

ATIVIDADE NEMATICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE AROEIRA VERMELHA
(*Schinus terebinthifolia* Raddi) E LIMONENO CONTRA NEMATÓIDES
GASTROINTESTINAIS DE OVINOS

VIVIANE MOITIM PEREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes -RJ

Fevereiro de 2025

ATIVIDADE NEMATICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE AROEIRA VERMELHA
(*Schinus terebinthifolia* Raddi) E LIMONENO CONTRA NEMATÓIDES
GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

VIVIANE MOITIM PEREIRA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia e
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Clóvis de Paula Santos

Campos dos Goytacazes -RJ

Fevereiro de 2025

P436

Pereira, Viviane Moitim.

Atividade nematicida do óleo essencial de aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolia Raddi*) e limoneno contra nematoides gastrintestinais de ovinos. / Viviane Moitim Pereira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

58 f. : il.

Bibliografia: 52 - 58.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: Clovis de Paula Santos.

1. Controle anti-helmíntico. 2. Nematoides gastrintestinais. 3. Óleo essencial. 4. *Schinus terebinthifolia Raddi*. 5. Limoneno. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ATIVIDADE NEMATICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE AROEIRA VERMELHA
(*Schinus terebinthifolia* Raddi) E LIMONENO CONTRA NEMATOIDES
GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

VIVIANE MOITIM PEREIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovado em 20 de fevereiro de 2025

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALEKSANDRA MENEZES DE OLIVEIRA**
Data: 13/03/2025 09:41:08-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Aleksandra Menezes de Oliveira (Doutora em Ciências) - UFRJ

Documento assinado digitalmente
 **SILVERIO DE PAIVA FREITAS**
Data: 11/03/2025 19:10:38-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Silvério de Paiva Freitas (Doutor em Fitotecnia) – UENF

Documento assinado digitalmente
 **FRANCIMAR FERNANDES GOMES**
Data: 15/03/2025 08:54:33-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Francimar Fernandes Gomes (Doutor em Produção Animal) – UENF

Clóvis de Paula Santos (Doutor em Medicina Veterinária-Parasitologia
Veterinária- Orientador) – UENF

“Temos que continuar aprendendo. Temos que estar abertos. E temos que estar prontos para espalhar nosso conhecimento a fim de chegar a uma compreensão mais elevada da realidade.”

Thich Nhat Hanh

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e aos meus pais Joelita Moitim e Joaquim Pereira por todo o apoio, sustentação e por me motivarem sempre a dar o melhor de mim.

Aos meus irmãos Filemom Moitim, Hayalla Moitim e Valéria Moitim, pela motivação e por nunca me deixarem desistir, mesmos nas piores situações.

Ao meu orientador Dr. Clóvis de Paula Santos por toda ajuda e pelo apoio no meu desenvolvimento profissional e orientar mesmo antes de conhecer meu trabalho como aluna.

Aos meus colegas de laboratório, por toda ajuda durante o processo de execução deste trabalho, me incentivando e me mantendo otimista mesmo diante das dificuldades, a vocês a minha imensa gratidão.

Aos meus tios Joelson Lopes, José Nivaldo Lopes e Joelma Lopes. Jamais vou me esquecer por sempre estarem ao meu lado. Muito obrigada por tudo.

Agradeço aos professores Silvério Paiva, Ivo Curcino e aos técnicos Beatriz Ribeiro pela paciência, auxílio e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), pelo financiamento do projeto e pela estrutura concedida.

A todos que contribuíram na minha formação, a vocês minha eterna gratidão.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Importância da ovinocultura	15
1.2 Nematoides gastrintestinais	16
1.2.1 Aspectos gerais dos nematoides gastrintestinais	16
1.2.2 Morfologia dos ovos e larvas	18
1.2.3 Ciclo biológico dos nematoides gastrintestinais de ruminantes	20
1.3 Impactos na produção e saúde animal de ruminantes	22
1.4 Resistência anti-helmíntica e formas de controle de nematoides	23
1.5 Metabólitos secundários das plantas e os óleos essenciais	24
1.6 Atividade biológica das plantas medicinais	25
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Coleta e identificação do material botânico	30
3.2 Montagem das exsiccatas da planta coletada	30
3.3 Extração do óleo essencial da aroeira vermelha	31
3.4 Preparo das emulsões do óleo essencial e limoneno	31
3.5 Obtenção das larvas infectantes (L3) e dos ovos de nematoides	31
3.6 Teste de atividade nematicida do óleo essencial de aroeira vermelha e limoneno frente as larvas Infectantes (L3) e ovos	32
3.7 Identificação e descrição dos compostos químicos presentes no óleo essencial da aroeira vermelha	33
3.8 Análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura	33
3.9 Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Identificação dos compostos do óleo essencial de aroeira	35
4.2 Densidade e rendimento do óleo essencial de aroeira	36
4.3 Teste de atividade ovicida do óleo essencial de aroeira e limoneno	36
4.4 Teste de atividade anti-helmíntica do óleo essencial de aroeira e limoneno	38
4.5 Concentração da inibição da eclosão larval (CI ₅₀)	39
4.6 Análises de microscopia eletrônica de varredura	40
4.7 Análises de microscopia eletrônica de transmissão	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia geral de macho e fêmea de nematoides gastrintestinais.

Figura 2: Estádios de desenvolvimento dos ovos de nematoides gastrintestinais.

Figura 3: Ciclo de vida parasitas do trato gastrintestinal de ruminantes (A,C) localização dos parasitas no hospedeiro e (B) ovo.

Figura 4: Folhas e frutos de aroeira vermelha (*S.terebinthifolia raddi*).

Figura 5: Estrutura química do limoneno.

Figura 6: Estimativa de eclosão larval após interação de 24 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

Figura 7: Estimativa de eclosão larval após interação de 48 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

Figura 8: Estimativa da mortalidade larval (L3) após interação de 24 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

Figura 9: Estimativa da mortalidade larval (L3) após interação de 48 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

Figura 10: Estimativa da CI50 frente a inibição da eclosão larval após interação de 24 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

Figura 11: Estimativa da CI50 frente a inibição da eclosão larval após interação de 48 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

Figura 12: Micrografias (M.E.V) ovos nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com OE de aroeira e limoneno.

Figura 13: Micrografias (M.E.V) de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos não tratados

Figura 14: Micrografias (M.E.T) de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com limoneno.

Figura 15: Micrografias (M.E.T) de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com OE de aroeira.

Figura 16: Micrografias (M.E.T) de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos não tratados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de aroeira.

Tabela 2. Determinação da umidade, da densidade e rendimento do óleo essencial de aroeira.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CG - Cromatografia a gás ou cromatógrafo a gás

CG/EM-Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas

DIC – Detector de ionização em chamas

eV – eletrovolt

IA – Índice aritmético

IR - Índice de refração

min - Minutos

m/m – Razão massa/massa

m/z – Razão massa/carga

OE - Óleo essencial

RPM – Rotação por minuto

v/v – Razão volume/volume

g - Gramas

h - Horas

mM – Milimolar

M – Molar

m - Metros

cm - centímetro

mg - Miligrama

MhZ - Mega hertz

mL - Mililitros

mm- Milímetros

µm – Micrometro

% - Porcentagem

/ - Divisão

µL/mL - Microlitros por mililitros

°C - Graus centígrados

CL 50 – Concentração letal de 50 por cento

OSO₄ – Tetróxido de ósmio

MO- Microscopia óptica

MEV- Microscopia eletrônica de varredura ou microscópio eletrônico de varredura

MET- Microscopia eletrônica de transmissão ou microscópio eletrônico de transmissão

OPG – Ovos por grama

® - Marca registrada

L1- Larva de 1º estágio

L2- Larva de 2º estágio

L3 -Larva Infectante

L4 - Larva de 4º estágio

NG- Nematoides gastrintestinais

AChE - Enzima acetilcolinesterase

RESUMO

Os nematoides gastrintestinais são umas das principais causas por perdas econômicas na criação de pequenos ruminantes e em sua forma mais grave podem levar o animal a morte. Anti-helmínticos são empregados no controle, porém, a resistência dos parasitos a estes produtos é o principal complicador para um efetivo controle. Metabólitos secundários das plantas estão entre as alternativas de investigação de controle. Neste sentido, o objetivo foi avaliar a atividade nematicida do limoneno comercial e do óleo essencial da *Schinus terebinthifolia* Raddi, as composições químicas e o efeito sobre a morfologia dos ovos e larvas de nematoides gastrintestinais (NG) de ovinos. Os processos metodológicos seguiram nas seguintes etapas: 1) coleta, identificação botânica e montagens das exsiccatas; 2) obtenção do óleo essencial 3) obtenção de ovos e larvas infectantes (L3) via coleta e processamento de fezes por filtragem e coproculturas; 4) ensaios biológicos em placas de cultivo ovos e larvas e quantificação de eclosão e sobrevivência; 5) análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e análise morfológica por microscópica ótica e eletrônica de varredura e transmissão. Nos testes foram utilizadas diferentes concentrações do óleo essencial emulsionadas e do limoneno, composto majoritário encontrado na planta neste estudo. Todas as concentrações do óleo essencial e limoneno mostraram-se eficiente na inibição da eclosão larval (1000 – 0,5 mg/mL), exceto 0,25mg/mL, ao passo que atividade larvicida foi menos eficiente tanto no óleo essencial (1000- 62,5mg/mL) quanto no limoneno (1000- 31,2mg/mL). Alterações consideráveis foram observadas na morfologia de ovos após exposição aos tratamentos. Conclui-se que o limoneno puro comercial e o óleo essencial de aroeira possuem atividade nematicida sendo o ovo o estágio mais sensível. Portanto, apresenta potencial no controle de NG de ovinos e pode contribuir na redução no uso de anti-helmínticos nas criações de ovinos, promovendo melhora da saúde e bem estar animal.

Palavras Chaves: Controle anti-helmíntico, nematoides gastrintestinais, óleo essencial, *Schinus terebinthifolia* Raddi, limoneno.

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes are one of the main causes of economic losses in the raising of small ruminants and in their most severe form can lead to the death of the animal. Anthelmintics are used for control, however, the resistance of the parasites to these products is the main complicating factor for effective control. Secondary metabolites of plants are among the alternatives for control investigation. Then, the aim was to evaluate the nematicidal activity of *Schinus terebinthifolia raddi* (Aroeira vermelha), the chemical compositions, and the effect on the morphology of eggs and larvae of gastrointestinal nematodes (NG) of sheep, through the use of essential oil. The methodological processes followed the following steps: 1) collection, botanical identification, and assembly of exsiccates; 2) obtaining the essential oil; 3) obtaining infective eggs and larvae (L3) through collection and processing of feces by filtration and coprocultures; 4) biological tests on egg and larva culture plates and quantification of hatching and survival; 5) analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) and morphological analysis by optical and scanning and transmission electron microscopy. Different concentrations of emulsified essential oil and limonene, the major compound found in the plant in this study, were used in the tests. All concentrations of essential oil and limonene were efficient in inhibiting larval hatching (1000 – 0.5 mg/mL), except 0.25mg/mL, while larvicidal activity was less efficient for both the essential oil (1000 – 62.5 mg/mL) and limonene (1000 – 31.2 mg/mL). Considerable changes were observed in the morphology of eggs after exposure to the treatments. It is concluded that pure limonene or limonene presente in the essential oil of Aroeira has nematicidal activity, with the egg being the most sensitive stage. Therefore, it has potential in controlling NG in sheep and can contribute to reducing the use of anthelmintics in sheep farming, promoting improved animal health and well-being.

Keywords: Anthelmintic control, gastrointestinal nematodes, essential oil, *Schinus terebinthifolia* Raddi, limonene.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides gastrintestinais são umas das principais causas por significativas perdas econômicas na criação de pequenos ruminantes. Em sua forma mais grave podem levar o animal rapidamente a morte, em sua forma crônica pode acarretar ao animal diversos problemas, como a perda de peso, menor desenvolvimento corporal e até mesmo em queda no desempenho reprodutivo (Costa, 2017; Mottin, 2019). O abuso no uso indevido de anti-helmínticos, vem gerando resistência dos helmintos decorrentes ao excesso dessas substâncias de maneira inapropriada (Adams, 2003).

A resistência dos parasitos se dá a partir do momento em que uma determinada substância não mantém a mesma eficácia após um certo período de uso. No Brasil há registro de resistência anti-helmíntica desde meados dos anos 60 (Cavalcante *et al.*, 2009; Coles *et al.*, 1992). Desta forma surgiu a necessidade de novas substâncias capazes de conter a proliferação dos parasitas. Outro grande obstáculo na criação dos pequenos ruminantes são as quantidades de resíduos dos fármacos na carne dos animais e no meio ambiente (Atanastov *et al.*, 2015). Devido aos fatos preocupantes, estudos com base na utilização de produtos naturais com potencial aplicabilidade em medicamentos vem tomando espaço no país e no mundo, além de ser uma alternativa econômica as plantas medicinais podem estar associadas também em melhorias do bem estar dos animais (Sales Junior, 2017).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa complexos, influenciados por fatores bióticos (organismos vivos) e abióticos (fatores não vivos). Uma estratégia central é a produção de uma ampla gama de compostos químicos, os metabólitos, que desempenham papéis cruciais na sobrevivência e adaptação das plantas. Nesses metabólitos são produzidos açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos e nucleotídeos. Esses metabólitos são divididos em primários e secundários (García e Carril, 2009).

Os metabólitos secundários são especializados devido a uma resposta evolutiva dos vegetais e na interação deles com os seres vivos, de modo geral pertencem a uma das três classes de moléculas, que são: os terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados. A comercialização desses metabólitos também gera muitos

lucros pela utilização deles pelas indústrias de fármacos, cosméticos, perfumaria, corantes, aromas dentre outras (Raskin *et al.*, 2002).

As plantas possuem muitos ativos gerados a partir dos seus metabólitos secundários, que são fundamentais para a sobrevivência e estão diretamente relacionados a proteção e evolução das plantas (Ribeiro *et al.*, 2020). Plantas que em sua composição química apresentam tanino, timol e eugenol além de outros compostos podem ter ótima atividade no controle dos nematoides (Novibilsky *et al.*, 2011; Osório *et al.*, 2020; Dos Santos *et al.*, 2021). Neste sentido o presente trabalho pretende investigar a atividade nematicida do limoneno e do óleo essencial da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolia Raddi*), suas composições químicas e atividade morfológica em larvas e ovos de nematoides.

1.1 Importância da ovinocultura

A ovinocultura brasileira é uma atividade pecuária muito importante, explorada principalmente para a obtenção produtos, como carne, leite e lã (Osório *et al.*, 2020). Estimativas recentes, baseadas em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), indicam um rebanho brasileiro de ovinos entre 21 e 22 milhões de cabeças, sendo a região nordeste detentora de cerca de 68,54% do rebanho nacional, tendo o estado da Bahia como maior produtor do Brasil com cerca de 22,01% de todo rebanho nacional, seguida das regiões Sul com 20,8%, tendo o Rio Grande do Sul como maior produtor da região com 15,51% do rebanho brasileiro. Em seguida, destaca-se os estados de Pernambuco (13,71%), Ceará (12,07%), Piauí (8,47%), Rio Grande do Norte (4,19%) do rebanho ovino do país. Entretendo a região sudeste apresenta pouca representatividade no cenário nacional, o estado do Rio de Janeiro apresenta atualmente 40 mil cabeças (0,19%) da produção nacional, tendo a cidade de Campos do Goytacazes como maior produtora do estado (IBGE, 2023).

A importação de raças ovinas melhoradas, como Dorper, Texel, Ile de France e Suffolk, juntamente com a disseminação da raça Santa Inês, desenvolvida no Nordeste brasileiro (Jardim, 1987), tem criado expectativas de crescimento no consumo de carne ovina na produção pecuária do Rio de Janeiro e em outros estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (Cruz *et al.*, 2010). Embora a produção de leite ovino ainda seja incipiente no Brasil, o foco principal da expansão da

ovinocultura nessas regiões está na produção de carne, impulsionada pela busca por diversificação da produção pecuária e pela crescente demanda por esse tipo de carne.

1.2 Nematoides gastrintestinais de ovinos

1.2.1 Aspectos gerais dos nematoides gastrintestinais

Os nematoides são vermes de corpo cilíndrico, cuja forma, embora variável, é frequentemente descrita como filiforme. Eles podem ser encontrados em diversos ambientes naturais, desde que haja umidade suficiente para sua sobrevivência. Algumas espécies desenvolveram a capacidade de suportar baixa umidade por períodos prolongados, entrando em um estado de repouso com mínimo dispêndio energético e retornando à atividade normal quando as condições ambientais se tornam novamente favoráveis. Apresentam sistema digestivo completo (boca e ânus), sistema nervoso e sistema reprodutor, sendo dioicos como representado na Figura 1 (Ferraz e Brown, 2016; Zaragoza, 2023; Rey, 2001).

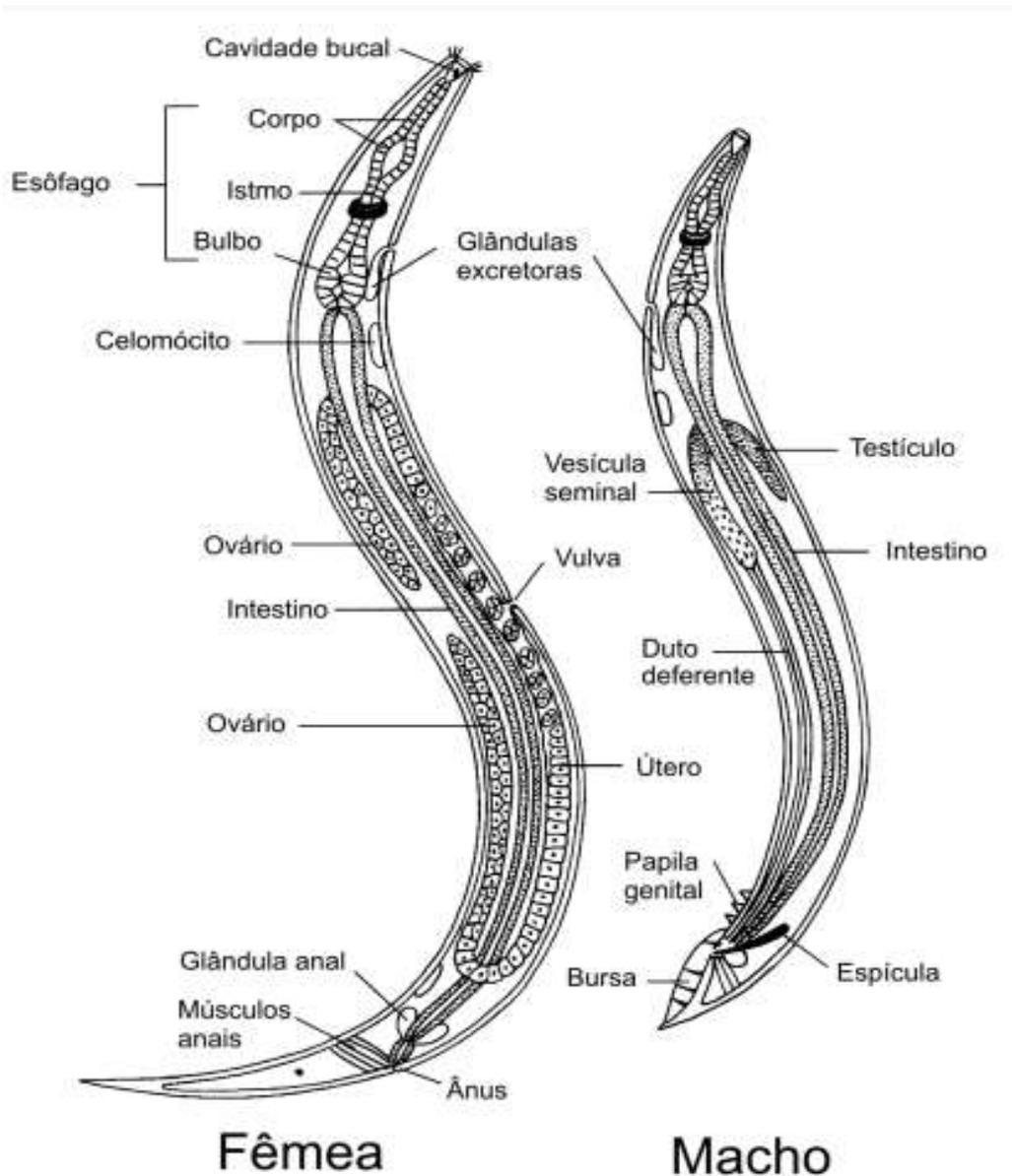
Nematoides gastrintestinais infectam uma vasta gama de hospedeiros, abrangendo animais e humanos. O ciclo de vida desses vermes compreende estágios que se desenvolvem do ovo ao verme adulto, com as fases larvais concluídas mudas que se passam no interior do ovo, no meio ambiente ou no hospedeiro de acordo com as espécies. A diferenciação entre os estádios juvenis e adultos se dá pelo tamanho do corpo e pelo desenvolvimento de gônadas e órgãos copulatórios (Hempstead *et al.*, 2023; Dattar *et al.*, 2024).

Alguns grupos de nematoides parasitas apresentam adaptações morfológicas, como dentes, dentículos, lancetas, placas e cortantes, que lhes conferem a capacidade de se fixarem às mucosas dos tecidos dos órgãos parasitados em seus hospedeiros. Essas estruturas desempenham um papel crucial não apenas na fixação, mas também na alimentação hematófaga desses parasitos. A alimentação hematófaga, ou seja, à base de sangue, resulta em lesões nas mucosas gastrintestinais dos hospedeiros, levando a quadros graves de anemia devido à significativa perda sanguínea (Rey, 2001; Sotillo, 2014).

As nematodioses gastrintestinais representam um importante fator limitante para a ovinocultura, constituindo um sério desafio sanitário com implicações negativas

nos índices produtivos e potencial de impacto econômico adverso (Costa *et al.*,2011). No contexto brasileiro, o clima se apresenta como um fator ambiental que otimiza o ciclo biológico desses parasitos, proporcionando condições favoráveis à viabilidade dos ovos no ambiente de pastagem e, conseqüentemente, aumentando a probabilidade de infecção e reinfecção dos animais (Almeida e Santos,2018; Molento,2004).

Figura1: Morfologia geral de macho e fêmea de nematoides gastrintestinais.

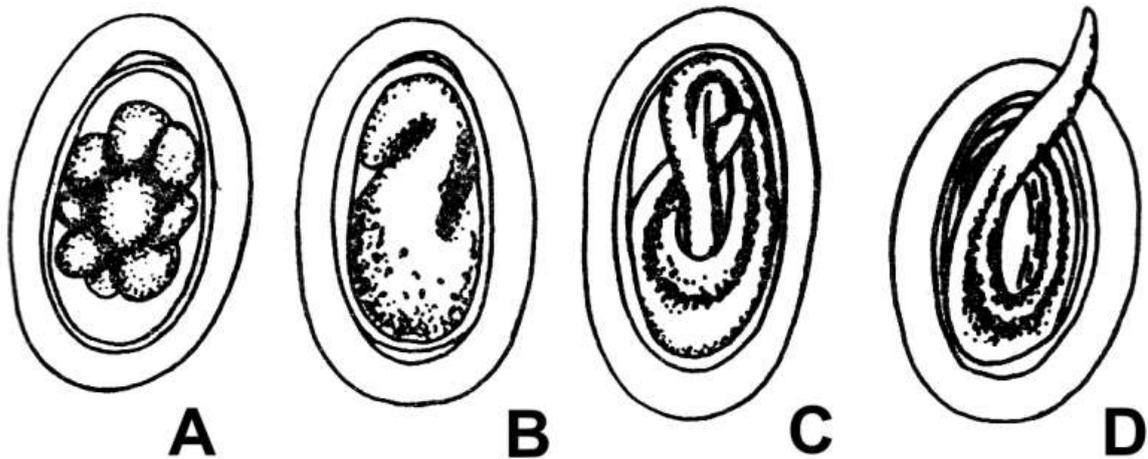


Fonte: (Adaptado de SCHMIDT, 1990).

1.2.2 Morfologia dos ovos e larvas

Os principais gêneros de nematoides gastrintestinais que parasitam ovinos (*Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Cooperia*, *Oesophagostomum* e *Trichuris*), em sua fase adulta, exibem uma diversidade morfológica notável entre as diferentes espécies. Contudo, seus ovos apresentam uma uniformidade surpreendente em relação às características morfológicas e tamanho, o que dificulta a identificação precisa de gêneros e espécies apenas pela observação dos ovos. O estágio larval que emerge do ovo pode variar entre o primeiro, segundo ou terceiro estágio juvenil (Figura 2), dependendo da espécie sendo os estágios iniciais mais suscetíveis aos estresses ambientais, o que os torna mais vulneráveis (Perry *et al.*, 2011).

Figura 2: Estádios de desenvolvimento dos ovos de nematoides gastrintestinais.



A= ovo em estágio de mórula, B= ovo em desenvolvimento embrionário, C= ovo embrionado; D= Larva de primeiro estágio (L1) em início de eclosão.

Fonte: Foreyt (adaptado), 1988.

Em muitas espécies de nematoides parasitas de ovinos, o ovo assume um papel crucial como principal estágio de sobrevivência. Essa importância se deve à capacidade do ovo de retardar a eclosão por períodos variáveis, que podem se estender de alguns dias até vários anos. Esse fenômeno, conhecido como diapausa, permite que os nematoides sobrevivam a condições ambientais desfavoráveis, aguardando o retorno de condições mais propícias para o desenvolvimento (Perry e Clarke, 1981). A eclosão, propriamente dita, é um processo complexo que depende da interação adequada de fatores bióticos, ou seja, aqueles relacionados a organismos vivos, como a presença de um hospedeiro adequado, e fatores abióticos, que englobam elementos não vivos do ambiente, como temperatura, umidade e condições do solo (Mkandawire *et al.*, 2022; Masler e Rogers, 2011).

Para compreender as transformações que ocorrem nos ovos de nematoides, é essencial conhecer a estrutura das camadas que compõem sua casca. Embora a casca do ovo possa apresentar uma variação de até 6 camadas. A camada mais interna, denominada camada vitelina, está em contato direto com a membrana vitelina do embrião, a camada quitinosa, é composta principalmente por quitina, um polissacarídeo que confere rigidez e resistência à casca, protegendo o embrião contra danos mecânicos e outros estresses, sendo mais intermediária, a camada mais externa, chamada de camada proteica ou lipídica externa, é formada por proteínas e/ou lipídios e desempenha um papel fundamental na interação do ovo com o ambiente externo, incluindo a proteção contra dessecação e a mediação de sinais que induzem a eclosão (Perry e Clarke, 1981; Masler e Rogers, 2011).

Nas larvas de nematoides gastrintestinais parasitas de ovinos a cutícula é uma estrutura essencial que reveste externamente o corpo das larvas e dos indivíduos adultos (Weischer e Brown, 2000). Durante o desenvolvimento larval, essa cutícula passa por um processo de muda a cada estágio de crescimento, sendo substituída por uma nova cutícula maior e mais espessa, permitindo o aumento do corpo da larva. Tanto em larvas quanto em adultos, a cutícula apresenta invaginações nas aberturas naturais, como boca, ânus, vulva e poro excretor. Além disso, possui evaginações, que são ornamentações sensoriais e táteis conhecidas como papilas, cerdas (Bird, 1968; Tapoka, 2022).

Em termos estruturais a cutícula é composta por quatro camadas epicutícula, zona cortical (exocutícula), zona medial (mesocutícula), e zona basal (endocutícula). Bioquimicamente, a cutícula é constituída de três grupos de componentes, a saber: (1) componentes estruturais (ou seja, insolúveis em detergentes) dos quais o colágeno é o mais abundante, enquanto a contraparte não colágena é chamada de cuticlina, (2) proteínas solúveis, que podem ter funções enzimáticas (proteínas, glicoproteínas) e (3) componentes de baixo peso molecular, incluindo lipídios. Além disso, a superfície da cutícula pode ser coberta com uma camada de glicoproteínas e outras proteínas associadas à superfície, ou mais raramente com uma bainha adicional (Decraemer et al. 2003).

A invasão do hospedeiro pelos nematoides atinge sua máxima eficiência quando há uma sincronia entre o ciclo de vida do parasito e o desenvolvimento do hospedeiro. Essa sincronia garante que o nematoide esteja presente no momento em que o hospedeiro está mais suscetível à infecção (Tapoka,2022). Após a invasão, a eclosão da larva pode ser desencadeada por estímulos específicos liberados pelo hospedeiro, indicando a presença de um ambiente favorável para o desenvolvimento (Hussey e Williamson,1998). Em algumas espécies, a eclosão só ocorre após a ingestão dos ovos pelo hospedeiro e a chegada a órgãos específicos do trato digestivo, onde as condições, como pH e a presença de enzimas digestivas, criam o ambiente necessário para a eclosão e o desenvolvimento larval (Shepherd e Clarke,1971; Perry *et al.*,2011).

1.2.3 Ciclo biológico dos nematoides gastrintestinais de ruminantes

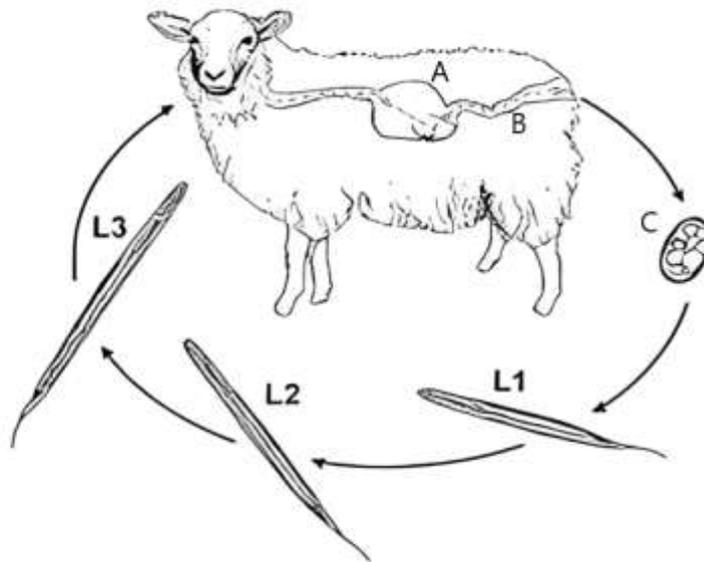
O ciclo de vida da maioria dos nematoides parasitas de ovinos apresenta um padrão semelhante (Figura 3). O processo tem início com a liberação de fezes pelo hospedeiro no ambiente, contendo ovos em estágio de mórula. Os primeiros estágios larvais, denominados L1 (larva de primeiro estágio) e L2 (larva de segundo estágio), ocorrem no interior da massa fecal presente no ambiente. Nessas fases, as larvas se nutrem de microrganismos e matéria orgânica ali presentes (Amarante, 2009, Abrão *et al.*, 2010). Em condições edafoclimáticas propícias, as L2 se desenvolvem para o estágio L3 (larva de terceiro estágio).

As larvas L3 são consideradas infectantes, pois a infecção do hospedeiro ocorre quando estas entram em contato com ele, sendo este contato essencial para a continuidade do ciclo de vida do parasita (Abrão *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2018). O estágio L3 representa a forma larval mais ativa dos nematoides, para a muda de terceiro estágio (L3) a larva retém a cutícula da fase anterior e não mais se alimenta, sobrevivendo das reservas nutritivas armazenadas nas células intestinais. A faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento das fases de vida livre situa-se entre 20°C e 30°C. Temperaturas mais elevadas aceleram o desenvolvimento de ovos e larvas, porém, concomitantemente, reduzem sua taxa de sobrevivência (Rocha *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2018). Da mesma forma, temperaturas mais baixas reduzem o desenvolvimento. Em condições ideais de temperatura os ovos atingem o estágio de larvas infectantes em torno de cinco a sete dias.

Em pastagens, quando a temperatura e a radiação solar estão baixas e a umidade é favorável, as L3 migram do solo e da base das touceiras para a parte aérea das plantas forrageiras. Essa migração tem como objetivo a ingestão pelas ovelhas durante o pastejo. A migração das L3 das fezes para o pasto é influenciada pela intensidade e frequência das chuvas, pela temperatura e pela morfologia das forrageiras. Em contrapartida, quando a temperatura e a radiação solar aumentam, as L3 realizam uma migração inversa, buscando proteção e garantindo sua sobrevivência (Amarante, 2009, Abrão *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2018; Charles, 1995).

Após serem ingeridas pelo hospedeiro, as L3 perdem a cutícula externa e penetram na mucosa do abomaso ou intestino de acordo com a espécie e dão início a uma fase histotrófica. Posteriormente, após poucos dias da infecção emergem na luz intestinal como larvas de quarto estágio e posteriormente amadurecem sexualmente formando machos e fêmeas. Após a cópula, as fêmeas ovopositam e os ovos seguem trânsito gastrintestinal e posteriormente são liberados juntamente as fezes para o meio ambiental (Amarante *et al.*, 2015).

Figura 3: Ciclo de vida de nematoides no trato gastrintestinal de ruminantes. Localização dos nematoides no abomaso(A) e intestinos do hospedeiro (B), ovo (C) e estádios de vida livre (L1,L2 e L3).



Fonte: Adaptado de Monteiro,2007.

1.3 Impactos na produção e saúde animal de ruminantes

As infecções parasitárias por nematoides gastrintestinais representam um desafio significativo para a produção de ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos. Dentre os gêneros de nematoides mais prevalentes e patogênicos, destacam-se *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Cooperia*, *Oesophagostomum* e *Trichuris*. Esses parasitas afetam o trato gastrointestinal dos animais, causando uma série de problemas de saúde e impactando negativamente a rentabilidade das criações (De Jesus *et al.*, 2017).

Na ovinocultura, especificamente, a busca por maior lucratividade depende da adoção de técnicas de manejo qualificadas e otimização da produção (Vieira,2008). No entanto, a negligência das práticas sanitárias tem levado ao aumento da incidência de infecções parasitárias e, conseqüentemente, da mortalidade, principalmente em regiões com menos recursos. A suscetibilidade a esses parasitas é comum a bovinos, ovinos e caprinos, resultando em altas cargas parasitárias após a infecção. Os

animais jovens, devido à imaturidade do sistema imunológico, são particularmente vulneráveis e apresentam maiores taxas de infecção em comparação com os adultos (Molento *et al.*, 2013).

Os prejuízos econômicos decorrentes das nematodioses na ovinocultura são multifacetados e interligados (Alves *et al.*, 2022). Os custos de produção sobem com a necessidade de tratamentos e medidas preventivas, o que, por sua vez, impacta a produção de carne e lã, reduzindo o ganho de peso e a qualidade da fibra (Amarante *et al.*, 2015). Essa combinação, somada ao comprometimento da fertilidade e à consequente diminuição das taxas de reprodução, culmina, em casos graves, na mortalidade dos animais, representando um duro golpe para a rentabilidade da atividade (Oliveira-Sequeira e Amarante, 2001).

1.4 Resistência anti-helmíntica e formas de controle de nematoides

A resistência parasitária a anti-helmínticos é um fenômeno preocupante que ameaça o controle de doenças parasitárias em todo o mundo. A exposição constante dos parasitos a esses medicamentos, devido ao uso indiscriminado e inadequado, resulta na seleção de indivíduos com características genéticas que lhes conferem resistência. Esses indivíduos resistentes se reproduzem, transmitindo essa característica para as próximas gerações, tornando os tratamentos convencionais cada vez menos eficazes (Da Silva *et al.*, 2024). Os mecanismos de resistência a anti-helmínticos podem ser agrupados em diferentes processos. A alteração do alvo da droga, seja por modificação estrutural ou aumento do número de receptores, impede sua ligação eficaz. A excreção acelerada e a metabolização mais eficiente reduzem a concentração do fármaco no parasita. O sequestro, por sua vez, impede que a droga atinja seu sítio de ação (Holsback *et al.*, 2013).

A resistência a anti-helmínticos em ovinos é um problema antigo e persistente, que desafia a ovinocultura. O primeiro relato data de meados da década de 60, com a constatação de resistência ao tiabendazol (Drudge *et al.*, 1964). Desde então, o fenômeno se alastrou para outros princípios ativos essenciais no controle parasitário, como o levamisol (com relatos a partir de 1979), a ivermectina (a partir de 1988) e a moxidectina (a partir de 1995), conforme Molento (2004). A velocidade com que a resistência se desenvolve após a introdução de um novo fármaco no mercado é

alarmante, como demonstrado pelo caso do tiabendazol, em que a resistência foi documentada apenas três anos após seu lançamento. Essa rápida progressão impacta a eficácia dos tratamentos que exigem outras estratégias de manejo para o controle dos parasitos (Little *et al.*, 2010).

A busca por um controle mais eficaz e sustentável das verminoses tem levado à adoção de diversas estratégias complementares, com destaque para o controle integrado. Essa abordagem reconhece a importância de combinar o controle químico com práticas de manejo e outras alternativas inovadoras (Beys *et al.*, 2020). Entre as práticas de manejo, incluem-se o manejo estratégico de pastagens, com técnicas como rotação de pastos, uso de pastagens cultivadas e integração lavoura-pecuária, visando reduzir a contaminação ambiental. O pastoreio com animais resistentes e o confinamento estratégico de animais suscetíveis também contribuem para minimizar a necessidade de tratamentos químicos, também explorando outras frentes, como o controle biológico com fungos nematófagos, o melhoramento genético para resistência, a fitoterapia, o desenvolvimento de novos fármacos e a imunização por meio de vacinas, buscando soluções inovadoras e sustentáveis (Berti e Macedo, 2010; Mascarin *et al.*, 2019).

1.5 Metabolitos secundários das plantas e os óleos essenciais

Durante seu ciclo de vida as plantas desenvolvem compostos químicos fundamentais para o funcionamento de seu organismo, os compostos aromáticos presente nessas plantas possuem uma ampla aplicabilidade (Garcia *et al.*, 2019). Óleos essenciais estão presentes nas células vegetais, produzidos através de um metabolismo secundário muito importante para atração de polinizadores, comunicação entre as espécies e também na defesa contra a herbivoria de predadores. Promovem para as plantas proteção contra ao estresse causados por mudanças de temperatura, deficiência de nutrientes, concentrações de água absorvida e possíveis danos acarretados a exposição intensa a luz UV (Góes *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos voláteis encontrados em plantas aromáticas, e das substâncias presentes nos óleos essenciais, os terpenos e os sesquiterpenos são predominantes. Devido às suas diversas propriedades e à grande variedade de terpenos encontrados na sua composição, os óleos essenciais possuem alto valor agregado, por isso são utilizados como matéria-prima para obtenção diversos compostos isolados importantes, bem como são utilizados como insumo em diversos setores industriais, os óleos essenciais extraídos das plantas medicinais em sua maioria possuem substâncias com forte atividade biológica. (Wolffenbutel, 2010).

Os óleos essenciais de algumas espécies vegetais têm demonstrado um grande potencial terapêutico no combate a infecções parasitárias. Sua capacidade de atravessar membranas biológicas e induzir estresse oxidativo nos parasitas os torna eficazes no tratamento de diversas doenças. Além disso, a natureza lipofílica dos óleos essenciais permite que eles alcancem diferentes compartimentos do organismo, ampliando suas possibilidades de aplicação, diversos estudos, têm demonstrado o potencial anti-helmíntico dos óleos essenciais e de seus principais compostos (Nunes *et al.*,2023).

1.6 Atividade biológica das plantas bioativas

As plantas medicinais, utilizadas por diversas culturas há milênios, são uma rica fonte de compostos bioativos com diversas propriedades terapêuticas. Esses compostos têm sido a base para o desenvolvimento de muitos medicamentos modernos e apresentam um grande potencial para o tratamento de diversas doenças, tanto em humanos quanto em animais. O interesse pelo uso de plantas medicinais vem crescendo, e seus efeitos benéficos estão sendo redescobertos e aplicados em diversas áreas de estudo (Andrade *et al.*, 2018). As plantas medicinais são consideradas reservatórios para uma variedade de compostos biologicamente ativos com diversas propriedades terapêuticas. Os amplos efeitos terapêuticos, associados às plantas medicinais, incluem atividades anti-inflamatórias, antivirais, antitumorais, antimaláricas, analgésicas, acaricida, inseticida, fungicida dentre outras (Aye *et al.*, 2019).

O manejo convencional dos nematoides gastrintestinais em ovinos, é baseado no uso de anti-helmínticos sintéticos, que enfrenta desafios significativos quando não realizado corretamente. A prática inadequada tem levado a problemas como a resistência a esses medicamentos e a presença de resíduos químicos tanto nos alimentos quanto no meio ambiente. O uso excessivo e incorreto de anti-helmínticos seleciona populações de nematoides resistentes, tornando os tratamentos menos eficazes. (Fenaltia *et al.*, 2016). Isso ressalta a necessidade de alternativas para controle desses parasitos. Nesse cenário, a utilização de plantas bioativas com propriedades anti-helmínticas tem se tornado uma opção viável para substituir o controle quimioterápico (Santos *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2018). As plantas são conhecidas por fornecer compostos metabólicos com ação anti-helmíntica oriundos de diversas fontes, que têm sido aplicados tanto no tratamento de infecções em humanos quanto em animais, ajudando a diminuir a presença de resíduos químicos (Zaro *et al.*, 2014). Considerando a grande diversidade de compostos encontrados nas plantas bioativas, a realização de testes fitoquímicos é essencial para detectar a presença desses elementos e explorar seus potenciais efeitos (Luz *et al.*, 2014). A análise fitoquímica, que é uma metodologia simples, permite identificar metabolitos secundários com propriedades terapêuticas, possibilitando o isolamento de substâncias bioativas e também auxiliando na criação de novos fármacos (Silva *et al.*, 2016).

A aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolia* Raddi) também chamada de aroeira pimenteira, pimenta rosa e aroeira da praia (Figura 4) é uma planta muito utilizada pela medicina tradicional/popular devido as suas propriedades, estudos apontam a presença de uma grande variedade de compostos o que justifica suas propriedades farmacológicas, que incluem ação anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, cicatrizante, anticancerígena, antiparasitária e antioxidante (Pereira *et al.*, 2021). A planta é originária da América do Sul, mais precisamente de países como Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, pode ser classificada como arbusto e/ou árvore perenifólia medindo de 5 a 10 metros de altura, suas flores são melíferas e sua madeira resistente de grande durabilidade (Scalon *et al.*, 2006; Maggieri *et al.*, 2015).

A aroeira (*S. terebinthifolia* Raddi) pertence ao gênero *Schinus* e da família *Anacardiaceae*, existem aproximadamente 30 espécies pertencente ao gênero (Souza e Lorenzi, 2008). Na planta o óleo essencial encontra-se nas folhas, flores,

frutos, galhos e cascas do caule, nos frutos a composição do óleo essencial possui predominância de terpenos, como: limoneno, α -pineno, α -falandreno, β -pineno, mirceno, β -cariofileno, germagreno D, entre outros compostos (Oliveira *et al.*,2014).

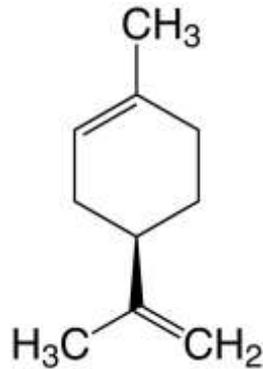
Figura 4: Folhas e frutos de aroeira vermelha (*S. terebinthifolia* Raddi).



Fonte: Pirani, 2020. Flora e Funga do Brasil.

O limoneno (1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno), é um monoterpene cíclico (Figura 5) amplamente reconhecido por seu aroma cítrico característico. Presente em mais de 300 óleos essenciais, como os de laranja, limão e hortelã. Essa substância possui uma vasta gama de aplicações. Além de ser utilizado como aromatizante em alimentos e bebidas, o limoneno encontra aplicações em produtos de limpeza, perfumaria e até mesmo como inseticida. Sua versatilidade e propriedades químicas o tornam um substituto promissor para solventes orgânicos nocivos, como benzeno, tolueno e etilbenzeno.

Figura 5: Estrutura química do limoneno.



Fonte: Ravichandran *et al.*,2018.

A principal fonte de limoneno atualmente é a indústria de sucos cítricos. O processo de extração do suco dessas frutas gera o limoneno como um subproduto, podendo representar até 98% do óleo extraído das cascas (Jongedijk *et al.*,2016). Embora o limoneno tenha demonstrado potencial em diversas atividades biológicas, como a ação antimicrobiana, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar seus mecanismos de ação e explorar novas aplicações. A atividade anti-helmíntica e outras propriedades farmacológicas do limoneno representam áreas promissoras para futuras pesquisas (Lin *et al.*, 2024).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do óleo essencial da aroeira vermelha (*S.terebinthifolia* Raddi) e seu composto majoritário (limoneno) no controle de nematoides de ovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* do óleo essencial de aroeira vermelha e do limoneno puro comercial sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais de ovinos;
- Determinar os compostos químicos da *S. terebinthifolia* Raddi por meio estudos fitoquímicos em Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- Avaliar o efeito do limoneno puro comercial e do óleo essencial de *S. terebinthifolia* Raddi sobre a morfologia dos ovos por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, localizada na cidade de Campos dos Goytacazes/ RJ, Brasil. Os experimentos foram executados nos laboratórios de Biologia Celular e Tecidual (Centro de Biociências e Biotecnologia); de Fitotecnia – Setor de Plantas Daninhas e Medicinais (Centro de Ciências Tecnológicas Agropecuárias); e de Ciências Químicas, Setor de Química de Produtos Naturais (Centro de Ciências e Tecnologia).

3.1 Coleta e Identificação do Material Botânico

Para a obtenção do material vegetal, foram coletados os frutos maduros da aroeira vermelha na Estrada do Pires, município de Campos dos Goytacazes, localizada na região norte do Rio de Janeiro (21°54'59.7"S 41°09'25.3"W). Os frutos coletados foram armazenados em local protegido para secagem em estufa de circulação de ar forçada, onde permaneceram durante dois dias sob temperatura de 40° C. Após a secagem, o material foi moído a fim de reduzir a sua área superficial e melhorar a eficiência da extração do óleo essencial.

3.2 Montagem das exsicatas da planta coletada

Após a coleta, o material foi depositado no herbário sendo identificado, prensado e levado à estufa para secagem por sete dias a 65°C. As prensas foram revisadas diariamente. Após secas, as plantas foram costuradas e montadas em papel rígido de cor branca, com a proporção de 35 X 45 X 20 cm. No canto inferior direito da cartolina foi aplicada uma etiqueta contendo as informações de coleta e no canto inferior esquerdo foi plicada uma segunda etiqueta com o número de registro da exsicata, sendo esta então depositada no Herbário do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense sob o número de tomo 13992.

3.3 Extração do óleo essencial da aroeira vermelha

A extração do óleo essencial da aroeira vermelha foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. Foram adicionados 150g do material seco e 1000mL de água destilada em um balão de fundo redondo com capacidade para 2000mL, conforme proposto por Dos Santos (2021).

A obtenção do hidrolato se deu após três horas de extração, sendo retirado do aparelho e submetido a centrifugação de 6000 RPM durante 10 minutos para separar o óleo da água. O óleo obtido foi pesado para determinação do rendimento, sendo o processo realizado em triplicata, e depois foi armazenado em frascos de vidro, protegido da luz e em uma temperatura inferior a -10°C , para posterior identificação química e testes de atividade nematicida.

O rendimento médio do óleo essencial extraído foi obtido através do cálculo da média do rendimento das extrações, e os resultados expressos em porcentagem de massa de óleo essencial (g) por biomassa de folha seca (g) (% , m/m). Esses valores foram obtidos através das pesagens das amostras em balança analítica após a separação do óleo essencial da água, segundo a metodologia proposta por Souza *et al.* (2017).

3.4 Preparo das emulsões do óleo essencial e limoneno

A emulsão preparada foi do tipo óleo em água (O/A), em que a fase dispersa corresponde à fase oleosa, e a fase dispersante constitui-se de água. Utilizaram-se o óleo essencial da aroeira vermelha e o limoneno obtido comercialmente (Destilaria Bauru, lote: 23L12) e 1% de emulsificante (Tween®) e o volume foi completado com água destilada estéril. A emulsão foi homogeneizada com auxílio de agitador Vórtex.

3.5 Obtenção das Larvas Infectantes (L3) e dos Ovos de Nematoides

Ovinos da raça Santa Inês foram doadores de fezes e estas foram coletadas diretamente da ampola retal de um total de 15 animais. As L3 foram obtidas através da técnica de coprocultura conforme descrito em Bonadiman *et al.* (2006) e armazenadas sob refrigeração até análise em laboratório. Para obtenção dos ovos, foram utilizadas amostras fecais com a quantidade de ovos por grama (OPG) acima de 6000 ovos. As amostras fecais foram reunidas, homogeneizadas, maceradas e filtradas em um conjunto de peneiras granulométricas com aberturas de 24, 48, 80,

100, 200, 270 e 400 mesh. A última peneira reteve os ovos que foram vertidos juntamente com água destilada. em tubos Falcon de 15mL e levados a centrifuga à 3000rpm. Este processo foi repetido com a adição de solução salina e o sobrenadante descartado na peneira de 400 mesh. O sobrenadante descartado foi lavado com água destilada abundante para retirada de toda a solução salina. Posteriormente os ovos foram transferidos para um tubo Falcon e usados em seguida (Oliveira, 2016).

3.6 Teste de atividade nematicida do óleo essencial de aroeira vermelha e limoneno frente as larvas Infectantes (L3) e ovos

O ensaio foi conduzido com a preparação de uma solução estoque, contendo água destilada e L3 de nematoides viáveis e ativas uso *in vitro*, também sendo preparada outras soluções estoque onde foi usado o óleo essencial e limoneno, água destilada e como tensor ativo o Tween 80, o uso do solubilizante busca promover a homogeneização do óleo essencial hidrofóbico com a água.

Os preparação com número significativo de repetições é necessária a fim de se estabelecer qualidade dos dados por meio da aplicação dos fundamentos da estatística. Desta forma os ensaios foram repetidos em triplicatas para melhor exatidão dos dados. Foram distribuídas da mesma maneira 40µL da solução estoque que continha as L3, em placas de poços, em seguida 200 µL da solução estoque emulsionada A/O diluída de forma seriada com concentrações distintas de: 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 mg/mL nos poços que continham aproximadamente 90 L3 dos nematoides, como testemunhas foram água destilada e Tween 80, seguiram sendo vedadas e incubadas em temperatura ambiente (aproximadamente 28° C), após 24h e 48h foram contabilizadas o número de L3 mortas em Microscópio Invertido.

O mesmo procedimento foi adotado em relação aos ensaios com ovos. Sendo importante descrever que os ovos foram imediatamente utilizados após o processo de filtragem em peneiras e inclusas concentrações menores a saber: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL. O número de ovos utilizados em cada ensaio, aproximadamente, foi de 140 ovos/poço enquanto de L3 foi de aproximadamente, 90 larvas. A concentração inibitória de 50% (CI 50%), que representa a dose do óleo essencial de *S. terebinthifolius* e limoneno capaz de inibir 50% dos ovos foi determinada.

3.7 Identificação e descrição dos compostos químicos presentes no óleo essencial da aroeira vermelha

O óleo essencial de *S. terebinthifolius* foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS QP2010, Shimadzu) e quantificado em um cromatógrafo gasoso (GC-2014, Shimadzu) acoplado a um detector de ionização de chama (DIC). As condições cromatográficas foram realizadas pela injeção de 1µL do óleo essencial diluído (1:100 mg/mL) em diclorometano (≥99,9%) em um injetor a 260 °C com uma proporção de divisão de 1:10. O hélio foi o gás carreador com uma vazão de 1 mL/min. A coluna capilar foi um RTX-5MS (Restek corporation, id. 0,25 mm, 30 m de comprimento, espessura de filme de 0,25 µm). A temperatura do forno começou em 60 °C e aumentou para 3 °C/min até 290 °C. A espectrometria de massa (EM) foi realizada a 70 eV com 1 varredura/s. As condições cromatográficas GC-DIC foram semelhantes às da EM, exceto pela injeção em uma coluna RTX- 5 (id. 0,25 mm, 30 m de comprimento, 0,25 µm de espessura de filme) e temperatura DIC de 290 °C.

O índice aritmético (AI) foi calculado pela interpolação do tempo de retenção (RT) padrão de alcanos saturados (C7-C40) analisado sob as mesmas condições espectrométricas e cromatográficas. As substâncias do óleo essencial foram identificadas comparando seus índices de retenção e espectros de massa com aqueles relatados em literatura específica (Adams, 2007). O perfil de fragmentação m/z foi comparado com as bibliotecas de espectros de massa do National Institute of Standards and Technology (NIST). A abundância relativa dos constituintes foi obtida usando o método de normalização de pico DIC.

3.8 Análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura

As análises de microscopia foram realizadas com base em De Souza et al (1989;2007). Assim após a execução dos testes biológicos, os ovos em interação com as emulsões de OE, limoneno e o controle foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, para formaldeído a 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2, por aproximadamente duas horas em temperatura ambiente. Após feita a lavagem com o mesmo tampão repetindo o processo por 3 vezes e pós-fixação em OsO₄ a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2, por 1 hora no escuro. Onde novamente, se repete a lavagem no mesmo tampão. Em seguida ocorre a desidratação do material em séries crescentes de acetona com intervalos de 1h para cada serie

(50%,70%,90%, 100%), sendo a última repetida três vezes a cada 30min. O material infiltrado deve ser incluído em resina Spurr, sendo a troca de cada proporção realizada a cada 24h, e as mesmas 5/1 (acetona/spurr), 4/1, 3/1, 2/1, 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 e por 3 vezes resina Spurr pura, em seguida o material foi levado para estufa 60°C durante 18 horas. Onde foram obtidos cortes semifinos de 0,5 µm para Microscopia Óptica (M.O.) e 70nm para Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.), sendo coletados em grades de Cobre de 300 mesh e em seguida observados em microscópio eletrônico de transmissão. Para observação do material em MET os cortes são contrastados em acetato de uranila a 1% e Citrato de chumbo 5%, sendo lavado em seguida. Para visualização em M.O os cortes foram corados em azul de Toluidina 1%. As lâminas foram visualizadas em Microscópio Óptico.

O processamento das amostras para Microscopia de Varredura (M.E.V) seguiu o mesmo protocolo de fixação em glutaraldeído a 2,5%, para formaldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2 e pós-fixação em OsO₄ a 1%, CaCl 2 mM em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2. Seguindo da desidratação em álcool (30%,50%,70%,90% e 100%) sendo a última repetida três vezes a cada 30min, após as desidratações as amostras foram levadas para realização do ponto crítico, que permite a toda retirada de água restante nos tecidos, com duração de 40 min, finalizando o procedimento as amostras devem ser montadas em fita de carbono para metalização em ouro, para visualização em MEV.

3.9 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados sob análise de variância (ANOVA), e o teste Tukey para comparação das médias, sendo considerado o nível de significância quando $p < 0,05$. As análises foram obtidas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação dos compostos do óleo essencial de aroeira

As análises cromatográficas indicaram como constituintes do OE de aroeira os compostos α -pineno, Mirceno, α -felandreno, Limoneno, b-cariofileno, Germacreno D e o Elemol (Tabela 1). O limoneno foi o principal componente do OE de aroeira, tendo cerca de 53,49 % na composição, outro composto que se destacou foi α -felandreno,

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de aroeira.

Pico	Tempo de retenção	Índice calculado	Índice teórico	Nome da substância	% Área relativa (CG-DIC)	% Similaridade (CG-EM)
1	11,826	932	937	α -pineno	8,65	95
3	13,952	988	991	Mirceno	1,10	95
4	13,952	1002	1008	α -felandreno	16,59	92
6	14,650	1024	1032	Limoneno	53,49	94
8	15,585	1417	1433	b-cariofileno	3,55	93
10	15,775	1480	1494	GermacrenoD	6,33	93
7	30,444	1548	1559	Elemol	3,55	94
Total	-	-	-	-	93,26	-
Classes		Quantidade / área (%)				
Monoterpenos Hidrogenados		79,83				
Sesquiterpenos Hidrogenados		9,88				
Sesquiterpenos Oxigenados		3,55				

Compostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna RTX- 5. O índice aritmético (AI) foi calculado pela interpolação do tempo de retenção (RT) padrão de alcanos saturados (C7-C40). Dados utilizados da espectroteca National Institute of Standards and Technology (NIST).

4.2 Densidade e rendimento do óleo essencial de aroeira

A determinação da densidade se deu por meio de cálculos de média, após medida periódica de 10 alíquotas em uma seringa analítica de 10 µL. A densidade foi determinada por meio da equação 1:

$$D = \frac{\text{média das medidas (g)}}{\text{volume (mL)}}$$

Para determinar percentual do rendimento do óleo essencial se deu por meio da equação 2:

$$R = \frac{\text{massa óleo(mL)}}{\text{bio massa seca (g)}} \times 100$$

Para determinar o percentual do teor de umidade da amostra se deu por meio da equação 3:

$$T = \frac{\text{amostra úmida(g)}}{\text{amostra seca (g)}} \times 100$$

Os valores referentes à densidade, teor de umidade e o rendimento do óleo essencial dos frutos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Determinação da umidade, da densidade e rendimento do óleo essencial de aroeira.

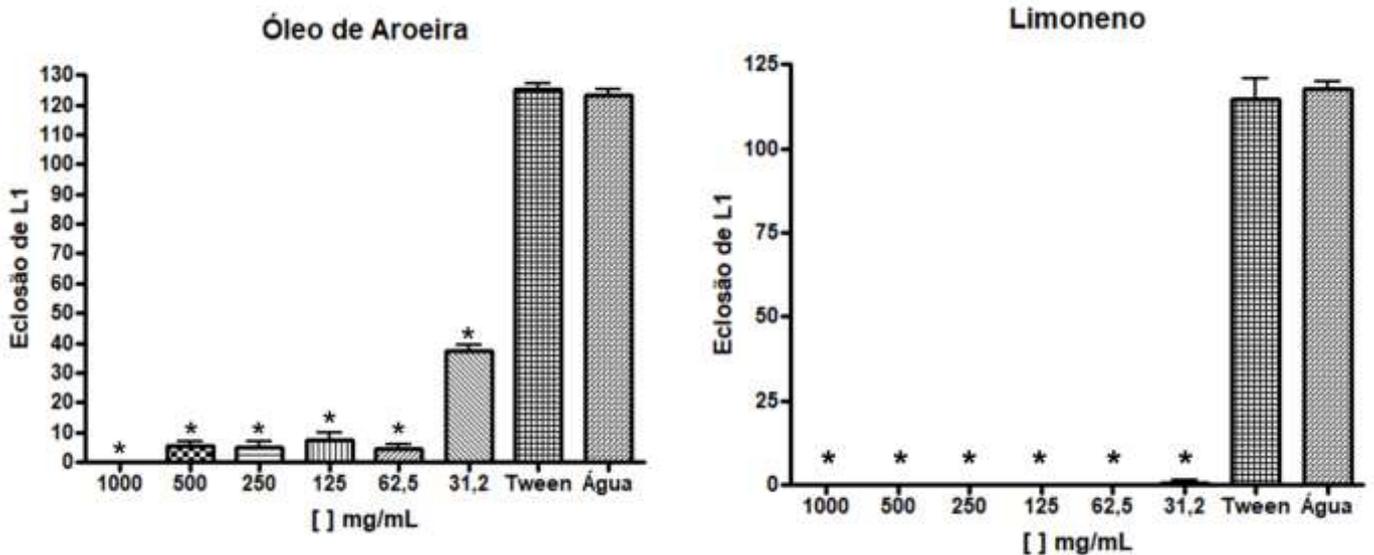
Massa seca (g)	Teor de umidade dos frutos (%)	Rendimento do óleo essencial (%)	Densidade (g/mL)
150	12,56	2,96	0,892

4.3 Teste de atividade ovicida do óleo essencial de aroeira e limoneno

De modo geral, os resultados referentes a atividade do OE de aroeira e limoneno foram significativamente promissores, em vista de terem apresentado capacidade de inibir a eclosão larval muito acima de 50% (Figuras 6,7) em todas as concentrações testadas, nas mais altas concentrações se obteve um resultado superior a 90% nos ensaios usando o OE de aroeira, já o limoneno apresentou 100% de inibição da eclosão larval, exceto na concentração de 31,2 mg/mL após as 48 horas

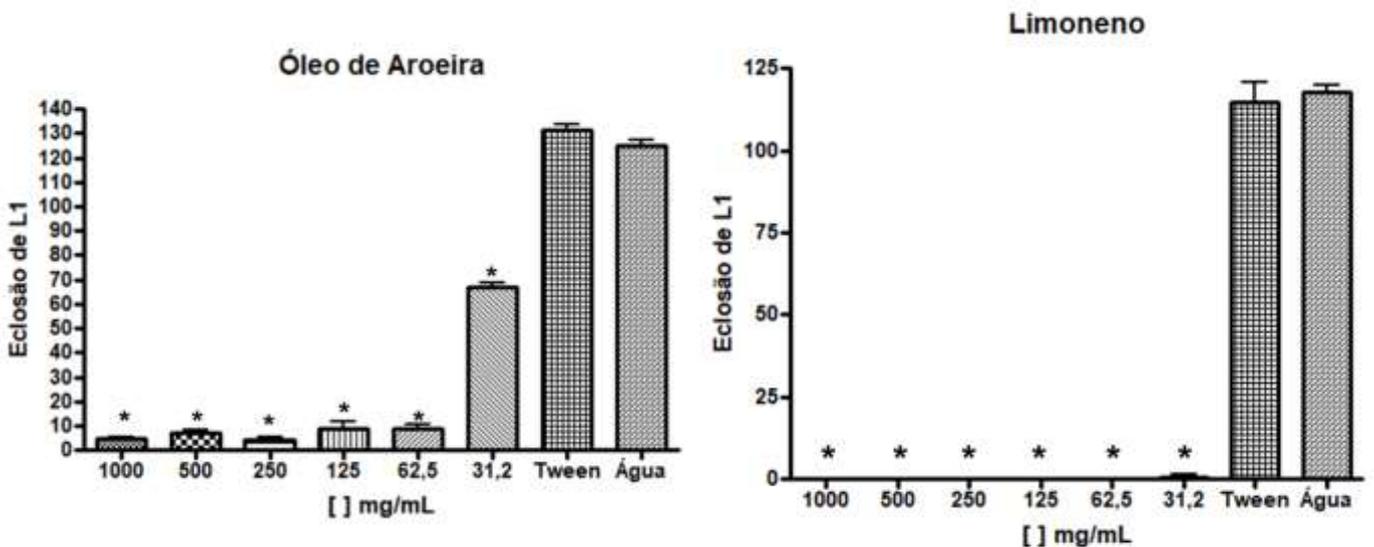
de interação. Os ensaios *in vitro* demonstraram que tanto o limoneno quanto o óleo essencial de aroeira foram eficazes na inibição da eclosão. Notavelmente, o limoneno puro comercial manteve sua eficácia em todas as concentrações testadas.

Figura 6: Estimativa de eclosão larval após interação de 24 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.



Estatisticamente diferente ao nível de significância $P < 0,001$ (*) pelo Teste de Tukey.

Figura 7: Estimativa de eclosão larval após interação de 48 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

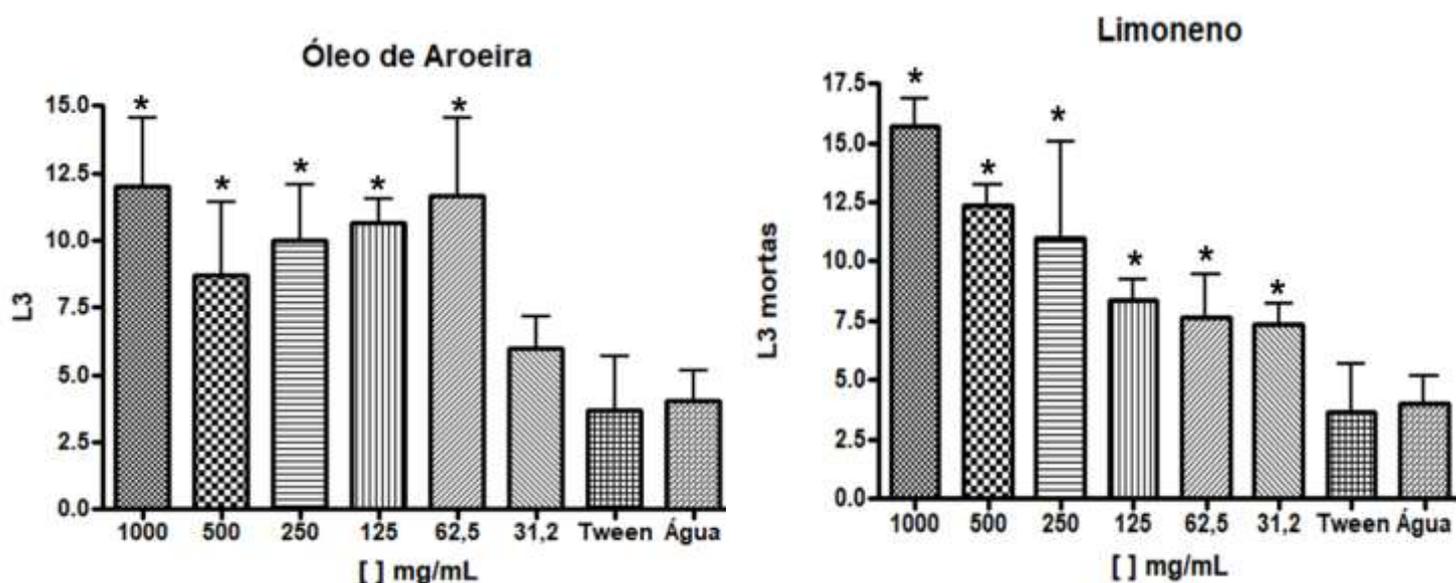


Estatisticamente diferente ao nível de significância $P < 0,001$ (*) pelo Teste de Tukey.

4.4 Teste de atividade anti-helmíntica do óleo essencial de aroeira e limoneno

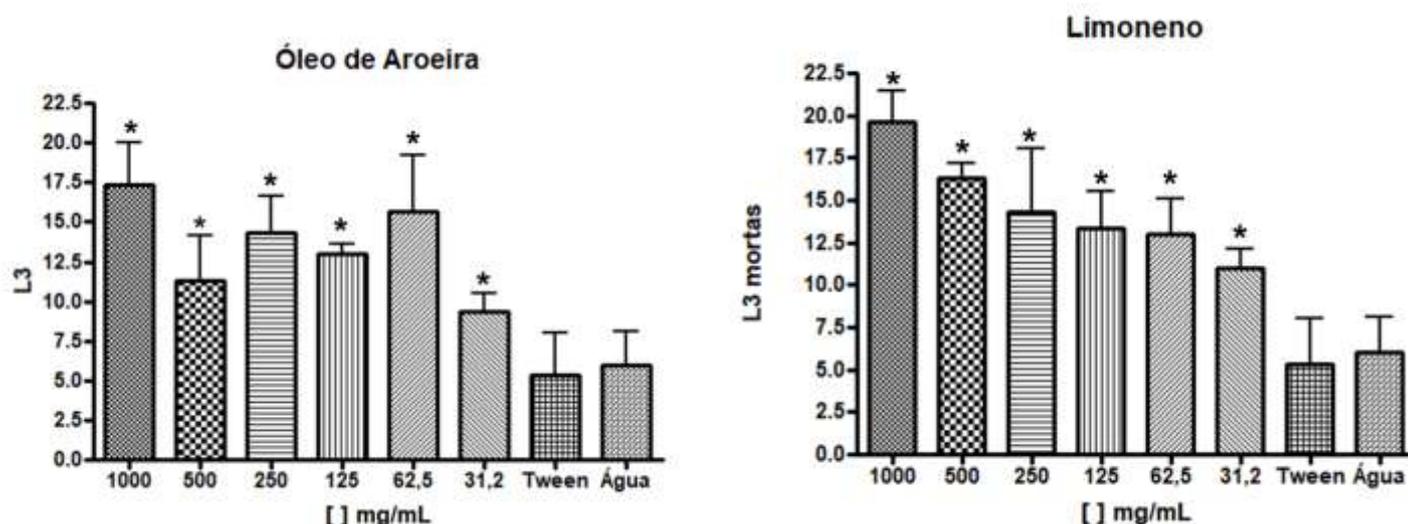
Nos ensaios onde foram avaliados o OE de aroeira e limoneno puro comercial frente as L3, verificou-se que a capacidade de mortalidade das larvas foram de aproximadamente 17% na maior concentração (1000 mg/mL) para o limoneno, os valores seguiram muito próximos para o OE de aroeira com aproximadamente 15% de mortalidade larval para a mesma concentração após 24 horas de interação (Figura 8), com 48 horas de interação foi observado o aumento da mortalidade larval sendo de 20 % para o OE de aroeira e 22,5 % para o limoneno na maior concentração (1000 mg/mL) (Figura 9) .

Figura 8: Estimativa da mortalidade larval (L3) após interação de 24 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.



Estatisticamente diferente ao nível de significância $P < 0,001$ (*) pelo Teste de Tukey.

Figura 9: Estimativa da mortalidade larval (L3) após interação de 48 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

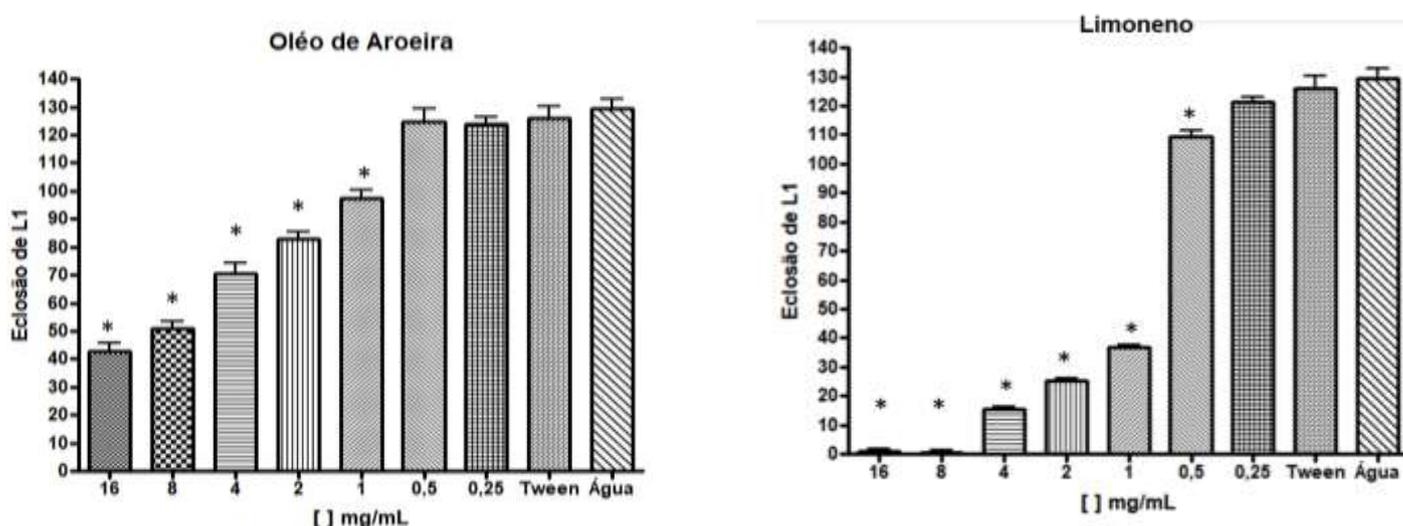


Estatisticamente diferente ao nível de significância $P < 0,001$ (*) pelo Teste de Tukey.

4.5 Concentração da inibição da eclosão larval (CI_{50})

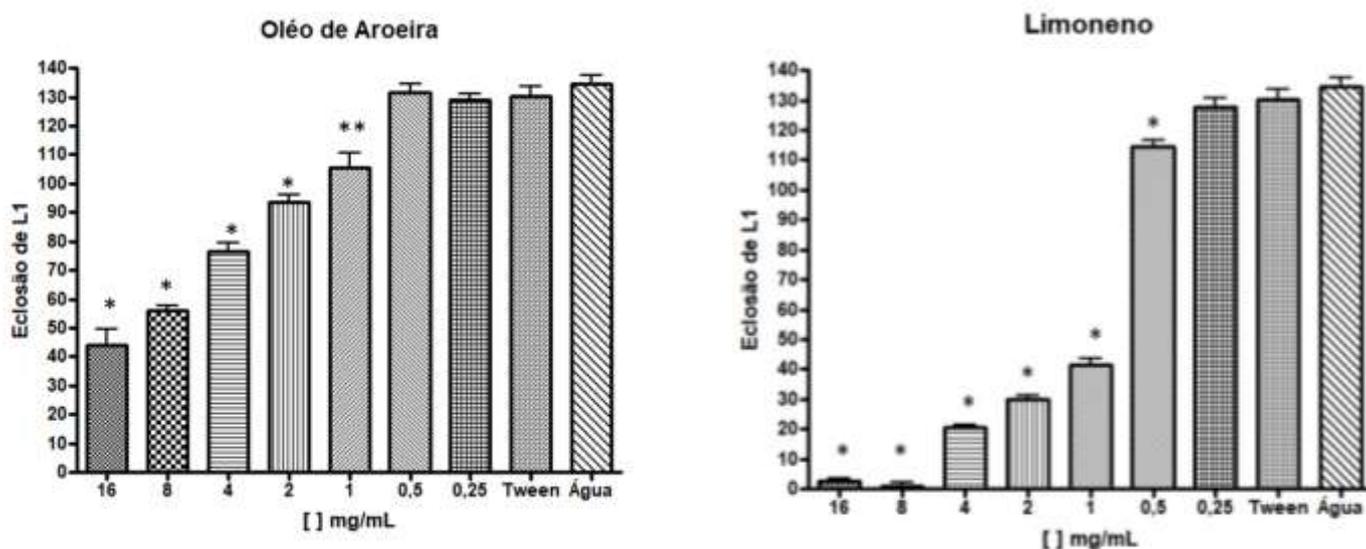
A CI_{50} observada para OE de aroeira situou-se entre 16 e 8,0 mg/mL enquanto para o limoneno entre 1 mg/mL (Figuras 10 e 11).

Figura 10: Estimativa da CI_{50} frente a inibição da eclosão larval após interação de 24 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.



Estatisticamente diferente ao nível de significância $P < 0,001$ (*) pelo Teste de Tukey.

Figura 11: Estimativa da CI50 frente a inibição da eclosão larval após interação de 48 horas com óleo essencial de aroeira e limoneno.

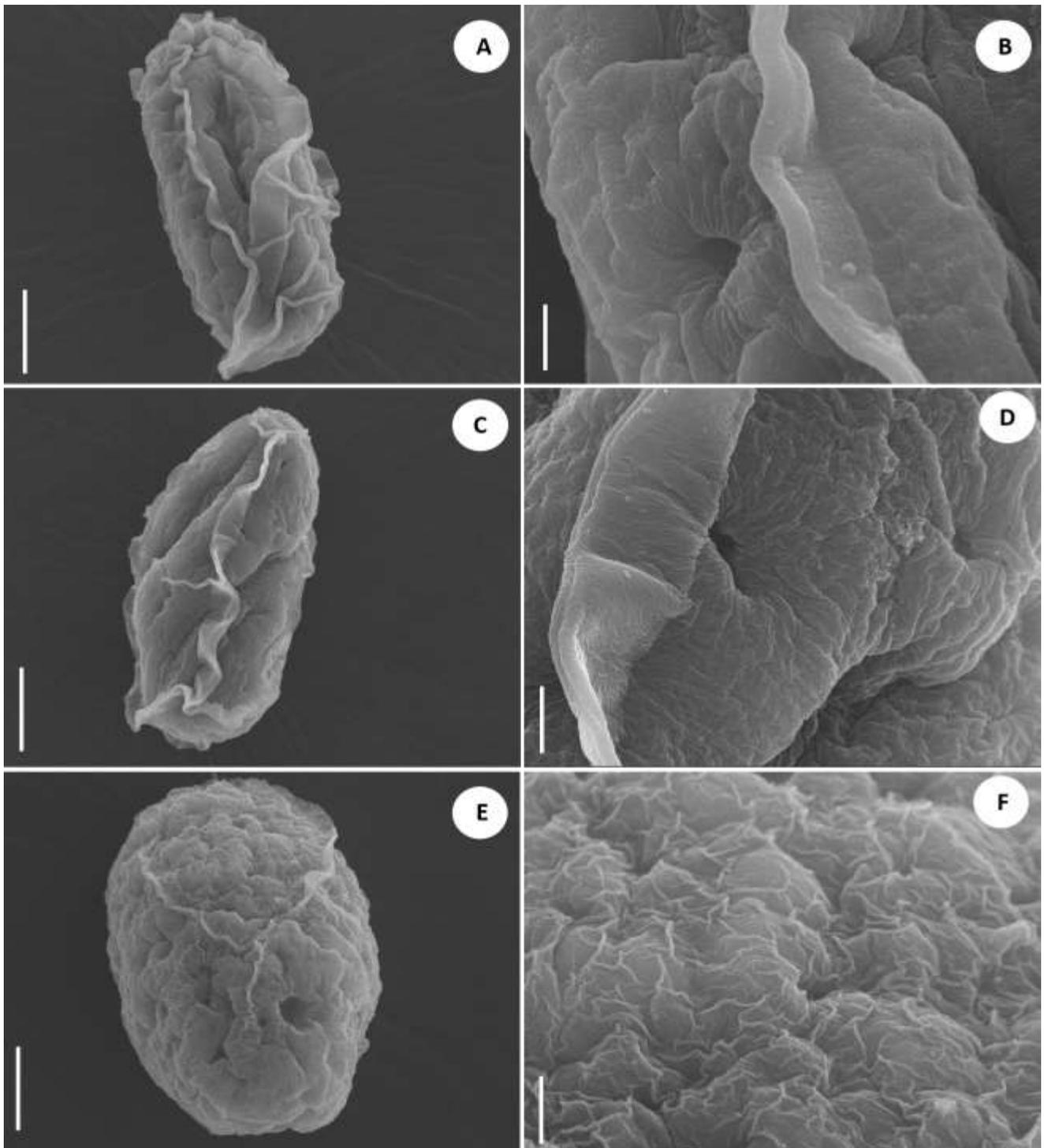


Estatisticamente diferente ao nível de significância * ($P < 0.001$), ** ($P < 0.01$) pelo Teste de Tukey.

4.6 Análises de microscopia eletrônica de varredura

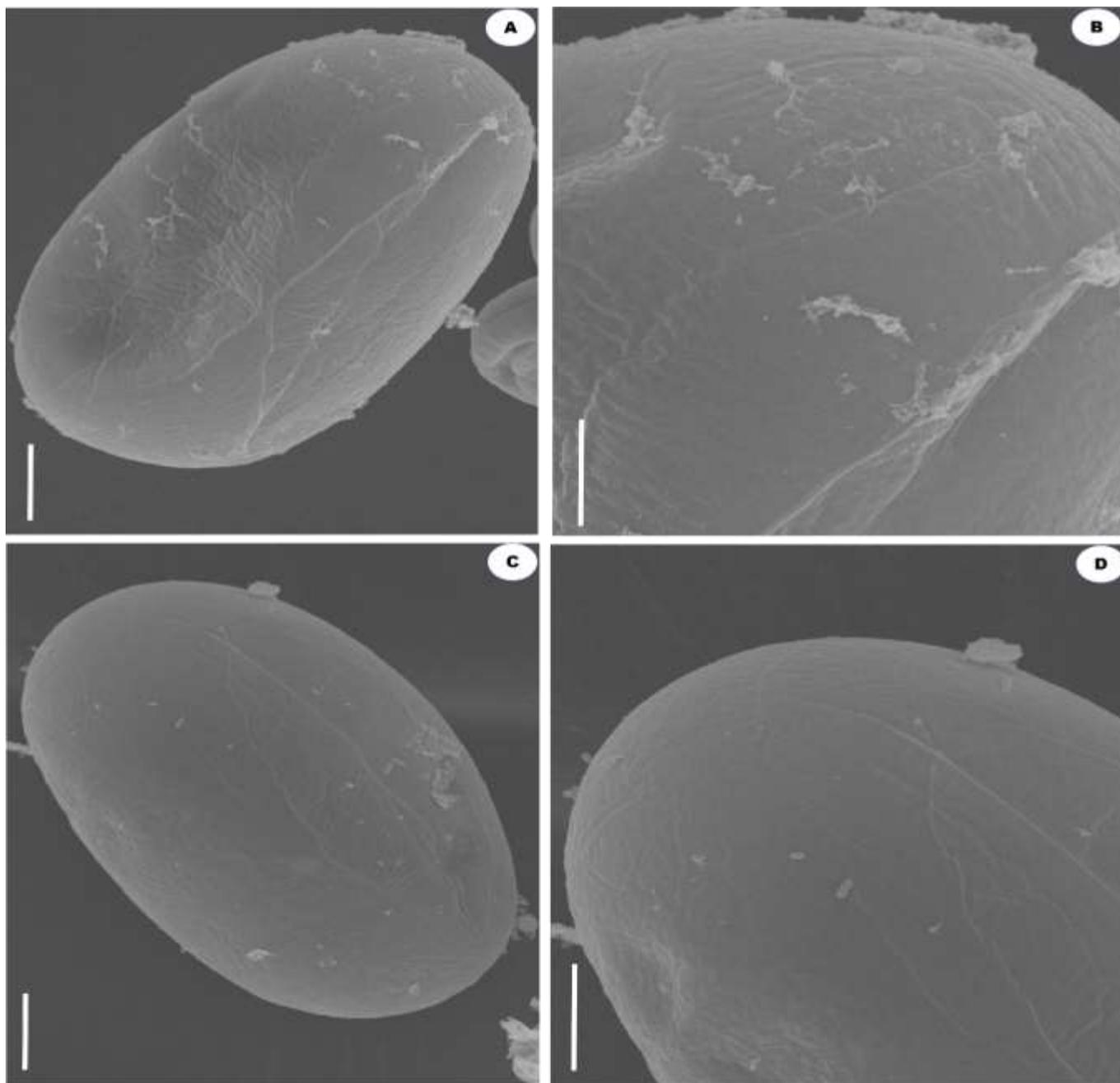
Os resultados mostraram que tanto o óleo essencial de *S. terebinthifolia* Raddi quanto limoneno puro comercial são capazes de induzir alterações significativas na camada mais externa dos ovos (Figura 12) quando comparado ao controle (Figura 13). A superfície dos ovos tratados demonstrou-se irregular caracterizada por um enrugamento, protuberâncias e perfurações ao passo que nos ovos dos controles a superfície manteve-se íntegra. Na Figura 12, pode-se visualizar uma perda significativa nas estruturas externas dos ovos ocorrendo até mesmo descamações, devido a capacidade do limoneno para dissolução lipídios, quando comparado com o controle que não recebeu tratamento (Figura 13) e as estruturas permaneceram íntegras.

Figura 12: Micrografias (M.E.V) ovos nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com OE de aroeira e limoneno.



Ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com limoneno (A e B) na concentração de 1000mg/mL, ovos tratados com OE de aroeira concentração 1000 mg/mL (C e D), ovos tratados com OE de aroeira concentração 31,2 mg/mL (E e F). Barras: A, C e E = 10 μ m; B, D e F= 5 μ m.

Figura 13: Micrografias (M.E.V) de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos não tratados.

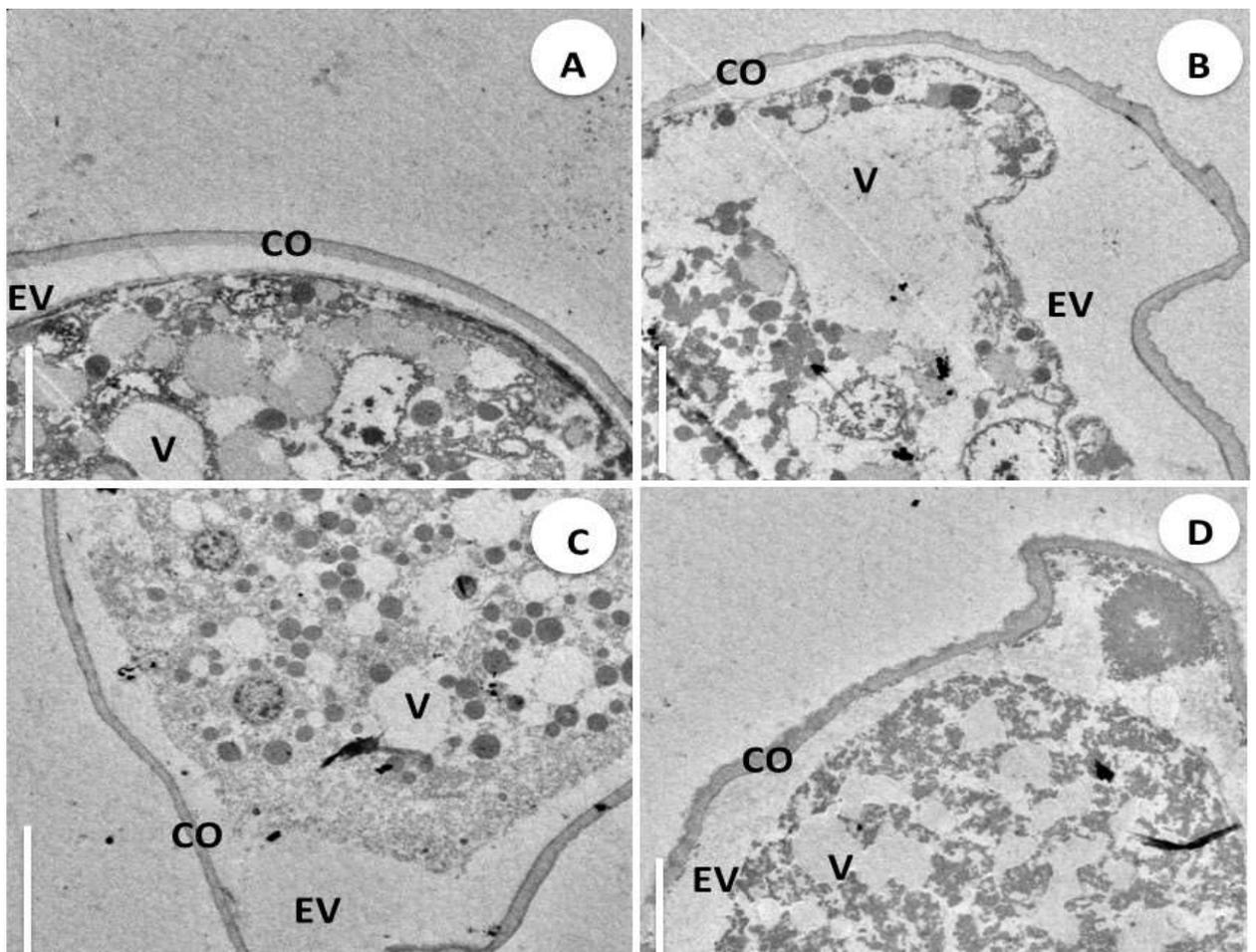


Micrografias de MEV de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos cultivados em água destilada (A e B) e Tween 80 a 1% (C e D). Barras: A e B 10 μ m; C e D = 5 μ m.

4.7 Análises de microscopia eletrônica de transmissão

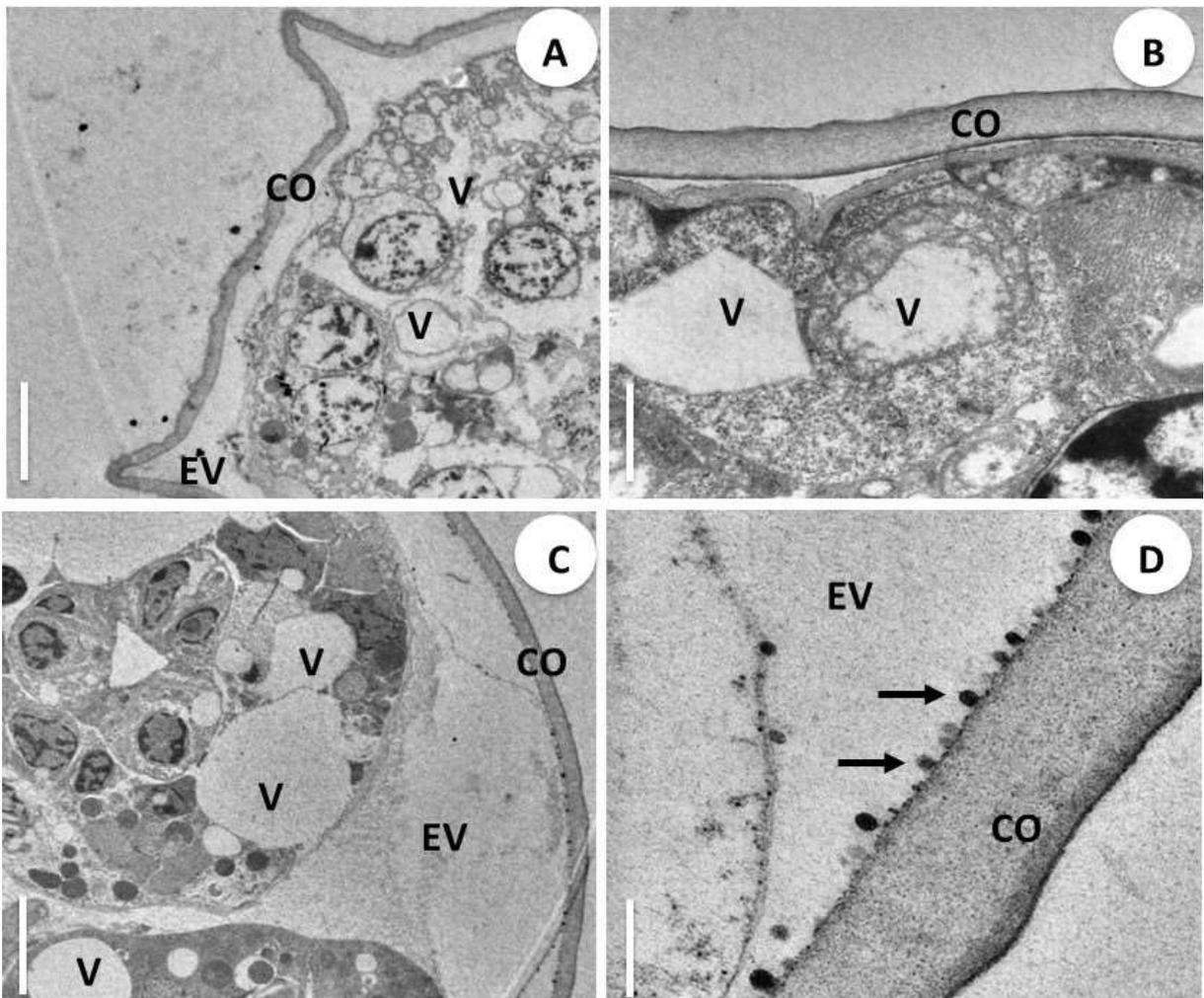
Nos resultados obtidos por meio das análises de microscopia de transmissão foram percebidas alterações na estrutura interna e na casca dos ovos tratados (Figuras 14 e 15) comparativamente ao observado nos controles (Figura 16). As cascas dos ovos tratados apresentaram deformações, internamente foi possível notar a presença de vacúolos e ainda vesículas eletrondensas na proximidade da camada vitelínica da casca ou no espaço vitelínico (Figura 15 D) nitidamente as estruturas internas apresentam-se como que desorganizadas ao passo que nos controles percebe-se uma preservação desta organização.

Figura 14: Micrografias (M.E.T) ovos nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com limoneno.



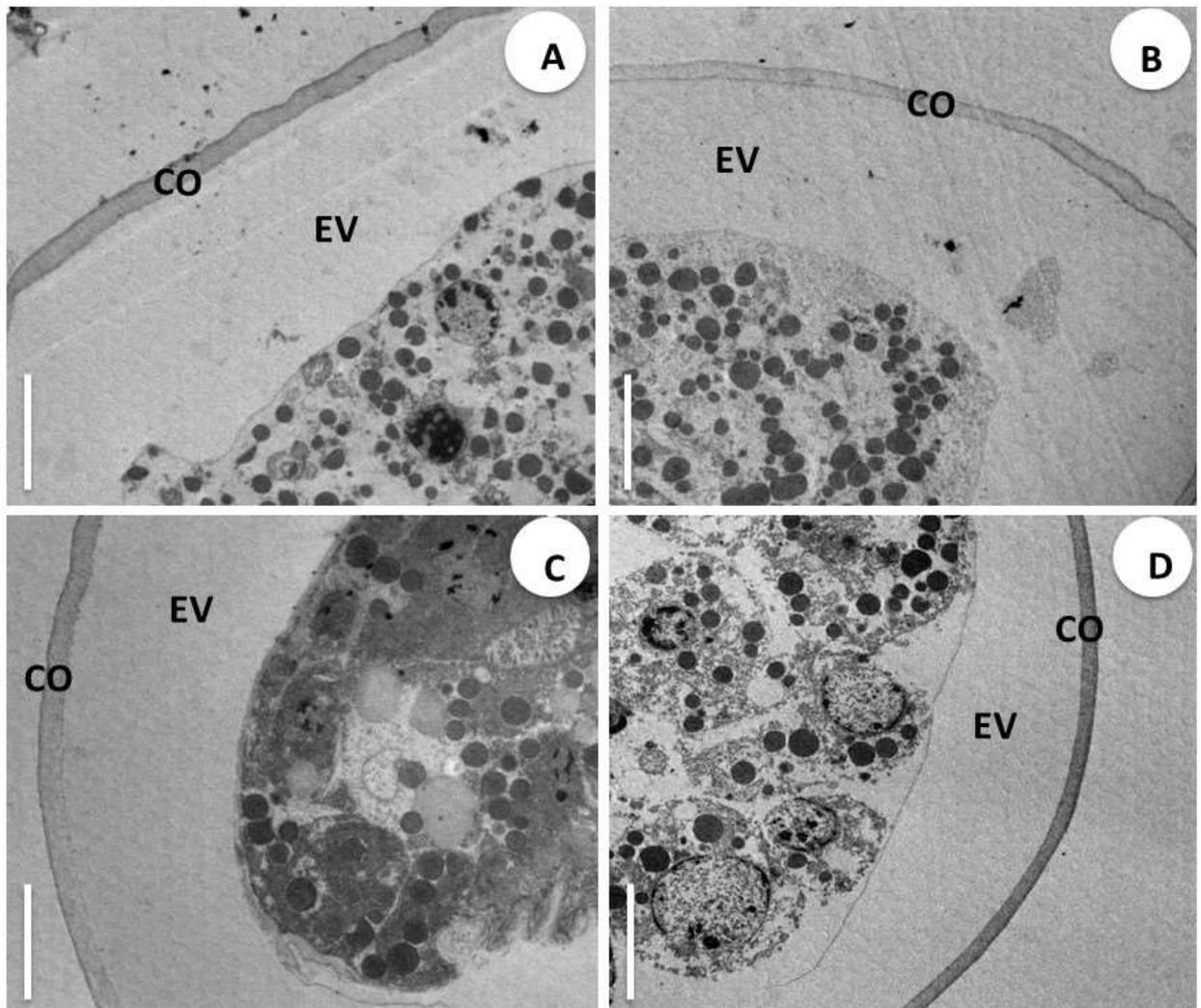
Ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com limoneno (A e B) nas concentrações de 1000mg/mL e 31,2 mg/mL (C e D). casca do ovo (CO), espaço vitelínico (EV), vacúolo (V). Barras: A, B, e C = 10 μ m; D = 5 μ m.

Figura 15: Micrografias (M.E.T) ovos nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com OE de aroeira.



Ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com OE de aroeira (A e B) nas concentrações de 1000mg/mL e 31,2 mg/mL (C e D). Casca do ovo (CO), espaço vitelínico (EV), vacúolo (V), vesícula eletrondensas (seta). Barras: A, B= 5 μ m; C e D= 2 μ m.

Figura 16: Micrografias (M.E.T) ovos nematoides gastrintestinais de ovinos não tratados



Micrografias de MET de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos cultivados em água destilada (A, B e C) e Tween⁸⁰ a 1% (D, E e F) cortes transversais. Casca do ovo (CO), espaço vitelínico (EV), vacúolo (V). Barras: B 10 μm ; A, C, D, E e F = 5 μm .

5. DISCUSSÃO

Diante do aumento da resistência de nematoides gastrintestinais, o estudo de plantas como bioativas surge como uma perspectiva viável para a descoberta de novos fármacos. Neste contexto, a descoberta de compostos naturais que possam ser eficazes contra os nematoides que afetam ovinos é de suma importância, dado o crescente número de casos de resistência parasitária contra anti-helmínticos convencionais. Aqui, demonstrou-se que OE de aroeira apresentou majoritariamente limoneno e este composto apresentou atividade biológica elevada contra ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos alterando a morfologia superficial da casca do ovo, o desenvolvimento do embrião e ocasionando a inibição da eclosão larval.

O óleo essencial de aroeira e o limoneno puro comercial demonstraram atividade efetiva na mortalidade de larvas infectantes (L3) de nematoides gastrintestinais de ovinos, especificamente nas maiores concentrações de 1000 e 500 mg/mL. Diante disso, quando se estima a CI_{50} para o limoneno, através das Figuras 9 e 10, observa-se que a concentração que inibe 50% da eclosão de larvas (L1) é um pouco menor comparada com a concentração CI_{50} do OE de aroeira, o que indica que o limoneno puro tende a ser mais tóxico aos ovos de nematoides, aproximadamente 16 mg/mL corresponde a CI_{50} para o OE de aroeira e 1,0 mg/mL para a CI_{50} do limoneno comercial (Figuras 10 e 11). Para eficácia do composto ser constatada ao se comparar com outros estudos deve apresentar dados similares ou melhores, como Katiki e colaboradores (2017), que obtiveram uma CI_{50} do limoneno para inibição de eclodibilidade de 207,56 mg/mL, uma dose muito maior do que apresenta esse estudo, demonstrando o potencial ovicida tanto do limoneno quanto do óleo essencial. Todavia, os resultados percentuais foram baixos, em comparação a capacidade de inibição da eclosão larval, em todas as concentrações testadas, os compostos mostraram-se eficientes e posteriormente eficazes na morte das L1 eclodidas na menor concentração de 31,2 mg/mL. A atividade biológica do limoneno já vem sendo relatada por estudos, dentre os diversos efeitos do limoneno sobre os microrganismos, o mais evidente é a desestruturação de suas membranas e paredes celulares, estruturas protetoras essenciais para a sua sobrevivência.

Nos ensaios onde foram avaliados o OE de aroeira e limoneno puro comercial frente as L3, verificou-se que, independentemente das concentrações testadas a

capacidade de mortalidade das larvas (Figura 8 e 9) não foi tão promissora quanto na inibição da eclosão larval, a ação dos compostos sobre os ovos foi maior, seguindo pelas larvas de primeiro estágio (L1). A maior parte da atividade nos ovos podem ser atribuída às características das camadas protetoras, que, por sua vez, podem apresentar menor barreira à penetração dos compostos avaliados. O OE de aroeira e o limoneno apresentaram diferenças estatísticas em relação as testemunhas, com eficácia de 20% para o limoneno e 17% para o OE de aroeira nas concentrações mais altas, essa diferença de eficácia pode estar relacionada diretamente aos constituintes presentes e à concentração dos mesmos, demonstrando que o limoneno puro comercial é mais letal para as larvas em relação ao óleo essencial que em sua composição apresenta 53,49% de limoneno dentre outros constituintes do óleo essencial.

Essa ação do limoneno foi comprovada por diversos estudos que utilizaram técnicas avançadas de microscopia eletrônica, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Através dessas técnicas, observaram que células de bactérias e fungos, após o tratamento com limoneno, apresentavam alterações significativas em sua forma, na distribuição do seu conteúdo interno (citoplasma) e na espessura da parede celular. Nas figuras (12, 13,14, 15 e 16) pode-se ver a diferença significativa nos ovos de nematoides gastrintestinais em relação a formas das estruturas dos ovos e também o extravasamento dos conteúdos internos dos ovos, o limoneno age diretamente na estrutura dos microrganismos, danificando suas membranas e paredes celulares, o que compromete sua forma, organização interna e resistência, podendo levar à sua morte.

Além de danificar as estruturas externas dos microrganismos, o limoneno também interfere em diversas funções celulares essenciais. Ele aumenta a permeabilidade da membrana celular, o que significa que a membrana, que normalmente controla o que entra e sai da célula, se torna mais porosa. Isso permite que substâncias nocivas entrem na célula e componentes importantes vazem, prejudicando o funcionamento celular, altera também o potencial da membrana, que é a diferença de carga elétrica entre o interior e o exterior da célula (Gupta, Jeyakumar e Lawrence, 2021). Essa alteração interfere em processos celulares importantes,

como a comunicação entre as células e a geração de energia. É possível que um processo similar tenha sido desencadeado sobre os ovos de ovinos tratados com OE de aroeira e limoneno a partir de um aumento de porosidade das camadas da casca e difusão pelo interior do ovo. Outro efeito do limoneno é a diminuição da resistência ao calor dos microrganismos. Isso significa que os microrganismos se tornam mais sensíveis a altas temperaturas, o que pode ser prejudicial para sua sobrevivência em ambientes mais quentes (Sieniawska et al., 2015; Han, Sun e Chen, 2019).

O limoneno também causa o vazamento de substâncias intracelulares, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Essas substâncias são essenciais para o funcionamento da célula, e seu vazamento pode levar à disfunção e até mesmo à morte celular. Em altas concentrações, o limoneno pode até mesmo causar a lise celular, que é a ruptura da célula. Esse efeito é provavelmente devido às propriedades lipofílicas e hidrofóbicas que permitem que ele desorganize a estrutura das células. O limoneno tem se mostrado promissor como agente antibacteriano e antifúngico em diversos estudos. No entanto, apesar desses resultados promissores, ainda há uma lacuna no conhecimento sobre seus mecanismos de ação em detalhes. Com isso, trabalhos sobre outras bioatividades, como sua ação contra vermes parasitas (atividade anti-helmíntica) e suas propriedades farmacológicas em geral, são ainda mais escassas (Yu et al., 2022; Melkina et al., 2021; Lin et al., 2024).

Estudos sobre os efeitos ovicidas, ou seja, a capacidade de matar ovos de parasitas, de óleos essenciais em nematoides gastrintestinais de ovinos são raros na literatura. Da mesma forma, o modo como esses óleos atuam nesses parasitas ainda não foi completamente elucidado. No entanto, existe a hipótese de que os óleos essenciais de algumas espécies vegetais, exerçam seu efeito através da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Essa enzima é essencial para o funcionamento do sistema nervoso de vertebrados e invertebrados. Ao inibir a AChE, os óleos essenciais podem causar danos neurotóxicos nos nematoides, de forma semelhante ao que ocorre com os organofosforados, um tipo de pesticida (López e Pascual-Villalobos, 2010).

Essa hipótese sugere que os óleos essenciais podem ser uma alternativa promissora para o controle de nematoides em ovinos, atuando de forma diferente dos

vermífugos tradicionais e, potencialmente, com menor risco de desenvolvimento de resistência por parte dos parasitos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para confirmar essa hipótese e determinar a eficácia e segurança do uso de óleos essenciais no controle de nematoides em ovinos.

A aroeira (*S. terebinthifolius Raddi*) é uma planta rica em compostos biologicamente ativos, como alcaloides e óleos essenciais, que possui um grande potencial biotecnológico, devido as suas propriedades. O óleo essencial da aroeira, em particular, possui diversas aplicações terapêuticas devido à sua composição rica em terpenos, como α -pineno, δ -careno, limoneno e α -felandreno (Pereira et al.,2021), muito similar aos compostos encontrados neste estudo, esses compostos pertencem ao grupo dos hidrocarbonetos, especificamente monoterpenos hidrogenados, sesquiterpenos hidrogenados e sesquiterpenos oxigenados, os terpenos em questão, assim como outros compostos dessa classe, são insolúveis em água e, quando em estado puro, apresentam-se na forma oleosa como demonstrado na Tabela 1 (Karl et al., 2002.), entretanto no trabalho de Oliveira Junior et al (2013) o óleo apresentou os compostos p -menth-1-en-9-ol, o canfeno, o germacreno-D, o hedicariol, o α -gurjuneno, o α -eudesmol e o β -eudesmol como compostos majoritários. Assim como no trabalho de Barbosa et al., 2007; Santos et al., 2007 onde o perfil fotoquímico foi identificado compostos como α -felandreno, β -felandreno, elemol, α -cadiol, sabineno, δ -3-careno e sylvestreno em amostras de aroeira. No entanto, a presente pesquisa apenas detectou alguns compostos similares, o que evidencia a influência significativa de fatores genéticos e abióticos na composição química do óleo essencial da aroeira, corroborando com a literatura que descreve a ampla variação na composição química de óleos essenciais de plantas, atribuída a fatores genéticos e ambientais (Ibraim et al., 2001).

Além disso, o óleo essencial da aroeira apresenta atividade antimicrobiana, sendo eficaz contra bactérias e ácaros (Moura, Raffin e Santos, 2011; Silva et al.,2010). Estudos demonstraram sua ação contra diversas espécies bacterianas e também seu efeito acaricida, ou seja, a capacidade de matar ácaros, também investigaram o potencial do óleo essencial da aroeira no tratamento de células de câncer de mama humano (MCF-7), com resultados promissores (Bendoud et al.,2010). Adicionalmente, o óleo essencial da aroeira demonstrou atividade fungicida,

sendo eficaz contra fungos (Braga *et al.*,2007). Em um estudo experimental realizado por Shalders e colaboradores (2014), a adição de frutos de aroeira na alimentação de caprinos mostrou-se eficaz no controle parasitário, reduzindo a carga de parasitas sem comprometer o estado nutricional dos animais, demonstrando assim a potencialidade da aroeira como uma agente anti-helmíntica.

Os resultados promissores obtidos com o estudo de óleos essenciais e seus compostos para o controle de nematoides gastrintestinais representam um avanço significativo na busca por alternativas terapêuticas. A necessidade urgente por soluções eficazes e sustentáveis para combater as nematodioses. Apesar do grande potencial demonstrado, o estudo dos óleos essenciais e seus compostos ainda exige investigações mais aprofundadas para que se possa compreender completamente seus mecanismos de ação e validar sua eficácia. A identificação dos princípios ativos presentes é um passo crucial. É preciso isolar e caracterizar os compostos bioativos responsáveis pela atividade anti-helmíntica, para que se possa entender como atuam sobre os nematoides.

6. CONCLUSÃO

O óleo essencial de aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi) e o limoneno puro comercial mostraram-se eficientes frente a inibição da eclosão larval dos ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos.

Com base nos resultados, sugere-se a realização de mais estudos, como ensaios *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÃO, D. C., ABRÃO, S., VIANA, C. H. C., VALLE, C. R. Utilização do método Famacha no diagnóstico clínico individual de haemoncose em ovinos no Sudoeste do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p. 70-72,2010.
- ADAMS, H. R. Farmacologia e terapêutica em veterinária. 8ed. Rio de Janeiro, RJ: **Guanabara Koogan**. p. 791-818, 2003.
- ADAMS,R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass, spectroscopy, 4th ed. **Allured Publ**, Carol Stream, 2007.
- ALMEIDA, B. H., SANTOS, G. L. F. Ovinocaprinocultura e os principais helmintos gastrintestinais. In: BEZERRA, A. C. D. S., and SILVA, M. D. C., eds. Fitoterapia e a Ovinocaprinocultura: uma associação promissora. **Mossoró: EdUFERSA**, pp. 27-48, 2018.
- ALVES, Renato Vaz et al. Caracterização da caprinocultura leiteira no Cariri Ocidental, Semiárido Paraibano, Nordeste do Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e286111234254-e286111234254, 2022.
- AMARANTE, A. F. T. Nematoides gastrintestinais em ovinos. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2009.
- AMARANTE, A.T. SILVA, F.; RAGOZO, A. M. A. (Orgs). **Os parasitas de ovinos**. São Paulo: Unesp Digital, 2015.
- ANDRADE, Joana M. et al. Rosmarinus officinalis L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future science OA**, v. 4, n. 4, p. FSO283, 2018.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plantderived natural products: A review. **Biotechnol**, p.1582–1614, 2015.
- AYE, M. M., et al. A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected Myanmar medicinal plants. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 293, 2019.
- BARBOSA, L. C. A. et al. Seasonal variation in the composition of volatile oils from Schinus terebintifolius RADDI. **Química Nova**, v. 30, n 8, p. 1959 - 1965, 2007.
- BENDAOUD, Houcine et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus molle L. and Schinus terebinthifolius Raddi berries essential oils. **Journal of food Science**, v. 75, n. 6, p. C466-C472, 2010.
- BERTI, F. E.; MACEDO, L. P. M. 2010. Fundamentos de controle biológico de insetos-praga. Catalogação da publicação na fonte. Biblioteca Sebastião Fernandes (BSF) – IFRN, 108.

BEYS-DA-SILVA, W. O. et al. 2020. Updating the Application of *Metarhizium Anisopliae* to Control Cattle Tick *Rhipicephalus Microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology** 208(1): 1-29.

BIRD, A.F. Alterações associadas ao parasitismo em nematoides. III. Ultraestrutura da casca do ovo, cutícula larval e conteúdo das glândulas esofágicas subventrais em *Meloidogyne javanica*, com algumas observações sobre a eclosão. **The Journal of Parasitology**, 1968. doi:10.2307/3277069

BODRI, Michael S. Nematodes. **Invertebrate Medicine**, p. 537-561, 2022. <https://doi.org/10.1002/9781119569831.ch21>.

Bonadiman SF, Ederli NB, Soares AKP, Moraes Neto AHA, Santos CP, DaMatta RA. Occurrence of *Libyostrongylus* sp. (Nematoda) in ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) from the north region of the state of Rio de Janeiro, **Brazil. Vet Parasitol** 2006; 137(1-2): 175-179.

BRAGA F.G., et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 111 (2):396-402, 2007.

CAVALCANTE, A.C.R. et al. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, p. 603, 2009.

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de ovinos deslanados no semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 25, p.437-442, 1995.

COLES, G.C. et al. methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. **World association for the advancement of determinar parasitology (WAAVP)**, v.44, p.35–44, 1992.

COSTA, P.T. et al. Eficácia anti-helmíntica comparativa do nitroxinil, levamisol, closantel, moxidectina e fenbendazole no controle parasitário em ovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v.74, n.1, p.72-78, 2017.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; CORREA, F. R. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, ed.1, p.65-71, 2011.

Decraemer W, Karanastasi E, Brown D, Backeljau T. Review of the ultrastructure of the nematode body cuticle and its phylogenetic interpretation. **Biol Rev Camb Philos Soc**. 2003 Aug;78(3):465-510. doi: 10.1017/s1464793102006115. PMID: 14558593.

DA SILVA OLIVEIRA, G. G., *et al.* resistência parasitária a anti-helmínticos e saúde única: desafios e oportunidades na integração de abordagens de saúde humana e animal. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 10, n. 11, p. 7417-7431, 2024.

DA SILVA R. F. F., *et al.* Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. **Pubvet**, v. 12, p. 147, 2018.

- DATTA, R. et al. Determination of prevalence and associated risk factors of gastrointestinal nematodes in cattle at Sylhet Region, Bangladesh S. **Asian J. Life Sci**, v. 12, p. 59-63, 2024.
- DE JESUS, J. O. et al. Controle de nematódeos gastrintestinais e resistência anti-helmíntica em ovinos na região Sul do Brasil. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 4, p. 094-094, 2017.
- DOS SANTOS, A.E. Importância química e biológica dos óleos voláteis de espécies do gênero Eucalyptus. **Scientia Naturalis**, v. 3, n. 1, 2021.
- DOS SANTOS, Thayna Ferreira Bispo et al. Atividade anti-helmíntica do extrato etanólico das folhas da Arrabidaea chica sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Scientia Naturalis**, v. 3, n. 1, 2021.
- DRUDGE, J. H. et al. Field studies on parasite control of sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1512– 1518., 1964.
- FENALTIA, J. M. et al. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **Vittale – Revista de Ciências da Saúde**, v.28, p. 39-48, 2016.
- FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. Finlay. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. **Manaus: Norma Editora**, v. 1, p. 251, 2016.FOREYT, William J. Efficacy of a fenbendazole-triclabendazole combination against Fasciola hepatica and gastrointestinal nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 3-4, p. 265-271, 1988.
- GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P.U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.
- GARCIA, Carla et al. Essential oils in the control of Botrytis cinera: influence on post harvest quality of Rubi grapes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.
- GÓES, D. F. et al. Toxic activity of essential oil of piper duckei (piperaceae) on microcrustacean artemia salina. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 96278-96284, 2020.
- GOMES, H. O. et al. A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 197, p. 110627, 2020.
- GUPTA, Akshi; JEYAKUMAR, Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in Escherichia coli. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 13816, 2021.
- HAN, Yingjie; SUN, Zhichang; CHEN, Wenxue. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against Listeria monocytogenes. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 33, 2019.
- HEMPSTEAD, M. N. et al. Worms and welfare: Behavioural and physiological changes associated with gastrointestinal nematode parasitism in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 324, p. 110056, 2023.

HOLSBACK, L.; DE SOUZA M.E.; MENEGHEL, P.P. Resistência parasitária de helmintos gastrointestinais e avaliação dos parâmetros hematológicos de ovinos no norte do Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. 1, p. 76-84, 2013.

HUSSEY, Richard S.; WILLIAMSON, Valerie M. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. **Plant and nematode Interactions**, v. 36, p. 87-108, 1998.

IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science IN FINLAND**, v. 10, p. 243-259, 2001.

JONGEDIJK, E., et al. Biotechnological production of limonene in microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 2927-2938, 2016.

KARL, G. F. et al. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2002.

KATIKI, L.M., et al. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47-51, 2017.

LIN, H. et al. D-Limonene: Promising and Sustainable Natural Bioactive Compound. **Appl. Sci.**, v. 14, p. 4605, 2024. <https://doi.org/10.3390/app14114605>

LITTLE, P R. et al. Efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel- abamectin, in sheep in New Zealand anthelmintic, derquantelabamectin, in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 169, p. 121–129, 2010.

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

LORENZI, H. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2o ed. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, 2008.

LUZ, H. S. et al. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 657-662, 2014.

MAGGIERI, M.G.A et al. Influência do pré-tratamento da matéria-prima na obtenção de óleo essencial de frutos de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 2099-2104, 2015.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165(1): p. 46–53, 2019.

MASLER, Edward P.; ROGERS, Stephen T. Effects of cyst components and low temperature exposure of *Heterodera glycines* eggs on juvenile hatching in vitro. **Nematology**, v. 13, n. 7, p. 837-844, 2011.

MELKINA, Olga E. et al. The mode of action of cyclic monoterpenes (-)-limonene and (+)- α -pinene on bacterial cells. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 806, 2021.

- MKANDAWIRE, T. T. *et al.* Hatching of parasitic nematode eggs: a crucial step determining infection. **Trends in Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2022.
- MOLENTO, M. B. *et al.* Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 80, n. 2, p. 253–263, 2013.
- MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, n. 0, p. 82-86, 2004.
- MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Roca, p.1052,2007.
- MOTTIN, V. D. *et al.* Efficacy, toxicity, and lethality of plants with potential anthelmintic activity in small ruminants in Brazil. **Revista Brasil Saúde Produção animal de Salvador**, v. 20,2019.
- MOURA, T.F.A.L, RAFFIN. F.N, SANTOS, A.L.R. Evaluation of a preservative system in a gel containing hydroalcoholic extract of *Schinus terebinthifolius*. **Rev. Bras. farmacogn.** 21(3):532-36, 2011.
- NOVOBILSKY, *et al.* Condensed tannins act against cattle nematodes. *Veterinary Parasitology*, v. 182, Issues 2–4, p. 213-220, 2011.
- NUNES, A.C.B., *et al.* Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais. **TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL XII**, p. 187, 2023.
- OLIVEIRA, I. D. S. D. S *et al.* *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) seed oil: chemical composition and antileishmanial activity of limonoid-rich fractions. **Biomedicine Research International**, v. 2018, p. 1-10, 2018.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T. *Parasitologia Animal: Animais de Produção*. **EPUB**, p.158, 2001
- OSÓRIO, T. M. *et al.* Resistência anti-helmíntica em nematódeos gastrointestinais na ovinocultura: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 89194-89205, 2020.
- PEREIRA, D.P. *et al.* Potencial biotecnológico da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Uma revisão narrativa. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 13, n. 01, p. 25-37, 2021.
- PERRY, R. N.; CLARKE, A. J. Hatching mechanisms of nematodes. **Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 435-449, 1981.
- PERRY, R. N.; MOENS, M; JONES, J. T. (Ed.). *Plant nematology*. **Cabi**, 2011.
- RASKIN, I. *et al.* *Plants and Human Health in the Twenty-First Century*. **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531,2002.
- RAVICHANDRAN *et al.* Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. **Food and Chemical Toxicology**. 2018.
- REY, L. *Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África*. 3ªed. editora: **Guanabara Koogan S.A.**, 2001.

RIBEIRO, A.B.B.G. et al. Avaliação in silico da atividade anti-helmíntica do monoterpeneo **Ascaridol**. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e757974944-e757974944, 2020.b

ROCHA, R. A.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, G. P.; AMARANTE, A. F. T. Recuperação de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* em diferentes estratos de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.77-82,2007.

SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease:**A Review**.**The American journal of tropical medicine and hygiene**.vol,v. 97, p.1289-1303, 2017.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 442-458, 2013.

SANTOS, M. R. A. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus* Boheman **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa**, v. 48, 13p 2007.

SCALON, S.P.Q.et al. Desenvolvimento de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) sob condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 166-169, 2006.

SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L. S. Foundations of parasitology (4th edn). 8th ed. ed. **The McGraw-Hill Companies**. v. 6. p. 371.

SHALDERS E.,et al. Percentual de suplementação de fonte taninífera na ração concentrada de caprinos jovens sobre o desempenho e carga parasitária. **Cienc. Rural**. 2014;44(6):1100-05.

SHEPHERD, A.M; CLARKE, A.J. Molting and hatching stimuli. In Zuckerrman, B.M., Mai, W.F. & Rohde, R.A. Plant Parasitic Nematodes. London: **Academic Press Inc.**, p. 143-151,1971.

SIENIAWSKA, Elwira et al. Morphological changes in the overall Mycobacterium tuberculosis H37Ra cell shape and cytoplasm homogeneity due to *Mutellina purpurea* L. essential oil and its main constituents. **Medical Principles and Practice**, v. 24, n. 6, p. 527-532, 2015.

SILVA, A. B., et al. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). **Brazilian Journal of Microbiology**. 41(1):158-63, 2010.

SILVA, A. L. L. et al Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antioxidante da espécie vegetal *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 307-315, 2016.

SILVA-LUZ, C.L., PIRANI, J.R. Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020 (<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB15471>).

- SOTILLO, J. et al. Secreted proteomes of different developmental stages of the gastrointestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 10, p. 2736-2751, 2014.
- SOUZA, T. S. et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, V. 216, p. 38 - 44, 2017.
- SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2008.
- TAPOKA T. et al. Hatching of parasitic nematode eggs: a crucial step determining infection, **Trends in Parasitology**, v.38, p.174-187, 2022. ISSN 1471-4922, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.08.008>.
- VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revta. Ciênc. Tecnol. Agropec.**, v.2, p.28-31,2008.
- WEISCHER B; BROWN D. J. Uma introdução aos nematoides: nematologia geral. Um livro didático para estudantes. **Editora Pensoft**, p.187, 2000.
- WOLFFENBÜTTEL, A.N. Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica. São Paulo: Roca, 2010.
- YU, Hao et al. Antifungal activity and mechanism of D-limonene against foodborne opportunistic pathogen *Candida tropicalis*. **Lwt**, v. 159, p. 113144, 2022.
- ZARAGOZA, C. V. et al. Optimum timing for assessing phenotypic resistance against gastrointestinal nematodes in Pelibuey ewes. **Helminthologia**, v. 60, n. 4, p. 348-356, 2023.
- ZAROS, L. G. et al. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 3, p. 1155-1161, 2014.