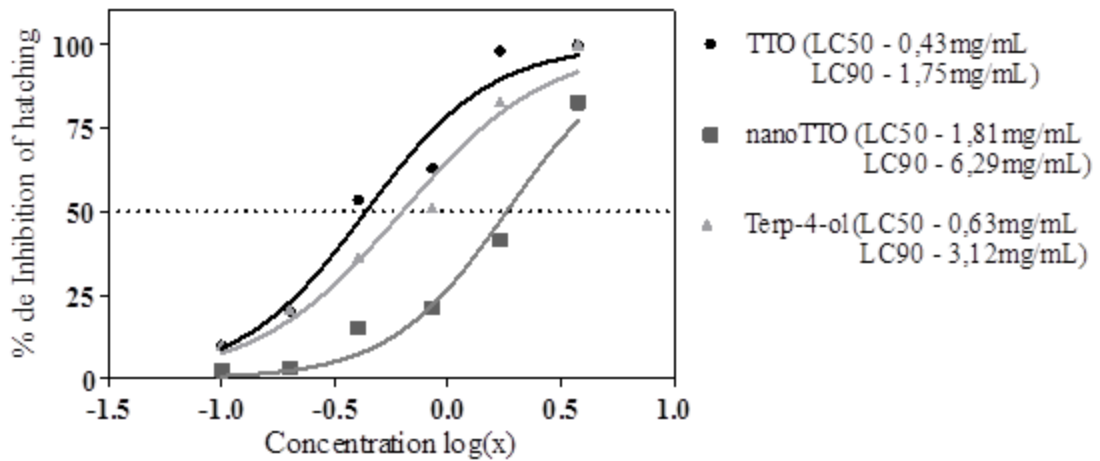


Figure 1 Dose-response curve of the activity of the essential oil of *M. alternifolia* (TTO), essential oil nanoparticle of *M. alternifolia* (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol) on *H. contortus*, from the Egg Hatch Assay (EHA). The LC50 and LC90 of the tested solutions are exhibited by the legend.

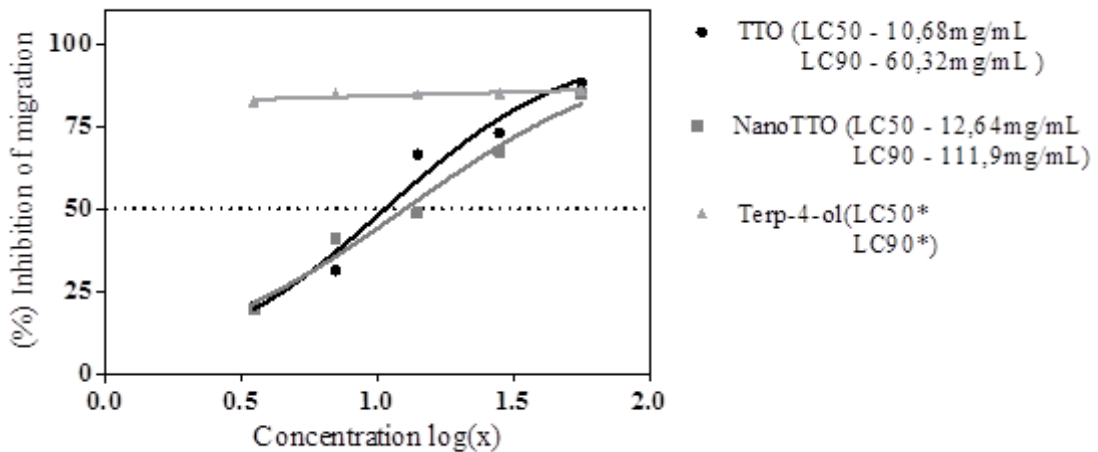


Figure 2 Dose-response curve of the activity of the essential oil of *M. alternifolia* (TTO), essential oil nanoparticle of *M. alternifolia* (NanoTTO) and of terpinen-4-ol (Terp-4-ol) on *H. contortus*, from Larval Migration Inhibition Assay (LMIA). The LC50 and LC90 of the tested solutions are exhibited by the legend.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que o óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) tanto livre como nanoestruturado e seu componente majoritário, o Terpinen-4-ol apresentaram atividade ovicida e larvicida sobre o *H. contortus*.

A atividade ovicida foi mais evidente, sendo que o óleo essencial de melaleuca e o Terpinen-4-ol apresentaram uma eficácia de 100% na menor dose testada que foi de 3,5mg/ml.

O efeito do nanocarreador lipídico feito a partir do óleo essencial de melaleuca demonstrou que a nanotecnologia pode ser uma alternativa na pesquisa por novos tratamentos de nematoides, porém estudos aprofundados sobre as metodologias e custos para a produção dessas nanoestruturas ainda devem ser melhor elucidados.

Para uma melhor compreensão dos verdadeiros efeitos dessas substâncias sobre o *H. contortus*, poderiam ser realizados novos testes, avaliando-se a atividade larvicida por meio de outras metodologias, utilizar outras concentrações das substâncias e avaliar o efeito dos outros compostos do óleo essencial de melaleuca e a interação entre eles.

Por fim, o óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) livre e nanoestruturado, e o Terpinen-4-ol podem ser utilizados em estudos *in vivo*, sendo uma linha de pesquisa promissora no controle e tratamento do *H. contortus* e das endoparasitoses gastrointestinais de ovinos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A. F. T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: Mattos, W. R. S. (Ed.): A produção animal na visão dos brasileiros. Piracicaba: **Fealq/SBZ**, p. 461-473, 2001.

AMARANTE, A. F. T. et al. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Vet. Parasitol.** v.120, p.91-106, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Nematoides gastrintestinais em ovinos. In: CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S; MOLENTO, M.B., ed. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 19-61. 2009.

ATHANASIADOU, S. et al. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal.** v.1, n.9, p.1392-1400, 2007.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 4, p. 631-639, 2004.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology** v. 46, p. 446-475, 2008.

BALDISSERA, M. D., et al. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Exp. Parasitol.** v.141, p.21-27, 2014.

BUDHIRAJA S. S., et al. Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. **J Manipulative Physiol Ther.** v.22 p.447-453; 1999.

CEZAR A.S., et al. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Vet. Parasitol.** 173:157, 2010.

CALDEFIE-CHEZET, F. et al. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytother. Res.** v.20, p.364-370, 2006.

CALLANDER, J. T.; JAMES, P. J., Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. **Vet. Parasitol.** v.184, p. 271–278, 2012.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F et al. Anthelmintic activity 1 of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology.** v.154, p.167-170, 2008.

CARSON C.; RILEY T. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Appl Bacteriol.**v.78 p.264-269; 1995.

CARVALHO, E. B. de. et.al. Base para Criação de Ovinos no Estado de São Paulo. São Paulo: **Aspaco**, p. 41-42, 1993.

CHAGAS A. C. S.; NICIURA S. C. M.; MOLENTO M. B.. Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF. 153p. 2011.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **Trends in Parasitology**, v.17, p.325-330. 2001.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS ,I. Nutrition - parasite interaction. **Veterinary Parasitology** v.84 p.187-204, 1999.

COSTA, R. L. D. et al. Performance and nematode infection of ewe lambs on intensive rotational grazing with two different cultivars of *Panicum maximum*. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.39, p.255-263, 2007.

COX S. D., MANN C. M., MARKHAM J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Appl Microbiol.** v.91 p.492-497; 2001.

DEMELER J. et al. Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Vet. Parasitol.** v.61 p.614-618, 2012.

DEMELER, J., et al. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Vet. Parasitol.** v.174 p.58–64, 2010.

DÍAZ, M. A. A. et al. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.** v 181. P.360 - 364, 2011.

DORNELLES, W. J. M. Ovinocultura de lã e carne: uma verdade que voltou a ser evidenciada. **A hora veterinária**, n.130, p.6-8, 2002.

DRUDGE, J.H., et al. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **Am. J. Vet. Res.** 25, 1512-1518. 1964.

ECHEVARRIA, F. A. M. et al. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brasil. **Vet. Parasitol.** v.62, p.199-206, 1996.

EGUALE, T. et al. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **J. Ethnopharmacol.** v. 137, p.108-113, 2011.

EYSKER M.; PLOEGER H. W. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Parasitol.**v.120 p.109–119, 2000.

FERNANDES, L. H. et al. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arq. Bra. Med. Vet. Zoot.** v.56, p.733-740, 2004.

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

JAMES, P.J. & CALLANDER, J.T. Bioactivity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against sheep lice (*Bovicola ovis* Schrank) *in vitro*. **Vet. Parasitol.** 187, 498–504, 2012.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V., Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **J. Appl. Microbiol.** v.95, p.853–860, 2003.

HART, P. H., et al. Terpin-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflamm. Res.** v.49, p.619–626, 2000.



HENNON, P. S. **Les résistances aux anthelminthiques: synthèse bibliographique des connaissances actuelles.** 1993. 133p. Tese (Doutorado). École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, 1993.

IRACHE J. M., et al. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Vet. Parasitol.** 180:47-71, 2011.

ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochem. Rev.** v.10, p.197–204, 2011.

KNOX, M. R. et al. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. **Vet. Parasitol.** v.139, p.385-393, 2006.

KURIEN, B. T. et al. Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. **Ass. Drug Devel. Technol.** v. 5, p. 567-576, 2007.

Le JAMBRE, L. F. Pre-mating barriers in hybrid *Haemonchus*. **I. J. Parasitol.** Oxford, v. 13, p. 371-375, 1983.

LOW W. L. et al. Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Let. Applied Microbiol.** v.57, p.33- 39, 2013.

MACEDO, I. T. F. et al. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globules* sobre *Haemonchus contortus*. **Ver. Bra. Parasitol. Vet.** v.18, n.3, p.62-66, 2009.

MACHADO, M. et al. Os óleos essenciais como agentes anti-parasitários. **Rev Fitoterap.** v.10, n.1, p.35-44, 2010.

MARTIN P. J.; ANDERSON N.; JARRETT R. G. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. **Aust. Vet. J.** v.66 p.236-240, 1989.

MAX, R. A. et. al. The effect of wattle tannin drenches on gastrointestinal nematodes of tropical sheep and goats during experimental and natural infections. **J. Agricult. Sci.** v.147, p.211-218, 2009.

MIKUS, J. et al. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono – and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosna brucei*. **Planta Med.** v.66, p.366–368, 2000.

MOLENTO M. B.; PRICHARD R. K. Effect of multigrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesq. Vet. Bras.** v.21 p.117-121, 2001.

MOLENTO M. B., et al. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Vet. Parasitol.** v.180 p.126-132, 2011.

MOLENTO, M. B. et al. Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciênc. Rur.** v.34, n.2, p.1139-1145, 2004

MONALISA J. et al. Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review. **Int J Basic Clin Pharmacol.** v.2 n.4 p.353-359, 2013.

MONTEIRO S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. Editora Roca; 2011.

MOTTIER, L.; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. **Rev Med. Vet.** Bogotá, v. 82, n. 2, p. 74-85, 2001.

NEVES, R. C. S. M., et al. Acaricide effect of the *Melaleuca alternifolia* essential oil on *Otodectes cynotis*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.19, p.144–148, 2012.

NINOMIYA K, et al. The Essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. **Biol Pharm Bull**, v. 35, p.861–865, 2012.

NOGUEIRA, D. M.; MOREIRA, J. N.; CARLOS, J. F. Avaliação de plantas medicinais no controle de nematódeos gastrintestinais em caprinos explorados em sistema de base agroecológica. **Rev Cient. Prod. Animal**, v.8, n.2, p.35-40, 2006.

O’CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KAHN, L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Vet. Parasitol.** Amsterdam, v. 142, p. 1-15, 2006.

OLIVEIRA, L. M. B. et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Vet. Parasitol.** v.159, n.1, p.55-59, 2009.

OLIVEIRA J. S., et al. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. **Afri. J. Biotechnology**. v.10, p. 13014-13018, 2011.

OLIVEIRA, L. D. R. **Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo*** 2013 Dissertação (Mestrado – Área Ciências animais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

OLIVEIRA, C. B. **Aceturato de diminazeno lipossomal no tratamento da infecção por *Trypanosoma evansi*: testes *in vitro* e *in vivo*** 2014 Tese (Doutorado – Área de Concentração em Reprodução e Sanidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

PAZINATO, R., et al. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Exp. Appl. Acarol.** 63, 77-83, 2014.

PERRY B. D., et al. **Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty**. ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Kenya. p.148, 2002).

RAMAN A.; WEIR U.; BLOOMFIELD S. F. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propioni bacterium*. **Lett Appl Microbiol.** v.21 p.242-245, 1995.

RODA, D. S et al. **Noções de manejo de ovinos**. Nova Odessa : Intituto de Zootecnia, p.63. (Boletim técnico, 21) 1986.

SANGSTER, N. et al. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. **Int. J. Parasitol.** v.32, p.637-653, 2002.

SAUPE, A.; RADES, T. **Solid lipid nanoparticles**. In: MOZAFARI, M. R.. Nanocarrier technologies: Frontiers of Nanotherapy, Holanda: Springer, p. 41-50, 2006.

SCZESNY-MORAES E.A., et al. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrointestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 30:229-236. 2010.

SILVA, L. Fitoterápicos no Controle de Endoparasitoses de Caprinos e Ovinos. **Rev. Brás. Hig. San. Anim.**, v. 1, n. 2, p. 37-43, 2007.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devise. **J. Control. Rel.** v. 70, p. 1-20, 2001.

SOTOMAIOR, C. S. et al. Parasitoses gastrintestinais dos Ovinos e Caprinos: alternativas de controle. Curitiba, PR: **Instituto Emater**. p. 36 2009.

SOUZA, G. A. F. **Avaliação do método famacha como estratégia auxiliar no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos no semiárido da Paraíba, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos – PB, 2011.

SOUZA, M. E. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de óleo de *Melaleuca alternifolia***. 2014. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Nanociência) – Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2014.

TADESSE, D. et al. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Maesa anceolata* and *Plectranthus punctatus* against *Haemonchus contortus*. **J. Ethnopharmacology**. 14 v.122, n.2, p.240–244, 2009.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. The effects of endspecific selection on the development of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep. **Vet. Parasitol.** v.109, p.29–43, 2002.

TORRES-ACOSTA J. F. J.; HOSTE H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Rum. Res.** v.77 p.159-173; 2008.

VASCONCELOS, A. L. C. F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippiasidoides* e *Crotonzehlntneri* sobre nematoides gastrintestinais de ovinos**. 2006 Tese (Doutorado – Área de Concentração em Reprodução e Sanidade Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

UENO T. E. H.; CURCI V. C. L. M.; MOLENTO M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Vet. Parasitol.** v.187 p.209-216, 2012.

VERÍSSIMO C.J., et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Vet. Parasitol.** 187:209-216. 2012.

VIDYASHANKAR A. N.; KAPLAN R. M. ; CHAN S. Statistical approach to measure the efficacy of anthelmintic treatment on horse farms. **Parasitology**. v.134 p.2027–2039, 2007.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R. Anthelmintic resistance in goat herds in the State of Ceará. **Pesq. Vet. Bras.** v.19, p.99-103, 1999.

VIOLLON, C. D.; MANDI, D.; CHAUMONT, J. P., Activitiés antagonists, *in vitro*, de quelques huiles essentielles et de composes naturelles volatils vis á vis de la croissance de *Trichomonas vaginalis*. **Fitoterapia** v.67, p.279–281, 1996.

Von SAMSON-HIMMELSTJERNA, et al. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitol. Res.** v.105, p.825–834, 2009.

WALLER, P. J. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **Int J Parasitol** 29, 155–164; 1999.

WALTON, S. F., et al. Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil – *in vitro* sensitivity of *Sarcoptes scabiei* var hominis to terpinen-4-ol. **Arch. Dermatol.** v.140, p.563–566, 2004.

WINK, M., Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoret. App. Genetics** v.75, p.225–233, 1988.

YANG Y.C., et al. Ovicidal and aduIticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculicidae). **Int J Parasitol** v.35 p.1595–1600, 2005.

ZHU, L. et al. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of 1 *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Vet. Parasitol.** v.195, n.1-2, p.112-3 117, 2013.