



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DO ÁCIDO ANACÁRDICO E
GERANIOL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES
NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA**

Gracielle Araújo Frota

Sobral-CE
2022

Gracielle Araújo Frota

**ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DO ÁCIDO ANACÁRDICO E
GERANIOL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES
NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia da Universidade
Estadual Vale do Acaraú como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.**

Orientador: Prof. Dr. Jomar Patrício Monteiro.

Sobral
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

Frota, Gracielle Araújo

Atividade ovicida e larvicida do Ácido anacárdico e Geraniol em isolados de *Haemonchus contortus* com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica [recurso eletrônico] / Gracielle Araújo Frota. -- Sobral, 2022.

1 CD-ROM: il. ; 4 ³/₄ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato pdf do trabalho acadêmico com 70 folhas.

Orientação: Prof. Ph.D. Jomar Patrício Monteiro.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

1. Compostos naturais. 2. Nematóide gastrointestinal. 3. Resistência anti-helmíntica. I. Título.

Gracielle Araújo Frota

**ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DO ÁCIDO ANACÁRDICO E
GERANIOL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES
NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA**

Esta Dissertação foi julgada adequada como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú

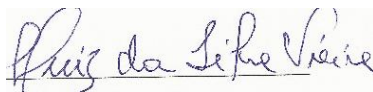
Embrapa Caprinos e Ovinos, 25 de fevereiro de 2022

Profa. Dra. Cláudia Goulart de Abreu,
Coordenadora do Curso

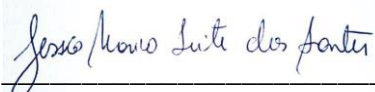
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jomar Patrício Monteiro
Orientador
Embrapa Caprinos e Ovinos



Dr. Luiz da Silva Vieira
Embrapa Caprinos e Ovinos



Profa. Dra. Jéssica Maria Leite dos Santos
Centro Universitário UNINTA

Este trabalho é dedicado ao meu pai Pedro Frota e minha mãe Maria das Graças de Araújo Frota. Os maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos de minha vida. OBRIGADA SENHOR!

Aos meus pais Maria e Pedro, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem em mim, e não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Sem vocês, nada seria possível. AMO VOCÊS!

Ao meu orientador, Professor Doutor Jomar Patrício Monteiro, por toda a paciência, empenho e dedicação com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante minha graduação. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário, sem nunca me desmotivar.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Laboratório de Parasitologia Janaelia, Fernando, Valderlândia, Igor, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Aos alunos de iniciação científica Adelino, Laísa, Breno, que foram essenciais para o desenvolvimento de nossa pesquisa.

Agradeço aos laboratoristas Helena, Felipe, Jamile, Lidiane, João Ricardo, pelo ensino, apoio e colaboração para este trabalho.

Ao Doutor Luiz Vieira pelas suas sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste projeto e por sua disponibilidade e paciência em repassar seus conhecimentos.

À professora Doutora Jessica Maria dos Santos, pelos ensinamentos quando fazia parte da iniciação científica na graduação. E agradeço por ter me incentivado a seguir no caminho da pós-graduação. Muito obrigada por tudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelos conhecimentos repassados.

À professora Cláudia Goulart e Joyce Sampaio da Coordenação da Pós-graduação em Zootecnia-UVA, pela sua disponibilidade e atenção.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP, pelo apoio financeiro nesses anos.

RESUMO

Haemonchus contortus é o nematoide mais prevalente em ovinos e caprinos em regiões tropicais. O uso de anti-helmíntico no controle desta parasitose inevitavelmente leva ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, isto ocorre em todas as classes de drogas utilizadas no controle de nematoides gastrintestinais. Com isso, novos compostos são buscados em produtos naturais para o controle das verminoses, tornando-se uma alternativa potencial, considerando a alta prevalência da resistência anti-helmíntica. Desse modo, os objetivos desse estudo foram avaliar a atividade anti-helmíntica do ácido anacárdico e geraniol sobre ovos e larvas de diferentes isolados de *H. contortus* com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica. Para ambos os compostos foram realizados teste de eclosão de ovos (TEO) e teste de desenvolvimento larvar (TDL). O composto ácido anacárdico no TEO apresentou CE₅₀ de 40,44 µM, 34,79 µM e 16,97 µM para os isolados ISE (suscetível a todos os anti-helmínticos), Echevarria (suscetível nativo) e Kokstad (resistente a todos os anti-helmínticos) respectivamente. As CE₉₅ foram de 52,02 µM, 75,23 µM e 56,45 µM para os isolados ISE, ECH e KOK. Para o geraniol foram obtidas CE₅₀ de 679,90 µM, 681,70 µM e 651,60 µM, e as CE₉₅ foram de 3.028,71 µM, 3.440,26 µM e 1.851,14 µM para os isolados ISE, ECH e KOK respectivamente. No TDL com o ácido anacárdico as CE₅₀ foram de 5,31 µM, 7,38 µM e 6,11 µM e as CE₉₅ foram de 40,85 µM, 18,34 µM e 24,01 µM para os isolados ISE, ECH e KOK. No TDL com minicoproculturas feito com geraniol, as CE₅₀ foram de 9.430 µM, 12.560 µM e 13.119 µM para os isolados ISE, ECH e KOK respectivamente e as CE₉₅ foram de 28.154 µM, 35.318 µM e 35.064 µM para os referidos isolados. Portanto, o uso de ácido anacárdico e geraniol apresentou eficácia contra ovos e larvas de *H. contortus* e estes compostos são promissores para testes *in vivo*.

Palavras chaves: Compostos naturais. *Haemonchus contortus*. Resistência anti-helmíntica.

ABSTRACT

Haemonchus contortus is the most prevalent nematode in sheep and goats in tropical regions. The use of anthelmintic to control this parasitosis inevitably leads to the development of anthelmintic resistance, which occurs in all classes of drugs used to control gastrointestinal nematodes. Thus, new compounds are sought in natural products for the control of worms, becoming a potential alternative, considering the high prevalence of anthelmintic resistance. Thus, the objectives of this study were to evaluate the anthelmintic activity of anacardic acid and geraniol on eggs and larvae of different isolates of *H. contortus* with different levels of anthelmintic resistance. For both compounds, the egg hatch test (EHA) and the larval development test (LDT) were performed. The anacardic acid compound in EHA presented EC₅₀ of 40.44 µM, 34.79 µM and 16.97 µM for the isolates ISE (susceptible to all anthelmintics), Echevarria (susceptible native) and Kokstad (resistant to all anti-helmintics) respectively. EC₉₅ were 52.02 µM, 75.23 µM and 56.45 µM for ISE, ECH and KOK isolates. For geraniol, EC₅₀ of 679.90 µM, 681.70 µM and 651.60 µM were obtained, and the EC₉₅ were 3,028.71 µM, 3,440.26 µM and 1,851.14 µM for the isolates ISE, ECH and KOK, respectively. In LDT with anacardic acid the EC₅₀ were 5.31 µM, 7.38 µM and 6.11 µM and the EC₉₅ were 40.85 µM, 18.34 µM and 24.01 µM for the isolates ISE, ECH and KOK. In the LDT with minicoprocultures made with geraniol, the EC₅₀ were 9,430 µM, 12,560 µM and 13,119 µM for the isolates ISE, ECH and KOK respectively and the EC₉₅ were 28,154 µM, 35,318 µM and 35,064 µM for those isolates. Therefore, the use of anacardic acid and geraniol showed efficacy against eggs and larvae of *H. contortus* and these compounds are promising for *in vivo* tests.

Keywords: Anthelmintic resistance. *Haemonchus contortus*. Natural compounds

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Concentrações efetivas a 50% e 95% (CE ₅₀ e CE ₉₅) e intervalo de confiança a 95% (IC) do ácido anacárdico e geraniol para inibir a eclosão de ovos em isolados de <i>Haemonchus contortus</i> sensíveis e resistente a anti-helmínticos.....	44
Tabela 02 - Concentrações efetivas a 50% e 95% (CE ₅₀ e CE ₉₅) intervalo de confiança a 95% (IC) do ácido anacárdico e geraniol para inibir o desenvolvimento larvar em isolados de <i>Haemonchus contortus</i> sensíveis e resistente a anti-helmínticos.....	46

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>H. contortus</i>	18
Figura 2 - Estrutura química do ácido anacárdico.....	25
Figura 3 - Estrutura química do geraniol.....	27

CAPÍTULO I

Figura 01 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de eclosão de ovos com diferentes concentrações de ácido anacárdico em isolados sensíveis e resistente ao <i>H. contortus</i>	43
Figura 02 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de eclosão de ovos com diferentes concentrações de geraniol em isolados sensíveis e resistente ao <i>H. contortus</i>	44
Figura 03 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de desenvolvimento larvar com diferentes concentrações de ácido anacárdico em isolados sensíveis e resistente ao <i>H. contortus</i>	45
Figura 04 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de desenvolvimento larvar em minicoproculturas com diferentes concentrações de geraniol em isolados sensíveis e resistente ao <i>H. contortus</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido Anacárdico
BZ: Benzimidazóis
Cm³: Centímetro cúbico
CBM: Concentração bactericida mínima
CIM: Concentração inibitória mínima
CEUA: Comissão de Ética para o uso de Animais
CET: Teste controlado de eficácia
CNSL: Cashew Nut Shell Liquid
CE₅₀: Concentração efetiva para inibir 50% da eclosão de larvas ou desenvolvimento larvar
CE₉₅: Concentração efetiva para inibir 95% da eclosão de larvas ou desenvolvimento larvar
CL₅₀: Concentração letal para 50% dos ovos ou larvas
CL₉₀: Concentração letal para 90% dos ovos ou larvas
CI₅₀: Concentração de inibição de 50% da eclosão de ovos ou larvas
DMSO: Dimetilsulfóxido
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GOH: Geraniol
ECH: Echevarria
IC: Intervalo de confiança
ISE: Inbred-Strain-Edinburgh
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kg: Quilograma
KOK: Kokstad
LCC: Líquido da casca da castanha de caju
L1: Larva de 1º estágio
L2: Larva de 2º estágio
L3: Larva de 3º estágio
L5: Larva de 5º estágio
ml: Mililitro
mg: Miligramas
mm: Milímetro
µM: Micromol por litro
NRC: National Research Council
OE: Óleo essencial
RA: Resistência anti-helmíntica
R²: Coeficiente de determinação
ppm: Partes por milhão
PPM: Pesquisa da Pecuária Municipal
TBZ: Tiabendazol
TDL: Teste de desenvolvimento larvar
TEO: Teste de eclosão de ovos
TRCOF: Teste de redução de contagem de ovos nas fezes
°C: Graus Celsius
%: Porcentagem
µg: Micrograma
WAAVP: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 INTRODUÇÃO.....	17
2.2 <i>Haemonchus contortus</i>	18
2.3 ANTI-HELMÍNTICOS E RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA.....	19
2.4 TESTES DE DIAGNÓSTICOS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA.....	20
2.4.1 TESTES <i>in vitro</i>	20
2.4.1.1 TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS (TEO).....	20
2.4.1.2 TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR (TDL).....	20
2.4.2 TESTES <i>in vivo</i>	21
2.4.2.1 TESTE DE REDUÇÃO DE CONTAGEM DE OVOS NAS FEZES (TRCOF).....	21
2.4.2.2 TESTE CONTROLADO DE EFICÁCIA (CET).....	21
2.5 COMPOSTOS ORGÂNICOS COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE CONTROLE.....	21
2.5.1 ÁCIDO ANACÁRDICO.....	24
2.5.2 AÇÃO DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS.....	25
2.5.2.1 ATIVIDADE MOLUSCÍCIDA.....	25
2.5.2.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	25
2.5.2.3 ATIVIDADE INSETICIDA.....	26
2.5.2.4 ATIVIDADE ANTICÂNCER.....	26
2.5.2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	26
2.6.1 GERANIOL.....	27
2.6.2 AÇÃO DO GERANIOL.....	27
2.6.2.1 ATIVIDADE INSETICIDA.....	27
2.6.2.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	28
2.6.2.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	28
2.6.2.4 ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA.....	28
2.7 REFERÊNCIAS.....	29
3. ATIVIDADE OVÍCIDA E LARVÍCIDA DO ÁCIDO ANACÁRDICO E GERANIOL EM ISOLADOS DE <i>Haemonchus contortus</i> COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA.....	36
3.1 RESUMO.....	37
3.2 ABSTRACT.....	38
3.3 INTRODUÇÃO.....	39
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	40
3.4.2 INFEÇÕES EXPERIMENTAIS COM ISOLADOS DE <i>Haemonchus contortus</i>	40
3.4.3 RECUPERAÇÃO DE OVOS.....	41
3.4.4 TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS (TEO).....	41
3.4.5 TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR (TDL).....	42
3.4.6 ANÁLISE DE DADOS.....	42
3.5 RESULTADOS.....	43
3.5.1 TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS (TEO).....	43
3.5.2 TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR (TDL).....	45
3.6 DISCUSSÃO.....	46

3.7 CONCLUSÃO.....	48
4 REFERÊNCIAS.....	49
5 ANEXO A.....	52

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados publicados da Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção de pequenos ruminantes é socioeconomicamente importante e ganhou destaque nos últimos anos, apresentando maior crescimento na região Nordeste, que possui 10,7 milhões de cabeças de caprinos, sendo equivalente a 94,5% do rebanho nacional. A produção de ovinos também se destaca na região, apresentando 13,5 milhões de cabeças, equivalente a 68,54% do rebanho nacional em 2019 (MAGALHÃES et al., 2020).

Um dos fatores limitantes na produção de pequenos ruminantes são as infecções parasitárias causadas por *Haemonchus contortus*, de alta prevalência em regiões tropicais úmidas, que diminui a sanidade dos animais podendo causar diminuição da fertilidade, anorexia, diarreia e emagrecimento e em infecções elevadas causando a morte do animal (SILVA et al., 2019). Esse tipo de infecção geralmente é controlado com o uso de anti-helmínticos sintéticos (LINS et al., 2018). No entanto, o uso indiscriminado destes fármacos causa o aumento da resistência dos nematoides às moléculas existentes no mercado. Conseqüentemente, a resistência aos medicamentos usados contra os nematoides gastrointestinais, causa sérios problemas para o rebanho, incluindo a perda de qualidade da carne e do couro, e perda de parte do rebanho devido ao óbito dos animais (OSÓRIO et al., 2020).

A resistência aos medicamentos utilizados comercialmente é um fator determinante para o sucesso do tratamento, e essas drogas demonstram serem cada vez menos eficazes. No entanto, outros métodos de controle alternativos podem ser associados com o uso de anti-helmínticos convencionais (BORTOLUZZI et al., 2020). Uma das alternativas a este problema são a utilização de plantas medicinais e seus óleos essenciais e substância isoladas, pois têm demonstrado a atividade biológica *in vitro* no controle de parasitas (SILVA et al., 2017). O componente bioativo da planta pode ser extraído através dos órgãos como flores, caules, raízes, cascas, sementes e brotos (ANDRE et al., 2018).

A busca de novos fármacos a partir de produtos oriundos de plantas apresenta grande potencial. O ácido anacárdico (AA) é um composto proveniente da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o geraniol (GOH) é constituinte majoritário de óleos essenciais de diversas espécies de plantas. Ambos possuem grande potencial como possíveis novos fármacos por apresentarem diferentes potenciais biológicos (DE ARAÚJO et al., 2020; OLIVEIRA, 2021). Desse modo, os objetivos deste trabalho foram

avaliar a eficácia ovicida e larvicida dos compostos ácido anacárdico e geraniol sobre isolados de *H. contortus* sensíveis e resistente a múltiplas drogas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-helmíntica dos compostos ácido anacárdico e geraniol em isolados de *H. contortus*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* o efeito dos compostos ácido anacárdico e geraniol sobre a eclosão de ovos em isolados de *H. contortus* suscetíveis e resistente a anti-helmínticos sintéticos;
- Avaliar *in vitro* o efeito dos compostos ácido anacárdico e geraniol sobre o desenvolvimento larvar em isolados de *H. contortus* suscetíveis e resistente a anti-helmínticos sintéticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Introdução

A caprinovinocultura brasileira se encontra em crescimento, contudo ainda enfrenta grandes problemas com as parasitoses causadas por nematoides gastrointestinais, que afetam diretamente ovinos e caprinos, acarretando redução no crescimento, comprometimento na produtividade e assim ocasionando altos custos com manejo. O helminto *H. contortus* é a espécie de nematoide encontrado com maior frequência na pecuária ovina e caprina (MENDES et al., 2020).

O tratamento mais utilizado para o controle das verminoses é o uso de anti-helmínticos sintéticos. Entretanto, atualmente está sendo difícil controlar essas infecções, devido a resistência anti-helmíntica, visto que a utilização destes fármacos seleciona parasitas resistentes, tornando o controle ineficaz. Desse modo, pode ser uma alternativa de controle, a utilização de plantas bioativas com alto teor de compostos orgânicos que apresentem ação semelhante aos anti-helmínticos convencionais. Assim, apresentando menor custo, baixo efeito colateral e lento desenvolvimento de resistência (OSÓRIO et al., 2020). Outros fatores importantes do uso de compostos naturais ao invés dos fármacos sintéticos são os resíduos químicos que esses fármacos deixam nos produtos da atividade (carne, leite, iogurte, queijo entre outros) e os compostos químicos que são eliminados na excreta dos animais, causando danos ao ambiente (PORTO et al., 2019).

Dentre as alternativas de controle, a utilização de produtos naturais obtidos de plantas, como os óleos essenciais e seus constituintes, apresenta potencial para o controle de nematoides (ANDRÉ et al., 2018), por apresentarem resultados promissores sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar contra nematoides gastrointestinais (MACEDO et al., 2015). No entanto, a atividade anti-helmíntica depende da variabilidade quantitativa e qualitativa dos compostos bioativos da planta e da heterogeneidade dos parasitos (DE FILHO ARAÚJO, 2017).

O ácido anacárdico é extraído do líquido encontrado na casca da castanha do caju e o geraniol pode ser encontrado em diversos óleos essenciais. Ambos apresentam potencial no controle dos nematoides gastrointestinais, pois em trabalhos anteriores apresentaram ações antiparasitária (KATIKI et al., 2011), anticâncer (LEGUT et al., 2014), anestésico (CAN et al., 2018), anti-inflamatória (FURTADO et al., 2019), antifúngica (COUTINHO et al., 2015; MOUTAOUAFIQ et al., 2019) e antimicrobiana (RODRIGUES et al., 2020). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo

verificar a ação anti-helmíntica *in vitro* do ácido anacárdico e geraniol em diferentes isolados de *Haemonchus contortus*.

2.2 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus é um parasito que se aloja no trato gastrointestinal do animal, mais precisamente no abomaso, alimentando-se de sangue. Os machos têm cerca de 10 a 22 mm e as fêmeas 20 a 30 mm de comprimento, os parasitos adultos são vistos a olho nu, medindo cerca de 1 a 3 cm de comprimento (AMARANTE et al., 2014). A fêmea produz cerca de 10.000 ovos por dia, multiplicando rapidamente a população no ambiente (PRICHARD, 2001).

Os parasitos estrogilídeos possuem duas fases de desenvolvimento, a fase de vida livre, onde os parasitos eliminam seus ovos nas fezes do animal e em 24 horas é formada uma larva dentro do ovo que é chamada de larva de primeiro estágio (L1), porém, isso depende das condições adequadas de oxigênio, umidade e temperatura, para o desenvolvimento das fases de segundo (L2) e terceiro (L3) estágios. A larva L3 é a forma infectante. A fase parasitária se inicia quando o hospedeiro ingere as larvas L3 presentes na pastagem. No trato digestório as larvas perdem a bainha e sofrem mais duas mudas chegando na fase larval L5 ou adulto jovem. As larvas L5 possuem uma lanceta perfurante em sua extremidade anterior, que é usada para obtenção de sangue dos vasos presentes na mucosa do abomaso. As larvas L5 fixam-se na mucosa gástrica do abomaso alterando o pH (2,0 para 7,0), produção de ácido clorídrico e pepsinogênio. Após 21 dias da infecção os helmintos adultos acasalam-se, ocorrendo a liberação de inúmeros ovos, assim iniciando-se mais um ciclo (Figura 1) (DA SILVA, 2014; DO NASCIMENTO et al., 2020).

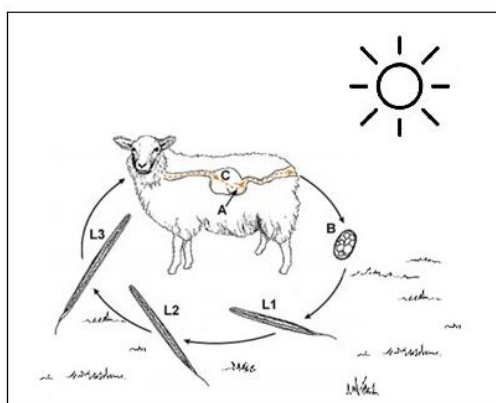


Figura 1. Ciclo biológico do *H. contortus*

Fonte: Adaptado MONTEIRO, 2007.

2.3 Anti-helmínticos e resistência anti-helmíntica

Os anti-helmínticos sintéticos são utilizados para controlar infecções causadas por nematoides gastrointestinais, tanto em ovinos como em caprinos. Os anti-helmínticos são classificados em classes: benzimidazóis e pró-benzimidazóis, lactonas macrocíclicas, salicilanilidas, imidatiázóis, organofosforado, substitutos fenólicos e os derivados da aminoacetronitrila (AKASHI et al., 2017).

No Nordeste brasileiro, estudos epidemiológicos mostraram que a infecção por endoparasitas gastrintestinais na região semiárida estava presente no rebanho durante todo ano, entretanto, a infecção se intensifica em meados do período chuvoso ao início da estação seca, indicando que apenas nessa época a pastagem estava contaminada por larvas infectantes. Com base nesses resultados, durante muitos anos recomendou-se a aplicação de quatro tratamentos anuais para todos os animais do rebanho, sendo três vermifugações no período seco e uma em meados do período chuvoso (VIEIRA, 2008). Porém, o uso desses anti-helmínticos desta forma não é mais recomendado, por acelerar o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica, uma vez que a concentração das medicações anti-helmínticas no período seco não mantém a refugia, já que 100% da população de parasitos nessa época do ano encontra-se nos animais. A resistência anti-helmíntica (RA) consiste na capacidade de uma população de parasitos sobreviver após a utilização de doses de anti-helmínticos, que deveriam ser letais para populações sensíveis (PRICHARD, 1980). A RA podem ser chamadas de lateral, quando entre produtos do mesmo grupo químico ou resistência anti-helmíntica cruzada, quando são envolvidas duas drogas de diferentes grupos (DE JESUS et al., 2017).

O processo de desenvolvimento da resistência anti-helmíntica é inevitável, porém esse processo pode ser acelerado por inúmeros fatores como vermifugação de todo rebanho, uso de subdosagens de anti-helmínticos aliado a problemas de manejo, repetição de tratamento, rápida rotatividade de princípios ativos (CAMPANARO et al., 2019), escolha errada do vermífugo, larvas em estado de hipobiose e pastagem contaminadas (VIEIRA, 2005). Outro fator agravante é não manter na pastagem população de nematoides *in refugia*, que é a população de parasitos que não é exposta aos anti-helmínticos (MOLENTO et al., 2013).

Portanto, a fim de evitar o rápido desenvolvimento da resistência a uma determinada classe de fármaco, recomenda-se que seja feita uma alternância entre elas no rebanho utilizando métodos alternativos como: método Famacha para controle seletivo, manejo do rebanho e da pastagem, escolher raças tolerantes aos parasitos, controle

biológico com o uso de fungos nematófagos, utilização de vacinas e o uso de plantas que apresentam potencial anti-helmíntico em estudos *in vitro* (MOLENTO et al., 2013; BORTOLUZZI et al., 2020).

2.4 Testes de diagnóstico de resistência anti-helmíntica

2.4.1 Testes *in vitro*

2.4.1.1 Teste de eclosão de ovos (TEO)

Existem diversos testes de diagnóstico para detectar a resistência, entre eles um muito utilizado é o teste de eclodibilidade de ovos (TEO), que consiste na incubação dos ovos dos parasitos em inúmeras concentrações do anti-helmíntico. Utilizado para a detecção de resistência aos benzimidazóis (BZs), porém modificados por inúmeros pesquisadores. O tiabendazol (TBZ) é a droga utilizada para a realização do teste por possuir uma solubilidade elevada em água. Portanto, as fezes utilizadas no exame devem ser usadas até três horas após a coleta ou armazenadas anaeróticamente (COLES et al., 2006).

No TEO, os OEs agem inibindo o desenvolvimento embrionário das larvas, ocorrendo a degradação da casca do ovo (MACEDO et al., 2011). Estudos recentes mostraram que o OE da planta *Cuminum cyminum* (cominho) na concentração de 9,4 mg/mL, inibiu 98,62% da eclosão de ovos de *H. contortus* (DE CASTRO et al., 2021). Outro fitoterápico *Anethum graveolens* (endro) que pertence à família da salsa, apresentaram ação anti-helmíntica inibindo 50% sobre a eclodibilidade dos ovos na concentração de 0,006 mg/mL (CASTRO et al., 2020).

2.4.1.2 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

Outro teste muito usado é o teste de desenvolvimento larvar (TDL), que avalia a inibição do desenvolvimento larvar na ausência (controle) ou com tratamento anti-helmíntico (BATISTA et al., 2016). O teste é considerado frágil, porque requer fezes frescas que, dependendo das condições de armazenamento, afetam o desenvolvimento dos ovos prejudicando a eficácia do teste (FORTES & MOLENTO, 2013).

No TDL, os OEs causam alterações no sistema nervoso (BAKALLI et al., 2008) ou lesões na cutícula e no trato digestivo das larvas (GIARRATANA et al., 2014). Pesquisadores avaliaram a atividade anti-helmíntica *in vitro* do OE de *Piper aduncum* sobre desenvolvimento larvar em isolado susceptível (McMaster) e resistente (Embrapa2010) de *H. contortus*. Os resultados apresentaram concentração de inibição 50% (CI₅₀) de 0,10 mg/mL para o isolado McMaster e 0,22 mg/mL para o isolado

Embrapa2010, mostrando que o OE de *P. aduncun* é eficaz contra L1 (GAÍNZA et al., 2016).

2.4.2 Testes *in vivo*

2.4.2.1 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF)

O teste de redução de ovos nas fezes (TRCOF) consiste na comparação da redução da quantidade de ovos nas fezes entre os animais de um grupo controle e os animais de um grupo tratado com anti-helmíntico. As coletas de fezes devem ser realizadas nos dias zero (antes do tratamento) e com 7, 14 e 21 dias após o tratamento dependendo do anti-helmíntico a ser testado (COLLES et al., 1992).

O teste fenotípico TRCOF é o método mais utilizado para a detecção e o monitoramento da resistência anti-helmíntica, pois trata-se de um teste simples, de execução fácil, que pode ser usado com todos os grupos de anti-helmínticos e não requer o abate dos animais. Quando ocorre uma redução parasitária maior que 95 %, indica que o anti-helmíntico utilizado foi eficaz para o controle parasitário. Portanto, deve-se ficar atento, pois essa população sobrevivente, pode tornar-se resistente com o uso constante do fármaco (FORTES & MOLENTO 2013).

2.4.2.2 Teste controlado de eficácia (CET)

Este teste é bastante confiável, porém mais caro e requer uma maior mão de obra, tornando-se menos utilizado. Grupos de animais livres de parasitas devem ser infectados com larvas de terceiro estágio (L3) e separados em grupos (tratamento e controle). Desse modo, são testadas doses de anti-helmíntico conforme o fabricante, cuja eficácia esperada deve ser \geq a 99% (BATISTA et al., 2016). Os animais são eutanasiados e após a necropsia é realizada a contagem dos parasitos no hospedeiro. Se a redução dos parasitos for $<$ 95%, confirma-se a presença de resistência anti-helmíntica (COLES et al., 2006).

2.5 Compostos orgânicos como método alternativo de controle

A utilização de compostos naturais oriundo de plantas com ação contra diferentes enfermidades é uma prática bastante antiga (FERRARI et al., 2021). O uso de compostos orgânicos no controle de nematoides gastrintestinais são estudados com o intuito de reduzir os custos dos tratamentos químicos e assim prolongar a vida útil dos produtos anti-helmínticos disponíveis no mercado (VIEIRA, 2008).

A procura por compostos de origem natural que apresentem atividade anti-helmíntica, deve-se primariamente a uma crescente redução da atividade dos anti-helmínticos comerciais devido à resistência aos grupos químicos disponíveis no mercado

(VIEIRA, 2005). O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, e o uso desses medicamentos têm diversas vantagens potenciais como: a facilidade de aquisição, o baixo custo e pouco ou nenhum efeito tóxico ambiental (SPRENGER et al., 2016).

Os princípios ativos encontrados nas plantas, podem ser divididos em grupamentos químicos presentes no extrato vegetal como: ácidos orgânicos, alcaloides, compostos fenólicos, compostos inorgânicos, cumarinas, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos, antraquinonas, mucilagens, óleos essenciais, saponinas, taninos, substâncias amargas, compostos sulfurados, ligninas, neoligninas, gomas e glucoquininas (OLIVEIRA, 2013).

As substâncias bioativas das plantas são provenientes do metabolismo secundário, não tendo relação direta no desenvolvimento da planta. São produzidos em menores quantidades e suas funções são proteger a planta contra herbívoros, ataques de patógenos e agir como atrativos (odor, cor ou sabor) para animais polinizadores. Os metabólitos secundários são compostos por dois grupos de substâncias de origem biossintética diferente, o principal grupo é composto pelos terpenos e terpenóides (BORTOLUZZI et al., 2020).

Os fatores ambientais responsáveis por controlar ou alterar a produção desses metabólitos secundários são composição do solo, clima, poluição atmosférica, idade da planta, temperaturas, nutrientes, altitude e água. Porém, as condições de coleta, horário da coleta, estabilização e estocagem da planta também podem interferir no conteúdo final dos metabólitos secundários (ANDRE et al., 2018).

Os testes *in vitro* e *in vivo* são utilizados para confirmação da atividade anti-helmíntica de produtos naturais. Os testes *in vitro* são usados como método de seleção, com o objetivo de detectar a atividade anti-helmíntica de possíveis compostos ativos presentes nos vegetais. Ao apresentarem resultados positivos nos testes *in vitro*, deve ser realizado teste de toxicidade do composto para a determinação de concentrações seguras para o animal, já que os testes *in vitro* demonstram efeito direto sobre o parasito, sendo diferente das condições *in vivo* encontrada no trato gastrintestinal do animal (DE ARAÚJO FILHO, 2017).

Estudos *in vitro* confirmam a ação dos OEs de *Mentha piperita*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus* que foram testados em amostras contendo 95% de *H. contortus*. Em todos os testes realizados no trabalho, o óleo essencial de *C. schoenanthus* foi o que apresentou melhor atividade anti-helmíntica. Na inibição da eclosão dos ovos a concentração letal (CL₅₀) foi de 0,04 mg/mL, seguido por *C. martinii*

com CL_{50} de 0,13 mg/mL. A *Mentha piperita* apresentou resultado inferior, uma CL_{50} de 0,26 mg/mL, necessitando de uma concentração maior que *C. schoenanthus* e *C. martinii* (KATIKI et al., 2011).

Extratos de plantas também apresentam atividades sobre nematoides. Extratos etanólico e aquoso de *Artemisia campestris* (erva-lombrigueira) foram testados quanto a propriedade anti-helmíntica para o tratamento de *H. contortus*, ambos extratos foram muito eficazes na inibição do desenvolvimento dos ovos do parasita *in vitro*, apresentando na concentração próxima a 2 mg/mL uma CL_{50} de 0,83 mg/mL para os extratos etanólico e 1,00 mg/mL para o extrato aquoso (AKKARI et al., 2014). Outro estudo utilizando o extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* (Erva-de-São-João), apresentou atividade em diferentes estágios do parasita *H. contortus* na concentração de 50 mg/mL, inibindo 93,22% da eclosão dos ovos e 90,33% do desenvolvimento larvar (SPRENGER et al., 2016).

Inúmeros estudos com compostos bioativos isolados de plantas também têm demonstrados atividades anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* sobre nematoides de pequenos ruminantes (BORTOLUZZI et al., 2020). Dados mostram, que o componente timol oriundo do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L (tomilho), inibiram a eclosão dos ovos em 96,4-100%, o desenvolvimento larval em 90,8-100% e a motilidade larval em 97-100%, sendo semelhante ao resultado do controle positivo (levamisol 20 mg/mL) (FERREIRA et al., 2016).

As lectinas são proteínas encontrada em diversos alimentos como por exemplo, grãos, como quinoa, vegetais e legumes, como o tomate e a berinjela. Apresentam ação biológica contra vírus, bactérias, fungos e parasitos, embora em um estudo a *Canavalia brasiliensis* (ConBr) não apresentou resultados positivos, pois na sua maior concentração de 1,2 mg/mL não inibiu a eclosão dos ovos. Porém, mostrou atividade inibitória contra L3 em diferentes concentrações, apresentando uma CE_{50} de 0,26 mg/mL (BATISTA et al., 2018).

Assim, o uso de compostos isolados de plantas, podem trazer grandes avanços no controle parasitário, pois inúmeros estudos apresentaram efeitos parasiticidas em testes *in vitro*. Desse modo, a avaliação de compostos orgânico como anti-helmíntico cresceu nos últimos anos (MOLENTO et al., 2020). Os resultados são promissores em estudos *in vitro*, podendo ser utilizados futuramente no controle de nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes em associação aos anti-helmínticos convencionais, a fim de reduzir a seleção de populações resistentes aos fármacos convencionais (ANDRÉ et al., 2018).

2.5.1 Ácido Anacárdico

O Brasil é um dos maiores produtores de caju, suas plantações são bem adaptadas a solos de baixa fertilidade, temperaturas elevadas e concentram-se principalmente na região Nordeste do Brasil. O cajueiro (*Anacardium occidentale*) é constituído por duas partes, a castanha (fruto) e o pedúnculo floral (falso fruto), possui colorações em tons amarelados a vermelhados. O caju e a castanha são muito utilizados na culinária nordestina, tanto na forma *in natura* como em outros subprodutos (NOVAES et al., 2021; SERRANO & PESSOA, 2016).

O verdadeiro fruto do cajueiro é a castanha que é formada pelo pericarpo (casca), película e amêndoa (semente). O pericarpo é subdividido por três camadas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo, no qual está presente no mesocarpo o líquido da casca da castanha do caju (LCC), conhecido internacionalmente como Cashew Nut Shell Liquid (CNSL), é um líquido escuro com característica viscosa. Este óleo é composto por: ácido anacárdico, cardanol, cardol, e 6-metilcardol. O ácido anacárdico (AA) é o constituinte majoritário do LCC natural (80 a 90%), e a parte restante é composta por outros elementos como o cardanol, cardol, outros fenóis e substância menos polares (FERRAZ et al., 2005; RODRIGUES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020).

Este óleo é classificado em dois tipos: LCC-Técnico, possui um elevado percentual de cardanol, no qual a cascas da castanha são submetidas a temperaturas superiores a 180 °C, convertendo os ácidos anacárdicos em cardol e cardanol por meio de uma descarboxilação (BASTOS et al., 2020; RAMOS, 2020) e LCC-Natural, rico em ácido anacárdico e não apresenta material polimérico em sua composição, provém de cascas que não se submeteram a altas temperaturas, conservando suas estruturas químicas (GONÇALVES, 2018).

Os ácidos anacárdicos são apolares, insolúveis em água, constituído por uma mistura de vários compostos orgânicos fortemente relacionados. Possui cadeia alquílica com radical de 2 a 17 carbonos, porém no LCC são mais frequentes cadeias longas com 15 átomos de carbonos. Em sua estrutura podem apresentar moléculas saturadas (nenhuma ligação) ou insaturadas (até três ligações) (Figura 2) (COSTA, 2019). Já em sua composição contém ácido gálico, sais minerais, substâncias nitrogenadas e sulfuradas, sacarídeos e fenóis (MENDES et al., 1990).

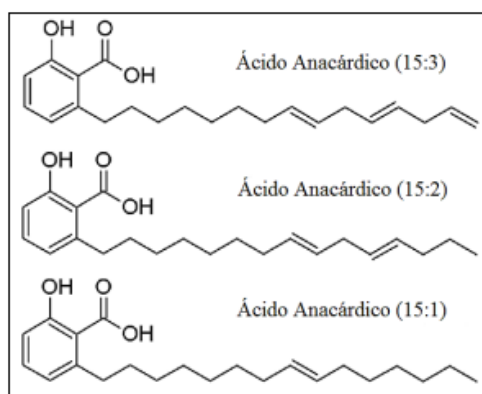


Figura 2. Estrutura química do ácido anacárdico

Fonte: Adaptado OIRAM FILHO et al., 2018.

O AA tornou-se de grande atenção em novos estudos devido a sua diversidade de efeitos biológicos como citotoxicidade (MAMIDYALA et al., 2013), antitumorais (ARAÚJO, 2017), oxidante e antimicrobiana (FREIRE et al., 2017), antibacteriana (ARAÚJO et al., 2018) e antiparasitária (DE FARIAS et al., 2021).

2.5.2 Ação dos Ácidos Anacárdicos

2.5.2.1 Atividade moluscicida

Os caramujos são moluscos gastrópodes que vivem na água doce de córregos, rios, lagos, represas ou em locais onde haja pouca correnteza. Em um estudo realizado pela primeira vez em laboratório e em campo desenvolvido por MENDES et al., (1984), o extrato de *Anacardium occidentale* apresentou atividade moluscicida para *Biomphalaria glabrata*, molusco transmissor da Fasciola hepática, trematódeo que parasita o fígado de ruminantes.

Estudos desenvolvidos em laboratório utilizando o ácido anacárdico juntamente com uma solução metanólica (hidróxido de chumbo) como alternativa de controle de infestação de caramujos adultos *Biomphalaria glabrata*, demonstraram a eficácia de 100% de ação moluscicida na concentração de 5 ppm (MENDES et al., 1990).

2.5.2.2 Atividade anti-inflamatória

Estudos experimentais mostraram que o gel à base das cascas do cajueiro possui atividade anti-inflamatória, auxiliando no processo de restauração tecidual em camundongos, pois a associação entre o gel à base das cascas do cajueiro a ultrassom terapêutico contribuiu para uma cicatrização mais efetiva das feridas cutâneas em

camundongos, assim diminuindo o número de células inflamatórias, proporcionando efeitos benéficos para a cicatrização (FURTADO et al., 2019).

2.5.2.3 Atividade inseticida

O anacardato de sódio extraído a partir do LCC mostrou ação inseticida contra o *Aedes aegypti* (mosquito transmissor da dengue) em diferentes fases de crescimento (ovos, pupas e larvas), apresentando uma CE_{50} de $162,93 \pm 29,93 \mu\text{g/mL}$ para ovos, CL_{50} de $55,47 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$ para larvas e $369,78 \pm 52,30 \mu\text{g/mL}$ para pupas. No mesmo estudo foi avaliada a toxicidade aguda do anacardato de sódio para camundongos, mostrando que este composto é seguro, pois não demonstrou efeitos adversos. Portanto, o LCC pode apresentar diversas ações sobre larvas de *A. aegypti*, como inseticida, larvicida, ovicida. (FARIAS et al., 2009).

2.5.2.4 Atividade anticâncer

O ácido anacárdico e seus derivados possui atividades biológicas para inibir o desenvolvimento e induzir morte em diferentes tipos de células tumorais como melanomas, cânceres de cólon, próstata, pulmão, cervical, rins e mama (AMORIM et al., 2020). Pesquisadores comprovaram que associação do ácido anacárdico a uma droga (mitoxantrona) e ativamente encapsulada com a vitamina C, aumentou a atividade anticâncer, pois a adição de AA aumentou a citotoxicidade em células de melanoma. Os resultados mostraram também que o AA e a vitamina C associados a mitoxantrona protegem células normais contra os danos causados pelo fármaco, fornecendo citoproteção às células (LEGUT et al., 2014).

2.5.2.5 Atividade antimicrobiana

Nanopartículas carregadas com ácido anacárdico, demonstraram um desempenho contra *Enterococcus faecalis*, apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) de $0,0366 \mu\text{g/mL}$ e concentração bactericida mínima (CBM) de $0,1465 \mu\text{g/mL}$, podendo ser uma alternativa promissora, pois resultou em valores abaixo do que a literatura tem como padrão para o tratamento (digluconato de clorexidina $\leq 0,3 \text{ mg/mL}$) (DE ARAÚJO & SOUSA, 2017).

O LCC e o ácido anacárdico, também mostraram atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, apresentando concentração inibitória mínima de $10,4 \mu\text{g/mL}$, não mostrando diferenças significativas entre eles (RODRIGUES et al., 2020).

2.6.1 Geraniol

O GOH possui uma estrutura monoterpênica alifática, apresentando a fórmula química (C₁₀H₁₈O) (Figura 3). É uma mistura dos dois isômeros *cis-trans* denominados geraniol (*trans*) e nerol (*cis*). O óleo possui cor transparente a amarelo claro, é insolúvel em água, mas solúvel por maior parte dos solventes orgânicos, tem odor e sabor característicos ligados a rosas (CHEN & VILJOEN, 2010). Muito utilizado em fragrância para cosméticos, materiais de limpeza doméstica e indústria farmacêutica (DE SÁ et al., 2021).

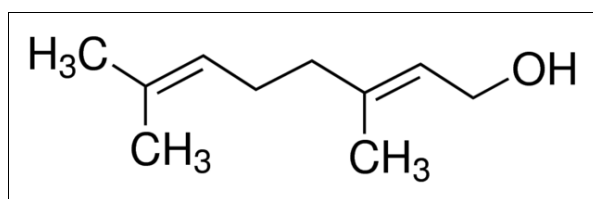


Figura 3. Estrutura química do geraniol

Fonte: Adaptado Sigma-Aldrich®.

O GOH está presente em tecidos vegetais de diversas plantas, principalmente nas flores. Foi primeiramente isolado do óleo de *Cymbopogon martini*, encontra-se também em *Pelargonium graveolens*, *Rosa damascena*, *Rosa centifolia*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon winterianus* (CHEN & VILJOEN, 2010; LIRA et al., 2020). Em diversos estudos na literatura, o geraniol possui efeitos inseticida (NICULAU et al., 2013), antioxidantes e anti-inflamatório (WANG et al., 2016), antifúngica (SINGH et al., 2016), antibacteriana (COUTUINHO et al., 2015) e anticâncer (QI et al., 2018).

2.6.2 Ação do Geraniol

2.6.2.1 Atividade inseticida

O GOH componente majoritário presentes nos óleos essenciais *Pelargonium graveolens* L'Herit (malva-cheirosa) e *Lippia alba* (erva cidreira), afetaram de forma significativa 30% da mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho do milho), em comparação ao inseticida sintético (NICULAU et al., 2013). Segundo pesquisadores o geraniol também mostrou atividade inseticida, porém como repelente espacial contra *Aedes albopictus*, pois após 48h na concentração de 0,250 µg/cm³ de GOH, aproximadamente 100% dos mosquitos perderam a capacidade de procurar por hospedeiros (HAO et al., 2014).

2.6.2.2 Atividade antibacteriana

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positivas responsáveis por diversos tipos de infecção em nosso organismo. A ação antimicrobiana do geraniol foi confirmada em um estudo, no qual potencializou a ação do antibiótico canamicina contra cepas de bactérias de linhagem MRSA *Staphylococcus aureus* 358. Portanto, o GOH usado em combinação com a canamicina, reduziu cerca de quatro vezes a concentração de inibição de 19,53 para 2,44 µg/mL comparada com quando utilizada isoladamente. Desse modo, os resultados mostram que o GOH contribui com a ação do antibiótico (COUTINHO et al., 2015).

2.6.2.3 Atividade antifúngica

Em estudos demonstraram que o GOH possui uma excelente ação antifúngica em testes *in vitro* contra isolados de *Candida albicans*, mostrando que quanto maior a dose do geraniol, menor é o tempo para sua atividade fungicida. Assim, podendo estar interferindo nas funções da membrana do fungo, dividindo a membrana e alterando a sua biocamada (LEITE et al., 2015).

As dermatoses são conhecidas como micoses superficiais, causadas pelo fungo *Trichophyton rubrum*, que possui afinidades por proteínas como pele, pelos, cabelo e unhas. Segundo pesquisadores, o GOH a 32 µg/mL inibiu em 50% o crescimento das cepas de *T. rubrum*. Demonstrando eficácias antifúngicas, agindo na parede celular e membrana celular do fungo (PEREIRA et al., 2015).

2.6.2.4 Atividade anti-helmíntica

O GOH apresentou resultados positivos, mostrando atividade parasitária em um estudo com tratamento *in vitro* contra larvas de terceiro estágio de *Contracaecum sp.* em *Hoplias malabaricus* (traíra). Após 48h, de exposição na concentração de 250 µg/ml, ocorreu a letalidade de 90% das larvas. Este gênero pertencente à família *Anisakidae*, é causador Anisakuíase que é uma doença que afeta o trato gastrointestinal do ser humano por meio da ingestão do parasito, através de peixes crus ou malcozidos, contaminados com a larva (BARROS et al., 2009).

Em um estudo objetivou-se avaliar atividade anti-helmíntica dos OEs de *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* em testes *in vitro* em amostra contendo 95% de *H. contortus* e 5% de *Trichostrongylus*, em ambos os testes o óleo essencial de *C. schoenanthus*, que possui como componente majoritário o GOH, teve a melhor atividade contra os *Trichostrongylus*, apresentando para o TEO e TDL uma CL₅₀ de 0,04 mg/mL (KATIKI et al., 2011).

2.7 REFERÊNCIAS

ANDRÉ, W. P. P. et al. Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 1522, 2018.

AKKARI, H. et al. *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 3, p. 249-255, 2014.

AKASHI, K. T.; SAKAMOTO, C. A. M.; MARTINEZ, A. C. Classificação e ação de anti-helmínticos em ruminantes: Revisão de literatura. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 4, p. 190-197, 2017.

AMARANTE, A. F. T.; RAGOZO, A.; SILVA, B. F. **Os Parasitas de Ovinos**. São Paulo: Editora UNESP, 2014, 254 p.

AMORIM, V. R. et al. Evidências científicas para o uso popular de frutos e plantas medicinais utilizadas por portadores de câncer no Piauí. 2020.

ARAÚJO, H. L. L. **Efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma, *in vitro***. 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

ARAUJO, J. T. C et al. Avaliação da atividade anticárie de nanopartículas poliméricas carregadas com ácido anacárdico. **Resumos da 70ª Reunião Anual da SBPC**, v. 70, p. 1-4, 2018.

BARROS, L. A. et al. *In vitro* larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecum sp* (Nematoda: Anisakidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 918-920, 2009.

BATISTA, E. K. F.; NEVES, C. A.; MENDONÇA, Ivete Lopes de. Resistência anti-helmíntica em ovinos e caprinos uma revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, p. 1-15, 2016.

BATISTA, K. L. R et al. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 225, p. 67-72, 2018.

BASTOS, J. S. B. et al. Prospective study incorporation of net of cashew nuts shell liquid (Cnsl-Technical) in chitosan membrane for use as biomaterial. **Revista Geintec-Gestão Inovação e Tecnologias**, v. 10, n. 2, p. 5433-5442, 2020.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BORTOLUZZI, B. B. et al. Fitoterapia no controle de parasitos gastrintestinais de ruminantes: ênfase no gênero mentha e seus componentes bioativos. **Ars Veterinaria**, v. 36, n. 4, p. 253-270, 2020.

CASTRO, L. M. et al. Antihelminthic action of the *Anethum graveolens* essential oil on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 183-188, 2020.

CAN, E. et al. Anesthetic potential of geranium (*Pelargonium graveolens*) oil for two cichlid species, *Sciaenochromis fryeri* and *Labidochromis caeruleus*. **Aquaculture**, v. 491, p. 59-64, 2018.

CAMPANARO, C.; TÚLIO, L. M. Resistência anti-helmíntica na produção de ovinos em uma propriedade na região de Guaraniaçu-PR. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 2, n. 2, p. 168-176, 2019.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol—A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.

COLES, G. C et al. Métodos da associação mundial para o avanço da parasitologia veterinária (WAAVP) para a detecção de resistência anti-helmíntica em nematoides de importância veterinária. **Parasitologia Veterinária**, v. 44, n. 1-2, pág. 35-44, 1992.

COLES, G. C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

COUTINHO, H. D. M. et al. Actividad antimicrobiana de geraniol e cariofileno contra *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015.

COSTA, R. F. **Avaliar a reprodutibilidade de método cromatográfico para o isolamento de ácido anacárdico presente no líquido da castanha de caju (LCC)**. 2019. 38 f. Monografia (Curso de Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

DA SILVA, H. Machado. Nematodioses gastrointestinais de caprinos: uma revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 13, n. 2, p. 199-208, 2014.

DE ARAÚJO, J. T. C. et al. **Desenvolvimento e caracterização de uma formulação a base de ácido anacárdico para a desinfecção do canal dentário**. Macapá: Amapá, Editora UNIFAP, 2017.

DE ARAUJO FILHO, J. V. **Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e citronelal sobre isolados de *Haemonchus contortus* sensível e resistente a anti-helmínticos sintéticos**. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017.

DE ARAÚJO, J. M. D. et al. Estudo etnofarmacológico de *Anacardium occidentale*: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e487985802-e487985802, 2020.

- DE CASTRO, L. M. et al. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Cuminum cyminum* contra *Haemonchus contortus* de ovinos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 44079-44091, 2021.
- DE FARIA, P. H. A. et al. Fitoterápicos com potencial de ação antiparasitária presentes na baixada maranhense. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 27361-27376, 2021.
- DE SÁ, R. E. et al. Geraniol, um componente dos óleos essenciais de plantas—um mapeamento científico de suas propriedades farmacológicas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e508101220805-e508101220805, 2021.
- 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.
- DO NASCIMENTO, F. C. et al. Estrongilídeos de ruminantes: Revisão. **PUBVET**, v. 15, p. 134, 2020.
- FARIAS, D. F. et al. Insecticidal action of sodium anacardate from Brazilian cashew nut shell liquid against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 3, p. 386-389, 2009.
- FERRAZ, A. C. O. et al. Tecnologia para decorticação da castanha de caju. **Embrapa Instrumentação-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2005.
- FERREIRA, L. E. et al. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 70-76, 2016.
- FERRARI, T. et al. Fitoterapia, sustentabilidade e saúde pública: efeitos da camellia sinensis na perda de peso. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 38, 2021.
- FREIRE, J. C. P. et al. Estudo etnobotânico do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.): uma Árvore nativa do Brasil. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 3, 2017
- FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391-1402, 2013.
- FURTADO, R. A. A. et al. Ação do gel *Anacardium Occidentale* L. associado ao ultrassom terapêutico no processo de cicatrização em camundongos. **Saúde (Santa Maria)**, v. 45, n. 2, p. 15, 2019.
- GAÍNZA, Y. A. et al. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 383-393, 2016.

GIARRATANA, F. et al. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 142, p. 7-10, 2014.

GONÇALVES, R. V. et al. Desenvolvimento de materiais politérmicos empregando fenóis naturais provenientes do líquido da casca da castanha de caju. 2018.

HAO, H. et al. Host-seeking and blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) exposed to vapors of geraniol, citral, citronellal, eugenol, or anisaldehyde. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 3, p. 533-539, 2014.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal. Tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. [Rio de Janeiro, 2020]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>.

KATIKI, L. M. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

LEGUT, M. et al. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines—*in vitro* studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 653, 2014.

LEITE, M. C. A. et al. Investigating the antifungal activity and mechanism (s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275-284, 2015.

LIRA, M. H. P. et al. Antimicrobial activity of geraniol: An integrative review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 3, p. 187-197, 2020.

LINS, J. G. G. et al. Eficácia de anti-helmínticos no controle de parasitas gastrintestinais de ovinos no Alto Sertão da Paraíba, Brasil. **Principia**, v. 1, n. 43, p. 128-139, 2018.

MACEDO, I. T. F. et al. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 223-227, 2011.

MACEDO, I. T. F. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 268-275, 2015.

MAMIDYALA, S. K. et al. Efficient synthesis of anacardic acid analogues and their antibacterial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 6, p. 1667-1670, 2013.

MAGALHAES, K. A. et al. Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal 2019. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 2020.

MENDES, N. M. et al. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 348-354, 1984.

MENDES, N. M. et al. Atividade moluscicida da mistura de ácidos 6-n-alkil salicílicos (ácido anacárdico) e dos seus complexos com cobre (II) e chumbo (II). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 217-224, 1990.

MENDES, J. P. et al. *Haemonchus contortus* e medidas estratégicas de controle para ovinos. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 105-110, 2020.

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. et al. Plant extracts used for the control of endo and ectoparasites of livestock: A review of the last 13 years of science. **Archives of Veterinary Science**, v. 25, n. 4, 2020.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Roca, 2007, 1052 p.

MOUTAOUAFIQ, S. et al. Antifungal activity of *Pelargonium graveolens* essential oil and its fractions against wood decay fungi. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 4, p. 1104-1114, 2019.

NICULAU, E. S. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) NE Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Química Nova**, v. 36, p. 1391-1394, 2013.

NOVAES, T. E. R.; NOVAES, A. S. R. Análise dos potenciais medicinais do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn): uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e41810111838-e41810111838, 2021.

OLIVEIRA, L. D. R. Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo*. 2013.

OLIVEIRA, J. M. Constituintes químicos e atividades biológicas de óleos essenciais das espécies *malva sylvestris* e *pelargonium graveolens*: uma revisão. **Revista Uningá Review**, v. 36, p. eurj3728-eurj3728, 2021.

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.

OIRAM FILHO, F. et al. Development and validation of a reversed phase HPLC method for determination of anacardic acids in cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell liquid. **Journal of Chromatographic Science**, v. 56, n. 4, p. 300-306, 2018.

PEREIRA, F. O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2015.

PRICHARD, R. K. et al. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 239-250, 1980.

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

PORTO, J. M. et al. Determining anthelmintic residues in goat milk in Brazil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 20, 2019.

QI, F. et al. Geraniol and geranyl acetate induce potent anticancer effects in colon cancer Colo-205 cells by inducing apoptosis, DNA damage and cell cycle arrest. **J BUON**, v. 23, n. 2, p. 346-352, 2018.

RAMOS, L. M. G. et al. Qualidade de produtos cárneos de ovinos alimentados com dietas contendo líquido da casca da castanha do caju (LCC). 2020.

RODRIGUES, R. C. E. **Avaliação da atividade antimicrobiana do líquido da castanha de *anacardium occidentale* (cajueiro): Estudo da resistência microbiana**. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.

RODRIGUES, R. C. E. et al. Estudo da resistência bacteriana frente ao líquido da castanha de caju (*Anacardium occidentale*). **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 18076-18094, 2020.

SERRANO, L. A. L.; PESSOA, P. F. A. P. Aspectos econômicos da cultura do cajueiro. **Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza-Ceará**, 2016.

SILVA, G. M. F. et al. *Haemonchus contortus* em ovinos e caprinos. **PUBVET**, v. 13, p. 130, 2019.

SILVA, M. et al. Avaliação da atividade anti-helmíntica in vitro de extratos vegetais sobre ovos de *Haemonchus contortus*. **Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 5, p. 459-472, 2016.

SPRENGER, L. K. et al. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre *Haemonchus contortus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 4, 2016.

VIEIRA, L. da S. Importância das endoparasitoses gastrintestinais nas explorações de caprinos e ovinos. In: **Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Seminário norte-riograndense de caprinocultura e ovinocultura, 1., 2005, Mossoró. Foco na nutrição e sanidade. Mossoró: UFRSA, 2005. 21 p. 1 CD-ROM., 2005.

VIEIRA, L. da S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2008.

WANG, J. et al. Protective effect of geraniol inhibits inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in traumatic injury of the spinal cord through modulation of NF- κ B and p38 MAPK. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 6, p. 3607-3613, 2016.

Capítulo 1

ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DO ÁCIDO ANACÁRDICO E GERANIOL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

3. ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DO ÁCIDO ANACÁRDICO E GERANIOL EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

Gracielle Araújo Frota¹; Valderlândia Oliveira dos Santos¹; Janaelia Ferreira Vasconcelos²; Fernando Raul Correia de Vasconcelos²; Breno Reinaldo Oliveira²; Adelino Carneiro Silva²; Laísa Bastos Albuquerque²; Jéssica Maria Leite dos Santos²; Luiz da Silva Vieira³; Jomar Patrício Monteiro^{3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia/Universidade Estadual Vale do Acaraú, Avenida da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral, CE, Brasil

² Centro Universitário INTA-UNINTA, Rua Antônio Rodrigues Magalhães, 359, Dom Expedito, Sobral, CE, Brasil

³ Embrapa–Caprino s e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04. Caixa Postal 145, CEP: 62010-970, Sobral, CE, Brasil

*Autor correspondente: jomar.monteiro@embrapa.br

3.1 RESUMO

As verminoses gastrintestinais causam sérios problemas na produção de pequenos ruminantes, principalmente em regiões de clima tropicais e subtropicais. São causadas principalmente pelo parasito *Haemonchus contortus*. Anti-helmínticos comerciais são utilizados no controle desta parasitose, ocasionando a seleção de parasitas resistentes. Com isso, há uma busca por formas alternativas para controle da hemoncose com compostos naturais que apresentem potencial anti-helmíntico. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação anti-helmíntica *in vitro* do ácido anacárdico e geraniol em diferentes isolados de *Haemonchus contortus* quanto à resistência anti-helmíntica. Para ambos os compostos foram realizados teste de eclosão de ovos (TEO) e teste de desenvolvimento larvar (TDL). O composto ácido anacárdico nos testes de eclosão de ovos apresentou CE₅₀ de 40,44 µM, 34,79 µM e 16,97 µM para os isolados ISE (suscetível a todos os anti-helmínticos), Echevarria (suscetível nativo) e Kokstad (resistente a todos os anti-helmínticos) respectivamente. As CE₉₅ foram de 52,02 µM, 75,23 µM e 56,45 µM para os respectivos isolados. Para o geraniol foram obtidas CE₅₀ 679,90 µM, 681,70 µM, 651,60 µM e as CE₉₅ foram de 3.028,71 µM, 3.440,26 µM e 1.851,14 µM para os isolados

ISE, ECH e KOK respectivamente. No teste de desenvolvimento larvar com o ácido anacárdico as CE₅₀ foram de 5,31 µM, 7,38 µM e 6,11 µM para os isolados ISE, ECH e KOK respectivamente. As CE₉₅ foram de 40,85 µM, 18,34 µM e 24,01 µM para os isolados ISE, ECH e KOK. Para o geraniol, os testes de desenvolvimento larvar foram realizados em minicoproculturas apresentando CE₅₀ de 9.430 µM, 12.560 µM e 13.119 µM para os isolados ISE, ECH e KOK respectivamente e as CE₉₅ foram de 28.154 µM, 35.318 µM e 35.064 µM para os referidos isolados. Portanto, o ácido anacárdico e o geraniol mostraram atividade sobre ovos e larvas de diferentes isolados de *H. contortus*.

Palavras chaves: Ácido anacárdico. Controle. Geraniol. *Haemonchus contortus*

3.2 ABSTRACT

Gastrointestinal worms cause serious problems in the production of small ruminants, especially in tropical and subtropical regions. They are mainly caused by the parasite *Haemonchus contortus*. Commercial anthelmintics are used to control this parasite, causing the selection of resistant parasites. Thus, there is a search for alternative ways to control hemonchosis with natural compounds that have anthelmintic potential. The objective of this work was to verify the *in vitro* anthelmintic action of anacardic acid and geraniol in different isolates of *Haemonchus contortus* in terms of anthelmintic resistance. For both compounds, the egg hatch test (EHA) and the larval development test (LDT) were performed. The anacardic acid compound in the egg hatch tests presented EC₅₀ of 40.44 µM, 34.79 µM and 16.97 µM for the isolates ISE (susceptible to all anthelmintics), Echevarria (native susceptible) and Kokstad (resistant to all anthelmintics) respectively. EC₉₅ were 52.02 µM, 75.23 µM and 56.45 µM for the respective isolates. For geraniol, EC₅₀ 679.90 µM, 681.70 µM, 651.60 µM were obtained and the EC₉₅ were 3,028.71 µM, 3,440.26 µM and 1,851.14 µM for the isolates ISE, ECH and KOK respectively. In the larval development test with anacardic acid the EC₅₀ were 5.31 µM, 7.38 µM and 6.11 µM for the isolates ISE, ECH and KOK respectively. The EC₉₅ were 40.85 µM, 18.34 µM and 24.01 µM for ISE, ECH and KOK isolates. For geraniol, the larval development tests were carried out in minicoprocultures showing EC₅₀ of 9,430 µM, 12,560 µM and 13,119 µM for the isolates ISE, ECH and KOK respectively and the EC₉₅ were 28,154 µM, 35,318 µM and 35,064 µM for the aforementioned isolates. Therefore, anacardic acid and geraniol showed activity on eggs and larvae of different isolates of *H. contortus*.

Key words: Anacardic acid. Control. Geraniol. *Haemonchus contortus*.

3.3 INTRODUÇÃO

Os parasitos gastrintestinais de pequenos ruminantes podem ser encontrados no abomaso (*Haemonchus spp*), intestino delgado (*Trichostrongylus* e *Strongyloides*), intestino grosso (*Oesophagostomum* e *Trichuris*) (COSTA & VIEIRA, 1984). *Haemonchus contortus* é o principal nematoide que acomete caprinos e ovinos apresentando maior grau de patogenicidade em relação aos demais helmintos gastrintestinais (MENDES et al., 2020), sendo mais prevalente em animais jovens e em clima temperado e tropical (SILVA et al., 2019).

Este parasito é caracterizado como hematófago, por se alimentar do sangue do hospedeiro. Porém, este hábito alimentar pode gerar nos animais perdas significativas devido a diminuição da ingestão de alimentos, influenciando no rendimento da carcaça, devido a perda de peso, podendo causar diarreia, desidratação e o aparecimento de sintomas de edema submandibular. Conseqüentemente, em casos mais severos podem levar o animal até a morte (SILVA et al., 2019).

O tratamento das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos se dá através de uso frequente de anti-helmínticos. No entanto, a utilização desses fármacos sintéticos contribui para a seleção de populações de helmintos resistentes. Desse modo, a busca por métodos alternativos de controle utilizando plantas, pode resultar em melhoria no tratamento para o controle de verminose, pois diversas plantas possuem extratos e substâncias isoladas com propriedades químicas que apresentam potencial anti-helmíntico, podendo assim garantir o sucesso no tratamento para nematoides (DA SILVA FONSECA et al., 2019). Desse modo, componentes majoritários isolados de plantas, podem ser uma alternativa de controle às parasitoses, já que na maioria das vezes o componente majoritário de óleos essenciais é que determina a propriedade da sua ação biológica (PAVELA et al., 2015).

Produtos derivados de plantas apresentaram resultados positivos em testes *in vitro* contra nematoides gastrointestinais (ANDRE et al., 2016; DE ARAÚJO FILHO et al., 2018; FERREIRA et al., 2016; KATIKI et al., 2017). A região Nordeste é uma das maiores produtoras de caju (*Anacardium occidentale* L.), a partir da casca da castanha é extraído do líquido da castanha do caju, tendo o ácido anacárdico como o seu principal constituinte (DE ARAÚJO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020). O extrato da casca de

Anacardium occidentale mostrou 100% de inibição da eclosão dos ovos e paralisia das larvas L3 de *H. contortus* (DUVULORI et al., 2020).

O geraniol é muito utilizado em diversos produtos comerciais, incluindo cosméticos e fragrâncias, e é o componente majoritário de óleos essenciais de diversas plantas aromáticas (DE SÁ et al., 2021). Os óleos essenciais de *Cymbopogon schoenanthus* e *Cymbopogon martini* possuem o geraniol como seu principal componente bioativo, apresentando atividades sobre diferentes estágios do desenvolvimento do parasito *H. contortus* (KATIKI et al., 2011). Neste contexto, os objetivos desse estudo foram avaliar as atividades anti-helmínticas do ácido anacárdico e geraniol puro em teste *in vitro* de eclodibilidade e desenvolvimento larvar em diferentes isolados de *H. contortus* com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Animais experimentais

Os animais utilizados foram 13 caprinos, sendo 7 da raça Anglo Nubiana e 6 da raça Saanen. Os animais foram confinados em baias com piso ripado suspenso e alimentados com silagem de milho, concentrado e água à vontade, de acordo com o boletim do National Research Council (NRC, 2007). Para a obtenção de animais livres de parasitas, todos foram vermifugados com três anti-helmínticos de diferentes grupos químicos com intervalos de dois dias entre eles. Foram utilizados os seguintes anti-helmínticos: Monepantel (2,5 mg/kg), Levamisol (10 mg/kg) e posteriormente Albendazol (7,6 mg/kg). Após 7 e 14 dias foram realizados o exame de contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) e coprocultura, para confirmar que os animais estavam livres de infecção por parasitos gastrointestinais. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Caprinos e Ovinos sob protocolo número 004/2018.

3.4.2 Infecções experimentais com isolados de *Haemonchus contortus*

Foram utilizados os seguintes isolados: Inbred-Strain-Edinburgh (ISE), referência de suscetibilidade a todos os anti-helmínticos sintéticos disponíveis no mercado (ROOS et al., 1990), Echevarria (ECH), suscetível nativo de uma propriedade rural do Rio Grande do Sul – Brasil, (ECHEVARRIA et al., 1991), Kokstad (KOK), originário da África do Sul, utilizado como referência de resistência a múltiplas drogas (BARRÈRE et al., 2014). Os grupos de animais foram infectados via oral com larvas L3 de seus respectivos

isolados, exceto o grupo controle (n=3 animais sem infecção). Os animais do grupo ISE (n=5) receberam inicialmente uma suspensão contendo 10.000 larvas L3, depois esses animais foram reinfetados semanalmente com mais 2.000 larvas L3. Já os animais do grupo ECH (n=2) e KOK (n=3), receberam uma dose inicial de 5.000 larvas L3 e mais 1.000 larvas L3 semanalmente, para a manutenção da infecção.

3.4.3 Recuperação de ovos

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais infectados com os isolados de *H. contortus* de interesse e os ovos foram isolados como previamente descrito (BINZIMENYERA et al., 2006), com algumas modificações. As fezes foram homogeneizadas, maceradas e lavadas em peneiras de 1 mm, 0,105 mm, 0,055 mm e 0,025 mm. A solução da última peneira, onde ficaram retidos os ovos foram centrifugados por 15 min a 2.500 x g por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso foi misturado com uma solução saturada de açúcar e centrifugada novamente por 15 min a 2.500 x g. O sobrenadante foi lavado na peneira de 0,025 mm para remoção da solução saturada de açúcar, posteriormente foi realizado a contagem dos ovos em microscópio óptico.

3.4.4 Teste de eclosão de ovos (TEO)

Os testes com o ácido anacárdico (gentilmente fornecido pelo Dr. Edy de Souza Brito, Embrapa Agroindústria Tropical, purificado por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa), foram realizados nas concentrações de 143,46, 71,73, 35,86, 17,93 e 8,96 μM . Já para o composto geraniol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), as concentrações utilizadas foram de 6.480, 4.860, 3.240, 1.620, 1.210, 810, 410 e 200 μM . Para ambos os compostos foram testados os três isolados (ISE, KOK e ECH).

Nos testes, foram utilizados 250 μl de solução de ovos (~100 ovos/poço) e mais 250 μl da solução do composto em placa de 24 poços. O teste foi realizado com cinco réplicas para cada concentração, incluindo um grupo controle positivo (tiabendazol 25 $\mu\text{g/ml}$), um controle negativo (DMSO 0,3%) para o ácido anacárdico e para o geraniol controle negativo (Tween 80 a 0,25%) e um grupo sem tratamento (água e solução de ovos). Todos os testes foram incubados a 27 °C por 48 horas seguido por adição de algumas gotas de Lugol para imobilizar as larvas e leitura em microscópio óptico invertido para identificação e contagem dos ovos e larvas L1 (COLES et al., 1992).

3.4.5 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

O teste de desenvolvimento larvar para o ácido anacárdico foi realizado como previamente descrito com algumas modificações (COLES et al., 2006). Em resumo, 340 µl de solução de ovos mais 160 µl de meio nutritivo (*Escherichia coli* liofilizada, extrato de levedura e anfotericina B) foi incubada por 24 horas a uma temperatura de 27 °C, para obtenção de larvas L1 de *H. contortus*. Em seguida, 340 µl de solução larvar contendo aproximadamente 100 larvas L1, foram incubadas com 500 µl de diferentes concentrações do ácido anacárdico de 22,95, 11,48, 5,74, 4,30, 2,87, 2,15 e 1,43 µM para os todos os isolados. Após 6 dias foram adicionadas 2 gotas de Lugol para interromper a reação e as larvas L3 foram contadas utilizando um microscópio invertido. Os controles utilizados foram: controle positivo (0,008 µg/ml de ivermectina), um controle negativo (DMSO 0,3%) e um controle sem tratamento (água e solução de ovos). Todo o teste foi realizado contendo seis réplicas de cada concentração, incluindo os controles.

Para o composto geraniol o teste de desenvolvimento larvar foi realizado em minicoprocultura como previamente descrito (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007). A solução de ovos foi incubada por 24 horas a 27 °C para obtenção de larvas L1 de *H. contortus*. Posteriormente, 500 µl da solução larvar contendo aproximadamente 250 larvas L1, 100 µl de meio nutritivo (*Escherichia coli* liofilizada, extrato de levedura e anfotericina B) e 600 µl de geraniol nas seguintes concentrações de 38.897,89, 32.414,91, 25.931,92, 19.448,94, 16.207,45, 9.724,47 e 6.482,98 µM, e incubados com 2 g de fezes livres de nematoides durante seis dias a 27 °C. Após esse período, as larvas L3 foram recuperadas, 2 ml destas soluções contendo larvas foram colocados em placas de 24 poços seguido de adição de algumas gotas de Lugol (ROBERTS E O'SULLIVAN, 1950). As larvas foram contadas através de microscopia óptica. Os testes continham os seguintes controles: branco (água destilada e meio nutritivo), sem tratamento (solução de larvas, meio nutritivo e água destilada), negativo (0,5 % Tween 80) e positivo (8 µg/ml de ivermectina). Foram feitas cinco repetições para cada tratamento e controle.

3.4.6 Análise de dados

As eficácias médias (%) de cada tratamento nos TEOs foram calculadas, através da seguinte fórmula: número de ovos/(número de ovos + número de larvas L1) x 100.

Enquanto, as eficácias para os TDLs foram calculadas pela fórmula: (\bar{X} das larvas L3 do controle negativo – larvas L3 com tratamento/ \bar{X} das larvas L3 do controle negativo)

x 100 (RUFFELL et al., 2018), utilizando o software Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) para ambos os testes.

As concentrações efetivas para inibir 50% (CE₅₀) e 95% (CE₉₅) da eclosão de ovos e do desenvolvimento larvar foram calculadas após transformação logarítmica usando análise de regressão não linear no programa GraphPad Prism (v6.05, GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Teste de eclosão de ovos (TEO)

As figuras 1 e 2 mostram os gráficos com as curvas dose-resposta para o tratamento com ácido anacárdico e geraniol no teste de inibição da eclosão de ovos nos diferentes isolados de *H. Contortus*. As concentrações efetivas do ácido anacárdico e do geraniol para inibir 50% e 95% (CE₅₀ e CE₉₅) das eclosões nos diferentes isolados de *H. contortus* estão apresentados na tabela 1. Todos os valores de R² ficaram todos acima de 0,94 demonstrando que a análise de regressão linear foi bem-sucedida (Figura 1 e 2). As curvas dose-resposta para o TEO com geraniol foram bastante similares entre os diferentes isolados enquanto no caso do ácido anacárdico o mesmo não ocorreu. De maneira geral os valores de CE₉₅ foram similares entre os isolados com exceção da CE₉₅ para o isolado KOK tratado com geraniol que apresentou cerca de metade do valor dos outros isolados.

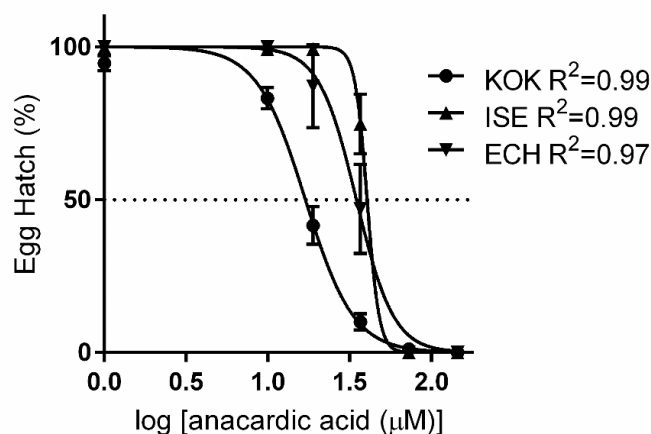


Figura 01 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de eclosão de ovos com diferentes concentrações de ácido anacárdico em isolados sensíveis e resistente ao *H. contortus*

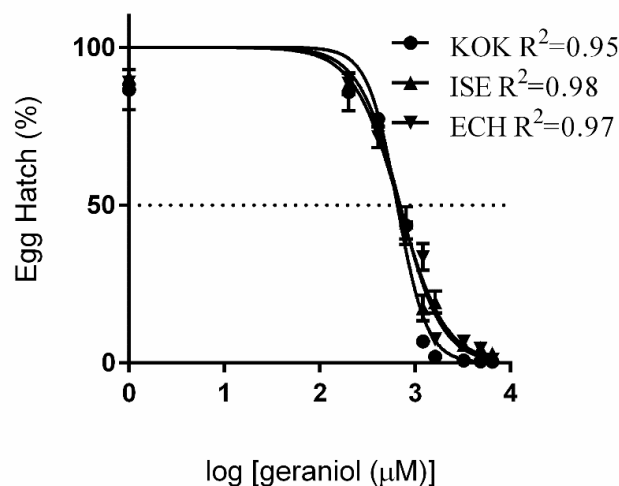


Figura 02 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de eclosão de ovos com diferentes concentrações do geraniol em isolados sensíveis e resistente ao *H. contortus*.

Tabela 01 - Concentrações efetivas a 50 e 95% (CE₅₀ e CE₉₅) e intervalo de confiança a 95% (IC) do ácido anacárdico e geraniol para inibir a eclosão de ovos em isolados de *Haemonchus contortus* sensíveis e resistente a anti-helmínticos.

Tratamentos		Isolados e suas CE ₅₀ e CE ₉₅ com intervalo de confiança (µM)		
		ECH ^a	KOK ^b	ISE ^c
Ácido anacárdico	CE ₅₀	34,79 µM (32,51 – 37,23)	16,97 µM (16,30 – 17,67)	40,44 µM (27,67 – 59,12)
	CE ₉₅	75,23 µM	56,45 µM	52,02 µM
Geraniol	CE ₅₀	681,70 µM (635,9 – 730,8)	651,60 µM (604,3 – 702,6)	697,90 µM (659,9 – 738,1)
	CE ₉₅	3.440,26 µM	1.851,14 µM	3.028,71 µM

^aECH – Isolado nativo sem histórico de resistência; ^bKOK – Isolado Kokstad; ^cISE – Isolado Inbred-Susceptible-Edinburgh.

3.5.2 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

As figuras 3 e 4 apresentam os gráficos com as curvas doses-respostas para os tratamentos com ácido anacárdico e geraniol no desenvolvimento larvar para os diferentes isolados de *H. contortus*. A tabela 02 apresenta as concentrações efetivas do ácido anacárdico e do geraniol para inibir 50% e 95% (CE_{50} e CE_{95}) do desenvolvimento larvar nos diferentes isolados de *H. contortus*. As análises de regressão linear foram bem sucedidas, pois todos os valores de R^2 ficaram acima de 0,91 (Figura 3 e 4). No caso do desenvolvimento larvar os efeitos dos compostos testados foram similares entre os três isolados.

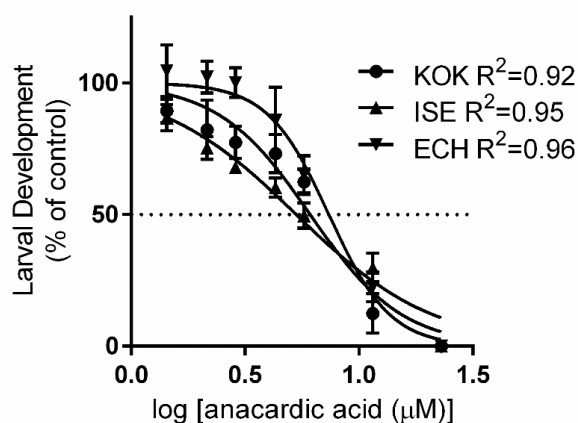


Figura 03 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de desenvolvimento larvar com diferentes concentrações do ácido anacárdico em isolados sensíveis e resistente ao *H. contortus*

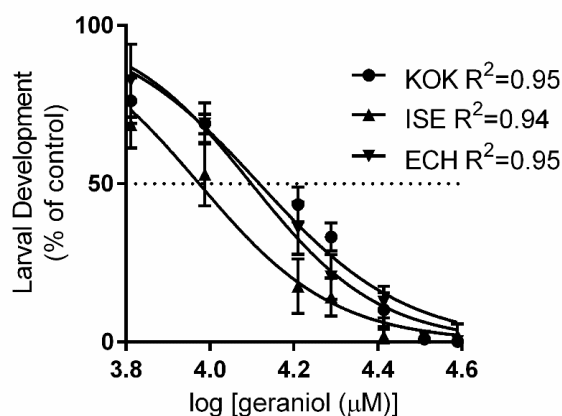


Figura 04 - Curvas de regressão não linear (doses-respostas) dos testes de desenvolvimento larvar em minicoculturas com diferentes concentrações do geraniol em isolados sensíveis e resistente ao *H. contortus*

Tabela 02 - Concentrações efetiva (CE₅₀ e CE₉₅) e intervalo de confiança a 95% (IC) do ácido anacárdico e geraniol para inibir o desenvolvimento larvar em isolados de *Haemonchus contortus* sensíveis e resistente a anti-helmínticos.

Tratamentos		Isolados e suas CE ₅₀ e CE ₉₅ com intervalo de confiança (μM)		
		ECH ^a	KOK ^b	ISE ^c
Ácido anacárdico	CE ₅₀	7,38 μM (6,858 – 7,931)	6,11 μM (5,558 – 6,710)	5,31 μM (4,929 – 5,719)
	CE ₉₅	18,34 μM	24,01 μM	40,85 μM
Geraniol	CE ₅₀	12.560 μM (11.867 – 13.293)	13.119 μM (11.210 – 14.096)	9.430 μM (8.822 – 10.081)
	CE ₉₅	35.318 μM	35.064 μM	28.154 μM

^aECH – Isolado nativo sem histórico de resistência; ^bKOK – Isolado Kokstad; ^cISE – Isolado Inbred Susceptible-Edinburgh.

3.6 DISCUSSÃO

O uso de compostos naturais derivados de plantas apresenta potencial para ser utilizado de forma alternativa para o tratamento de nematoides gastrintestinais, por apresentarem ação anti-helmíntica. No entanto, alguns fatores podem influenciar esse potencial anti-helmíntico de compostos derivados de plantas, como a espécie animal infectada, concentração/dose, a espécie do parasito e o tipo de extrato e bioensaio utilizado (DE FARIA et al., 2021).

O ácido anacárdico apresentou atividade ovicida e larvicida em todos os isolados estudados (Tabela 1 e 2) em linha com a literatura onde extratos e o próprio ácido anacárdico apresentaram atividade contra uma série de organismos. O ácido anacárdico mostrou resultados positivos em larvas de *Aedes aegypti*, apresentando uma CL₅₀ de 28,69 μM (DE ANDRADE PORTO et al., 2013). Apresentaram também atividade

moluscicida sobre *Biomphalaria glabrata*, sendo que o componente trieno mostrou uma melhor eficácia com uma concentração letal (CL₅₀) de 0,35 ppm, seguido dos componentes dieno e monoeno com uma CL₅₀ de 0,9 e 1,4 ppm, respectivamente (SULLIVAN et al., 1982). Efeitos antiparasitário do líquido da castanha do caju (LCC) foram observados contra o helminto *Schistosoma mansoni* realizados em hamster e camundongos (MENESES et al., 2018). O composto ácido 6- [8(Z)-pentadecenil] anacárdico e ácido 6-[10(Z)-heptadecenil] anacárdico isolados a partir de extratos de frutos da planta medicinal *Ozoroa insignis*, também apresentaram atividade contra *S. mansoni* adulto e esquistossomos recém-transformados, matando 100% dos organismos na concentração de 100 µM (DUBE et al., 2021). Da mesma forma, nossos resultados também apontam doses efetivas em concentrações similares.

Até o presente momento não se tem estudos do uso de ácido anacárdico isolado contra *H. contortus*. Entretanto, já foi testado o extrato da casca de *Anacardium occidentale* sobre um isolado de campo de *H. contortus*, e o estudo apresentou 100% de inibição da eclosão dos ovos na concentração de 0,5 mg/mL e dose letal (DL₅₀) de 0,0255 mg/mL e 100% de eficácia na paralisia das larvas na concentração de 6 mg/mL com DL₅₀ de 0,196 mg/mL (DAVULURI et al., 2020). Desse modo, o ácido anacárdico pode ser uma boa alternativa no controle parasitário, além de uma menor toxicidade ambiental, baixo custo e fácil acesso.

Óleos essenciais de plantas *Cymbopogon schoenanthus* e *Cymbopogon martini*, são ricos em geraniol e mostraram atividade ovicida e larvicida sobre um isolado de campo (95% *H. contortus* e 5% *Trichostrongylus* spp.). As CL₅₀ para atividade ovicida foram de 129,65 µM com o óleo de *C. schoenanthus* e 648,29 µM com o óleo de *C. martini*. Para atividade larvicida, o óleo de *C. schoenanthus* apresentou CL₅₀ de 239,87 µM e o óleo de *C. martini* CL₅₀ de 790,92 µM (KATIKI et al., 2011). Nossos resultados mostraram que o geraniol apresentou eficácia sobre ovos e larvas para isolados de *H. contortus* com diferentes níveis de resistência a diferentes classes anti-helmínticos comerciais (Tabela 1 e 2). Geraniol na concentração de 2% (v/v) reduziu a motilidade larvas L3 de *H. contortus*, *Trichostrongylus axei* e *Teladorsagia circumcincta* em 82%, 90% e 94%, respectivamente (HELAL et al., 2020). O composto geraniol também foi efetivo contra *Caenorhabditis elegans*, com dose letal 50% (DL₅₀) de 432,4 µM (KUMARAN et al., 2003). Os compostos ácido anacárdico e geraniol podem ser uma alternativa para futuros testes *in vivo* pois apresentam baixa toxicidade (ARAÚJO et al., 2020; CARVALHO et al., 2011; MAÇZKA et al., 2020). Até então, o mecanismo de ação

para o ácido anacárdico e geraniol em *H. contortus* são desconhecidos. Nossos resultados sugerem que os mecanismos de resistência que o *H. contortus* possui para os anti-helmínticos convencionais, provavelmente não tenham ação sobre os compostos estudados.

3.7 CONCLUSÃO

O ácido anacárdico e o geraniol possuem efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar em isolados de *H. contortus* com diferentes níveis de resistência a anti-helmínticos sintéticos.

4 REFERÊNCIAS

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

ARAÚJO, J. T. C. et al. Toxicological and genotoxic evaluation of anacardic acid loaded-zein nanoparticles in mice. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 1207-1215, 2020.

BARRÈRE, V. et al. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 3-4, p. 235-241, 2014.

BIZIMENYERA, E. S. et al. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 336-343, 2006.

CARVALHO, A. L. N. et al. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

COLES, G. C. et al. Métodos da associação mundial para o avanço da parasitologia Veterinária (WAAVP) para a detecção de resistência anti-helmíntica em nematoides de importância veterinária. **Parasitologia Veterinária**, v. 44, n. 1-2, pág. 35-44, 1992.

COLES, G. C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

COSTA, C. A. F.; VIEIRA, L. da S. Controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos no estado do Ceará. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 1984.

DAVULURI, T. et al. *In vitro* anthelmintic activity of three tropical plant extracts on *Haemonchus contortus*. **Acta Parasitologica**, v. 65, n. 1, p. 11-18, 2020.

DA SILVA FONSECA, R. et al. Efeitos da torta de neem no controle alternativo de nematoides gastrintestinais em ovinos: Revisão. **PUBVET**, v. 13, p. 152, 2019.

DE ANDRADE PORTO, K. R. et al. Atividade inseticida do líquido da castanha de caju sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 4, 2013.

DE ARAÚJO-FILHO, J. V. et al. Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 294-299, 2018.

DE ARAÚJO, J. M. D. et al. Estudo etnofarmacológico de *Anacardium occidentale*: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e487985802-e487985802, 2020.

DE SÁ, R. E. et al. Geraniol, um componente dos óleos essenciais de plantas—um mapeamento científico de suas propriedades farmacológicas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e508101220805-e508101220805, 2021.

DE FARIA, P. H. A. et al. Fitoterápicos com potencial de ação antiparasitária presentes na baixada maranhense. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 27361-27376, 2021.

DUBE, M. et al. Anthelmintic activity and cytotoxic effects of compounds isolated from the Fruits of *Ozoroa insignis* Del. (Anacardiaceae). **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1893, 2021.

ECHEVARRIA, F. A. M.; ARMOUR, J. L.; DUNCAN, J. L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 39, n. 3-4, p. 279-284, 1991.

FERREIRA, L. E. et al. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 70-76, 2016.

HELAL, M. A. et al. Nematocidal effects of a coriander essential oil and five pure principles on the infective larvae of major ovine gastrointestinal nematodes in vitro. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 740, 2020.

KATIKI, L. M. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

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

KUMARAN, A. M. et al. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 8, p. 957-957, 2003.

MAÇZKA, W.; WIŃSKA, K.; GRABARCZYK, M. One hundred faces of geraniol. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3303, 2020.

MENDES, J. P. et al. *Haemonchus contortus* e medidas estratégicas de controle para ovinos. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 105-110, 2020.

MENESES, A. K. S.; DOS SANTOS, M. C.; DA COSTA JÚNIOR, J. S. Efeito antiparasitário de ácido anacárdico e cardol em *Schistosoma mansoni* identificação de novos agentes anti-helmínticos. **Anais do Integra**, v. 2, 2019.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of small ruminants. 2007, 362p.

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

ROOS, M. H. et al. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 109-115, 2004.

RODRIGUES, R. C. E. et al. Estudo da resistência bacteriana frente ao líquido da castanha de caju (*Anacardium occidentale*). **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 18076-18094, 2020.

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

RUFFELL, A. et al. The use of the larval development assay for predicting the in vivo efficacy of levamisole against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 260, p. 6-11, 2018.

SILVA, G. M. F. et al. *Haemonchus contortus* em ovinos e caprinos. **PUBVET**, v. 13, p. 130, 2019.

SULLIVAN, J. T. et al. Anacardic acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. **Planta Médica**, v. 44, n. 03, p. 175-177, 1982.

ANEXO A

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Revista Brasileira de
Parasitologia Veterinária
Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

**Biological activity of cinnamaldehyde, citronellal, geraniol
and anacardic acid on *Haemonchus contortus* isolates with
differing resistance and susceptibility to anthelmintics**

Journal:	<i>Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Article
Keyword:	cinnamaldehyde, citronellal, geraniol, anacardic acid, <i>Haemonchus contortus</i> , anthelmintic resistance

SCHOLARONE™
Manuscripts

Biological activity of cinnamaldehyde, citronellal, geraniol and anacardic acid on *Haemonchus contortus* isolates with differing resistance and susceptibility to anthelmintics

Atividade biológica dos compostos cinamaldeído, citronelal, geraniol e ácido anacárdico em isolados de *Haemonchus contortus* com diferentes níveis de resistência anti-helmíntica

Bioactivity of purified organic compounds.

Gracielle Araújo Frota^{a*}; Valderlandia Oliveira dos Santos^{a*}; Janaelia Ferreira Vasconcelos^b; Breno Reinaldo Oliveira^b; Laísa Bastos Albuquerque^b; Fernando Raul Correia de Vasconcelos^b; Adelino Carneiro Silva^b; Marcel Teixeira^{a,b,c}; Edy Souza de Brito^d; Jéssica Maria Leite dos Santos^b; Luiz da Silva Vieira^c; Jomar Patricio Monteiro^{a,b,c}

^aPrograma de Pós-Graduação em Zootecnia/Universidade Estadual Vale do Acaraú, Avenida da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral, CE, Brasil; ^bCentro Universitário INTA-UNINTA, Rua Antônio Rodrigues Magalhães, 359, Dom Expedito, Sobral, CE, Brasil; ^cEmbrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04. Caixa Postal 145, CEP: 62010-970, Sobral, CE, Brasil; ^dEmbrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, CEP: 60511-110, Fortaleza, CE, Brasil.

* These authors contributed equally to this study.

ABSTRACT

Parasitism by gastrointestinal nematodes is a challenge for small ruminant farming worldwide. It causes productive and economic losses, especially due to parasite resistance to conventional anthelmintics. Natural compounds with antiparasitic activity are a potential alternative for controlling these parasites especially when considering the widespread occurrence of anthelmintic resistance. Our objective was to evaluate the activity of anacardic acid, geraniol, cinnamaldehyde and citronellal on *Haemonchus contortus* isolates with different levels of anthelmintic resistance. These compounds were tested using egg hatch assays (EHAs), larval development tests (LDTs) as well as LDTs

on mini-fecal cultures, on the *Haemonchus contortus* isolates Kokstad (KOK-resistant to all anthelmintics), Inbred-Strain-Edinburgh (ISE-susceptible to all anthelmintics) and Echevarria (ECH-susceptible to all anthelmintics). Effective concentrations to inhibit 50% (EC₅₀) and 95% (EC₉₅) of egg hatching and larval development were calculated. Results for EHA and LDT for all tested compounds, considering EC₅₀ and EC₉₅ values, showed low variation among the studied isolates with most RF values below 2x. All studied compounds showed efficacy against egg hatching and larval development of *H. contortus* isolates regardless of anthelmintic resistance profiles. The compounds with the smallest EC₅₀ and EC₉₅ values were cinnamaldehyde and anacardic acid making them promising candidates for future *in vivo* studies.

Keywords: cinnamaldehyde, citronellal, geraniol, anacardic acid, *Haemonchus contortus*, anthelmintic resistance.

RESUMO

A infecção por nematoides gastrintestinais é um dos principais desafios na produção de pequenos ruminantes e ocasiona perdas produtivas principalmente devido à resistência anti-helmíntica. Bioativos com atividade anti-helmíntica são potencial alternativa para o controle desses parasitos em especial considerando a alta incidência de resistência anti-helmíntica nos rebanhos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade biológica do cinamaldeído e citronelal em isolados de *Haemonchus contortus* com diferentes perfis de resistência anti-helmíntica. Foram realizados testes de eclosão de ovos (TEO), testes de desenvolvimento larvar (TDL) e TDLs em minicoproculturas utilizando o isolado Kokstad (resistente a todos os anti-helmínticos), o isolado Inbred-Strain-Edinburgh (suscetível) e o isolado Echevarria (suscetível). Foram calculadas as concentrações efetivas para inibir 50% (CE₅₀) e 95% (CE₉₅) da eclodibilidade dos ovos e do desenvolvimento larvar. Resultados de TEO e TDL apresentaram baixa variação entre os diferentes isolados para um mesmo composto testado com fatores de resistência geralmente abaixo de 2x. Todos os compostos estudados mostraram eficácia contra a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de isolados de *H. contortus* independente do perfil de resistência anti-helmíntica dos mesmos. Os compostos que apresentaram atividade nas menores concentrações foram cinamaldeído e ácido anacárdico sendo estes os componentes mais promissores para futuros estudos *in vivo*.

Palavras-chave: cinamaldeído, citronelal, geraniol, ácido anacárdico, *Haemonchus contortus*, resistência anti-helmíntica.

INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes are the main cause of productive and economic losses in small ruminant production systems. *Haemonchus contortus* is considered to be the most pathogenic parasite and can cause fatal anemia in animals with a high parasite load (Zajac & Garza, 2020; Salgado & Santos, 2016).

The main way of controlling these nematodes is through antiparasitic drugs. However, use of these substances has become compromised since many populations of parasites have already developed anthelmintic resistance (Gaudin et al., 2016). Considering this scenario, the prospection of new compounds with anthelmintic activity may be a viable alternative to the commercial compounds with decreased efficacy (Molento et al., 2020). In addition, the demand for animal products from sustainable organic systems has increased (Zajac & Garza, 2020), thus making it necessary to search for new control alternatives (Barone et al., 2018).

Essential oils from aromatic plants have been studied for their therapeutic and nematocidal effects. Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) belongs to the Lauraceae family, from South and Southeast Asia, and is traditionally used in cooking and as a medicinal plant (Bakar et al., 2020). Its major component, cinnamaldehyde, has been shown to be effective against some species of fungi (Doyle & Stephens, 2019) and has antimicrobial activity on bacteria of the quinolone-resistant *Enterobacteriaceae* family (Dhara & Tripathi, 2019), on eggs of *H. contortus* (Katiki et al., 2017) and on nematodes such as *Caenorhabditis elegans* (Lu et al., 2020).

Citronellal is the major component of the essential oil of *Eucalyptus citriodora*. It has proven effectiveness as an antimicrobial (Bezerra et al., 2019), repellent action against *Anopheles gambiae* s.s. (Wu et al., 2020), action against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms (Borges et al., 2017) and action against nematode eggs and larvae (Araújo Filho et al., 2018).

Geraniol is present in several plants such as *Cymbopogon martini*, *Pelargonium graveolens*, *Rosa damascena*, *Rosa centifolia*, *Cymbopogon nardus* and *Cymbopogon winterianus* (Chen & Viljoen, 2010; Lira et al., 2020). It has been shown to have

insecticidal, antioxidant, anti-inflammatory, antifungal, antibacterial and antitumour activities (Singh et al., 2016; Wang et al., 2016; Tabari et al., 2017; Qi et al., 2018; Lin et al., 2021).

Cashew production is significant in Brazil and anacardic acid is the major component of the cashew nutshell liquid. It has been the focus of several studies in the past decades with biological properties such as antitumor, antibacterial, molluscidal and anthelmintic (Sullivan et al., 1982; Muroi & Kubo, 1996; Hemshekhar et al., 2012; Tan et al., 2017; Dube et al., 2021).

The aim of this study was to evaluate the biological activity of cinnamaldehyde, citronellal, geraniol and anacardic acid against *H. contortus* isolates with differing resistance and susceptibility to anthelmintics.

MATERIAL AND METHODS

***Haemonchus contortus* isolates**

Haemonchus contortus isolates with differing resistance and susceptibility to anthelmintics were used in this study. The Inbred-Strain-Edinburgh isolate (ISE) was used as a susceptibility reference in relation to all commercial anthelmintics (Roos et al., 2004); the Kokstad isolate (KOK) was used as a multidrug resistance reference (Barrère et al., 2014); and the native isolate Echevarria (ECH), with no history of resistance, from a farm in Rio Grande do Sul, Brazil (Echevarria et al., 1991), was compared against the other two isolates.

Twelve adult sheep were used after deworming (ivermectin, 200 µg/kg; oxfendazole, 5 mg/kg; monepantel, 2.5 mg/kg; and levamisole, 7.5 mg/kg), which was confirmed through fecal egg counts (sensitivity of 25 eggs per gram) and fecal cultures showing no eggs or larvae. The animals were divided into four groups (n = 3) and each group was infected with a single *H. contortus* isolate, while the fourth group was kept as an infection-free control. Each animal received 5,000 third stage (L3) infective larvae orally. The experimental infections were monitored through fecal egg counts every week and fecal cultures every two weeks. The animals from each group were confined in isolated pens with slatted floors and given corn and sorghum silage and ration following NRC's requirements (NRC, 2007) as well as water *ad libitum*. All the experimental procedures on these animals were approved by the Ethics Committee for Animal Use of Embrapa Caprinos e Ovinos, under protocol 04/2018.

Egg hatch assay (EHA)

Egg recoveries and EHAs were performed as per the recommendations from the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Coles et al., 1992). For EHAs, 250 μl of egg suspension (~ 100 eggs/ $100 \mu\text{l}$) was used, and 250 μl of treatment solution (cinnamaldehyde or citronellal at the desired concentration) was added, to make up a final volume of 500 μl /well. The plates were incubated at 27 ± 1 °C for 48 h and at least 100 eggs and L1 larvae were counted in each well using an inverted microscope.

Cinnamaldehyde (final concentrations: 378.33, 189.16, 94.58, 47.29, 23.65 and 11.82 μM), citronellal (final concentrations: 25,931.93, 6,482.98, 1,620.75, 405.19, 101.30, 25.32, 6.33 and 1.58 μM) and geraniol (final concentrations: 6,480, 4,860, 3,240, 1,620, 1,210, 810, 410 and 200 μM) were diluted in 0.25% Tween 80. Anacardic acid (final concentrations: 143.46, 71.73, 35.86, 17.93 and 8.96 μM) was diluted in 0.3% DMSO. Cinnamaldehyde and citronellal tests were done with six replicates for each concentration. Anacardic acid and geraniol tests were done with five replicates. The negative controls consisted of 0.25% Tween 80 for all compounds except anacardic acid which was 0.3% DMSO and the positive controls contained thiabendazole (TBZ) (0.025 mg/mL, diluted in 0.3% DMSO). Pure cinnamaldehyde, citronellal and geraniol used in all tests were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anacardic acid used in all tests was supplied by Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE, Brazil).

Larval development tests (LDTs)

All the LDTs were performed in mini-fecal cultures as previously described (Camurça-Vasconcelos et al., 2007), with minor modifications except for anacardic acid which was evaluated by the regular LDT (Coles et al., 2006). For the LDT in mini-fecal cultures, the eggs recovered were incubated for 24 hours at 27 ± 1 °C to obtain L1 larvae. Afterwards, 500 μL of the L1 larvae solution (~ 250 L1 larvae), plus 100 μL of nutrient medium (lyophilized *Escherichia coli*, yeast extract and amphotericin B 0.49 $\mu\text{g/mL}$) and 600 μL of the treatment (cinnamaldehyde, citronellal or geraniol) were added to two grams of feces (from parasite-free animals). This mixture was homogenized and incubated for another 6 days at 27 ± 1 °C and ideal humidity ($> 80\%$). L3 larvae recoveries were done as previously described (Roberts & O'Sullivan, 1950). The L3 larvae thus recovered were transferred to 24-well plates and counted using an inverted microscope.

Cinnamaldehyde (final concentrations: 22,699.75, 15,133.17, 11,349.87, 7,566.68, 5,674.93, 3,783.29 and 1,891.64 μM) was diluted in 0.4% Tween 80, citronellal (final concentrations: 64,829.82, 32,414.91, 16,207.45, 8,103.72, 4,051.86, 2,025.93, 1,012.96 and 506.48 μM) was diluted in 1.1% Tween 80 and geraniol (final concentrations: 38,897.89, 32,414.91, 25,931.92, 19,448.94, 16,207.45, 9,724.47 and 6,482.98 μM) was diluted in 0.5% Tween 80. Anacardic acid (final concentrations: 22.95, 11.48, 5.74, 4.30, 2.87, 2.15 and 1.43 μM) was diluted in 0.3% DMSO. All the tests were performed with five replicates for each concentration. The test with anacardic acid had six replicates for each treatment. The controls comprised a test with water and nutrient medium only; an untreated control (larvae, nutrient medium and water); a negative control (larvae, nutrient medium and Tween 80 or DMSO at above mentioned concentrations); and a positive control using ivermectin at 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Data analysis:

Treatment efficacies per well in EHAs were calculated using the following formula:

$$(\text{egg counts}/\text{egg counts} + L1 \text{ larvae counts}) \times 100$$

Treatment efficacies in LDTs were calculated using the following formula (Araújo-Filho et al., 2019):

$$(\bar{x}_{\text{negative ctrl. L3 larvae}} - L3 \text{ larvae in treatment}) / \bar{x}_{\text{negative ctrl. L3 larvae}} \times 100$$

The effective concentrations for inhibiting 50% (EC_{50}) and 95% (EC_{95}) of egg hatching and larval development were calculated using nonlinear regression analysis (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Resistance factors for EC_{50} and EC_{95} represent the ratios between KOK or ECH isolates in relation to the ISE isolate ($\text{RF}_{50} = \text{EC}_{50}$ for isolates X/ EC_{50} for the ISE isolate; $\text{RF}_{95} = \text{EC}_{95}$ for isolates X/ EC_{95} for the ISE isolate).

RESULTS

The results from EHAs and LDTs for all tested compounds on the *H. contortus* isolates KOK, ISE and ECH are shown in Figures 1 and 2. All non-linear regression analysis resulted in coefficients of determination (R^2) above 0.90 showing a good fit of

the data against the calculated regression curves (Figures 1 and 2). Both EC₅₀ and EC₉₅ for EHAs and LDTs were very similar between isolates for any given studied compound and were never over or below 3 times the values for the ISE isolate. Anacardic acid was the compound that inhibited egg hatching and larval development at the lowest concentrations. Larval development was the least affected by the tested compounds requiring concentrations in the millimolar range except for anacardic acid. Geraniol and citronellal were the compounds requiring higher concentrations to inhibit larval development and egg hatching (Tables 1 and 2).

DISCUSSION

The lethal dose of cinnamaldehyde for the free-living nematode *C. elegans* was determined as 6,058.27 μ M for 4 hours, which induced multiple gene expression changes that were mainly involved in glutathione metabolism (Lu et al., 2020). *Ascaris suum* exposed to *Cinnamomum verum* extract (7.8% cinnamaldehyde) showed damage to the muscle layer and digestive tract, without many alterations to the parasite cuticle (Williams et al., 2015). This suggests that the mechanism of action is through changes to internal structures after ingestion. In addition to the effects on small-ruminant and pig nematodes, cinnamaldehyde was also effective on the soybean nematode *Meloidogyne incognita* (Jardim et al., 2018). The essential oil of *Cinnamomum cassia* (83% cinnamaldehyde) caused 100% mortality and immobility of the larvae at a concentration of 389.37 μ M. During evaluations on supplying cinnamaldehyde in the diet of dairy cows, this compound proved to be safe at concentrations of 0.2 to 4 mg/kg of body weight. It did not cause changes to feed consumption, ruminal fermentation, ruminal pH, milk composition or milk production and did not affect the digestion of nutrients in the diet (Chapman et al., 2019). This suggests that this compound is also safe for carrying out *in vivo* tests with small ruminants. The effect of cinnamaldehyde on egg hatching was previously studied in a multidrug-resistant *H. contortus* isolate (resistant to ivermectin, moxidectin, closantel, albendazole, levamisole phosphate and trichlorfon) resulting in an EC₅₀ of 136.19 μ M (Katiki et al., 2017). We observed similar EC₅₀ and EC₉₅ values for the isolates studied here (Figure 1; Table 1). In the same manner, the LDT results were also equivalent for all the isolates studied (Figure 2; Table 2) but required concentrations to impair larval development were in general 50 times higher than the values obtained in the EHA. These results are more in line with the values obtained against adult *C. elegans*

as above mentioned. Since the results were similar for nematodes with different profiles of anthelmintic resistance, it may be that the commercial anthelmintic resistance mechanisms do not affect the action of cinnamaldehyde on *H. contortus* isolates. As cinnamaldehyde has shown effects on different species of nematodes inhabiting different environments and has the potential to be safe for small ruminants, it remains as an interesting candidate for further studies.

The effects of citronellal on egg hatching and larval development were also equivalent for the isolates studied (Figure 1; Tables 1 and 2). The essential oil of *Eucalyptus citriodora*, containing 71.77% beta-citronellal was also effective against *H. contortus* egg hatching and larval development with EC₅₀ values of 5.3 and 12.61 mM of citronellal content for EHA and LDT respectively (Macedo et al., 2011). In the same manner, citronellal was previously shown to have ovicidal activity with EC₅₀ values of 1.95 mM for the ISE isolate and 2.59 for the KOK isolate. It also impaired larval development with EC₅₀ values of 14.91 mM and 15.56 mM for the same *H. contortus* isolates respectively (Araújo-Filho et al., 2018). Our results (Figures and Tables 1 and 2) are in general agreement with this data as we also found lower EC₅₀ values for egg hatch inhibition and higher values for larval development impairment. We also found similar values across isolates with different anthelmintic resistance profiles. Fecal egg count reduction tests using *E. citriodora* essential oil (67.5% citronellal) and nanoencapsulation reduced the egg counts by 40.5% and 55.9% for the free oil and nanoencapsulated oil respectively (Ribeiro et al., 2014). Another study showed fecal egg count reduction results of 69.5% for *E. citriodora* essential oil and no significant reduction with citronellal alone (Araújo-Filho et al., 2019). It appears that, despite having similar *in vitro* anthelmintic activity against *H. contortus* isolates with differing resistance profiles, citronellal alone did not show any efficacy *in vivo* against one field population. Thus, further *in vivo* studies should be carried out to check if this is the case for other field populations and *H. contortus* isolates as well.

Essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* and *Cymbopogon martinii*, with 62.5% and 81.4% geraniol respectively, showed *in vitro* anthelmintic activity against a field population of gastrointestinal nematodes (95% *H. contortus* and 5% *Trichostrongylus* spp.). Egg hatching was inhibited at EC₅₀ concentrations of 162.08 µM and 686.29 µM of geraniol for *C. schoenanthus* and *C. martinii* essential oils respectively. Larval development was impaired at EC₅₀ concentrations of 243.11 µM and 791.57 µM of geraniol for *C. schoenanthus* and *C. martinii* essential oils respectively (Katiki et al.,

2011). We obtained similar EHA results to the *C. martinii* essential oil which contains more geraniol than *C. schoenanthus* essential oil. On the other hand, our LDA EC₅₀ resulted in higher amounts of geraniol than any of the *Cymbopogon* essential oils. Most probably, other components in these oils also possess anthelmintic activity especially in the case of larval development. Similar LC₅₀ values for geraniol were obtained against *C. elegans* (432.42 µM) (Kumaran et al., 2003). Motility impairment by geraniol was also observed against *H. contortus*, *Trichostrongylus axei* and *Teladorsagia circumcincta* at 2% (v/v) with decreased effects against *Trichostrongylus colubriformis* and *Cooperia oncophora* (Helal et al., 2020). Resistance factors were very close to 1 in all cases, considering the different isolates studied here, suggesting that the commercial anthelmintic resistance mechanisms did not act on geraniol (Tables 1 and 2). Among the compounds tested in this study, geraniol required higher concentrations to attain an observable effect in EHAs and LDTs and, as far as we know, this is the first report of geraniol effects against multiple *H. contortus* isolates. Finally, *C. schoenanthus* essential oil had no significant *in vivo* effect in fecal egg counts from lambs when compared to controls (Katiki et al., 2012) and it remains to be tested whether geraniol alone will behave in the same manner.

Anacardic acid is extracted from the cashew nutshell liquid. There are few studies of its action against *H. contortus* using the extract from the nutshell and dry cashew apple fiber as a feed alternative for sheep. Cashew apple fiber containing 3.5% anacardic acid, among other compounds, was given as an alternative feed for 28 days to sheep that were experimentally infected with a multi-resistant *H. contortus* isolate. Egg counts throughout a period of 63 days showed a mean reduction of 60% in the group that was fed cashew apple fiber and anacardic acid was among the compounds postulated to have anthelmintic activity (Lopes et al., 2018). Hydroalcoholic extracts from the cashew nutshell were also tested for activity against egg hatching, larval motility, and adult motility in a natural population of gastrointestinal nematodes (99% *Haemonchus contortus*) with LD₅₀ doses at 0.0258, 0.196 and 1.0365 mg/ml respectively (Davuluri et al., 2020). It is difficult to compare studies with purified compounds with studies that used extracts due to the presence of multiple substances in the extracts. Our results with anacardic acid match the results using cashew extracts but larval development was more sensitive than egg hatching with lower EC₅₀ and EC₉₅ doses. Discrepancies could be due to the effect of other compounds in the extracts. The above-mentioned studies also suggest that anacardic acid could have *in vivo* activity. Of all tested compounds, anacardic acid was the one with

lower EC₅₀ and EC₉₅ values in our *in vitro* tests and RF values of the studied isolates were usually below 2x in comparison with the ISE isolate. This suggests that, like the other compounds studied here, anacardic acid is not affected by commercial anthelmintic resistance mechanisms. This added to the fact that Brazil is a cashew apple and cashew nut producer producer with over 45,000 metric tons of fruit and 51,000 metric tons of nuts produced in 2017 (IBGE, 2017) places anacardic acid as a promising candidate for future *in vivo* tests.

CONCLUSION

In conclusion we demonstrated the *in vitro* anthelmintic activities of several pure compounds against eggs and larvae of *H. contortus* isolates with differing anthelmintic resistance profiles. Anacardic acid and cinnamaldehyde appear to be promising candidates for future *in vivo* tests. In addition, resistance to commercial anthelmintics do not appear to affect the action of the tested compounds.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there were no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Funcap (BP3-0139-00359.01.00/18 and BMD-0008-01351.01.06/20) for financial support and Embrapa (project number 22.16.04.038.00.03.001) for support and infrastructure.

REFERENCES

- Araújo-Filho JV, Ribeiro WLC, André WPP, Cavalcante GS, Guerra MCM, Muniz CR, et al. Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. *Ind Crops Prod* 2018; 124: 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.059>
- Araújo-Filho JV, Ribeiro WLC, André WPP, Cavalcante GS, Rios TT, Schwinden GM, Rocha LO, Macedo ITF, Morais SM, Bevilaqua CML, Oliveira LMB. Anthelmintic activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on

- sheep gastrointestinal nematodes. *Braz J Vet Parasitol* 2019; 28: 644-651. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019090>
- Barrère V, Beech RN, Charvet CL, Prichard RK. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 2014; 44(3-4): 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.12.004>
- Bakar A, Yao PC, Ningrum V, Liu CT & Lee SC. Beneficial biological activities of *Cinnamomum osmophloeum* and its potential use in the alleviation of oral mucositis: A systematic review. *Biomedicines* 2020; 8(1): 3. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8010003>
- Barone CD, Zajac AM, Manzi-Smith LA, Howell AB, Reed JD, Krueger CG, et al. Anthelmintic efficacy of cranberry vine extracts on ovine *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2018; 253: 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.016>
- Bezerra RV, Oliveira HMBF, Lima CMBL, Diniz MDFFM, PÊSSOA HDLF, Oliveira FAA. Atividade antimicrobiana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal,(S)-(-)-citronelal e 7-hidroxicitronelal contra cepa de *Bacillus Subtilis*. *Revista Uningá* 2019; 56(2): 62-69. <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/2132>
- Borges A, Lopez-Romero JC, Oliveira D, Giaouris E, Simões, M. Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils. *J Appl Microbiol* 2017; 123(1): 104-115. <https://doi.org/10.1111/jam.13490>
- Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilaqua CML, Morais SM, Maciel MV, COSTA CTC, Macedo ITF, et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet Parasitol* 2007; 148(3-4): 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.012>
- Chapman CE; Ort SB; Aragona KM, Cabral RG, Erickson PS. Effect of cinnamaldehyde on feed intake, rumen fermentation, and nutrient digestibility, in lactating dairy cows. *J Anim Sci* 2019; 97(4): 1819-1827. <https://doi.org/10.1093/jas/skz050>
- Chen W, Viljoen, AM. Geraniol-A review of a commercially important fragrance material. *S Afr J Bot* 2010; 76(4): 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992; 44(1-2): 35-44. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruysse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of

- veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006; 136(3-4): 167-185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019>
- Davuluri T, Chennuru S, Pathipati M, Krovvidi S, Rao GS. In vitro anthelmintic activity of three tropical plant extracts on *Haemonchus contortus*. *Acta Parasitol* 2020; 65(1): 11-18. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00116-x>
- Dhara L, Tripathi A. Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39(1): 65-73. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03692-y>
- Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia* 2019; 139: 104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Dube M, Saoud M, Rennert R, Fotso GW, Andrae-Marobela K, Imming P, Häberli C, Keiser J, Arnold N. Anthelmintic Activity and Cytotoxic Effects of Compounds Isolated from the Fruits of *Ozoroa insignis* Del. (Anacardiaceae). *Biomolecules* 2021; 11(12): 1893. <https://doi.org/10.3390/biom11121893>
- Echevarria FAM, Aamour J, Duncan JL. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectinresistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 1991; 39(3-4): 279-284. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90044-V](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90044-V)
- Gaudin E, Simon M, Quijada J, Schelcher F, Sutra JF, Lespine A, et al. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Vet Parasitol* 2016; 227: 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.002>
- Helal MA, Abdel-Gawad AM, Kandil OM, Khalifa MM, Cave GW, Morrison AA, et al. Nematocidal Effects of a Coriander Essential Oil and Five Pure Principles on the Infective Larvae of Major Ovine Gastrointestinal Nematodes *In Vitro*. *Pathogens* 2020; 9(9): 740. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090740>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Brasil: Caju-Fruto/Censo Agro. 2017 [cited 2022 May 11]. Available from: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/>
- Jardim IN, Oliveira DF, Silva GH, Campos VP, Souza PE. (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. *J Pest Sci* 2018; 91(1): 479-487.
- Katiki LM, Chagas ACS, Bizzo HR, Ferreira JFS, Amarante AFT. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils

- evaluated in four different *in vitro* tests. *Vet Parasitol* 2011; 183: 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.001>
- Katiki LM, Chagas ACS, Takahira RK, Juliani HR, Ferreira JFS, Amarante, AFT. Evaluation of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2012; 186: 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.003>
- Katiki LM, Barbieri AME, Araujo RC, Veríssimo CJ, Louvandini H, Ferreira JFS. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus in vitro*. *Vet Parasitol* 2017; 243: 47-51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.008>
- Kumaran AM, D'Souza P, Agarwal A, Bokkolla RM, Balasubramaniam M. Geraniol, the Putative Anthelmintic Principle of *Cymbopogon martinii*. *Phytoter Res* 2003; 17: 957. <https://doi.org/10.1002/ptr.1267>
- Lin L, Long N, Qiu M, Liu Y, Sun F, Dai M. The Inhibitory Efficiencies of Geraniol as an Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial, Natural Agent Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in vivo. *Infect Drug Resist* 2021; 14: 2991-3000. <https://doi.org/10.2147/idr.s318989>
- Lira MHP, Andrade Júnior FP, Moraes GFQ, Macena GS, Pereira FO, Lima IO. Antimicrobial activity of geraniol: An integrative review. *J Essent Oil Res* 2020; 32(3): 187-197. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1745697>
- Lopes LG, Silva MH, Figueiredo A, Canuto KM, Brito ES, Ribeiro PRV, Souza ASQ, Barioni-Júnior W, Esteves SN, Chagas ACS. The intake of dry cashew apple fiber reduced fecal egg counts in *Haemonchus contortus*-infected sheep. *Exp Parasitol* 2018; 195:38-43. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.004>
- Lu L, Shu C, Chen L, Yang Y, Ma S, Zhu K, et al. Insecticidal activity and mechanism of cinnamaldehyde in *C. elegans*. *Fitoterapia* 2020; 146: 104687. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104687>
- Macedo ITF, Bevilaqua CML, Oliveira LMB, Camurça-Vasconcelos ALF, Vieira LS, Amóra SSA. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(3): 223-227. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300009>
- Hemshkhar M, Santhosh MS, Kemparaju K, Girish KS. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 110(2): 122-32. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>

- Molento MB, Chaaban A, Gomes EM, Santos VMCS, Maurer JBB. Plant extracts used for the control of endo and ectoparasites of livestock: a review of the last 13 years of science. *Arch Vet Sci* 2020; 25(4): 01-27. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v25i4.72145>
- Muroi H, Kubo I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* 1996; 80(4): 387-94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03233.x>
- Qi F, Yan Q, Zheng Z, Liu J, Chen Y, Zhang G. Geraniol and geranyl acetate induce potent anticancer effects in colon cancer Colo-205 cells by inducing apoptosis, DNA damage and cell cycle arrest. *J BUON* 2018; 23(2): 346-352.
- Roos MH, Otsen, M, Hoekstra R, Veenstra JG, Lenstra JA. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 2004; 34(1): 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.002>
- Salgado JA, Santos CDP. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25(1): 3-17. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016008>
- Singh S, Fatima Z, Hameed S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. *Arch Microbiol* 2016; 198(5): 459-472. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1205-9>
- Sullivan JT, Richards CS, Lloyd HA, Krishna G. Anacardicacid: molluscicide in cashew nut shell liquid. *Planta Med* 1982; 44:175–7. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971434>
- Tabari MA, Youssefi MR, Esfandiari A, Benelli G. Toxicity of β -citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Res Vet Sci* 2017; 114: 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.001>
- Tan J, Jiang X, Yin G, He L, Liu J, Long Z, Jiang Z, Yao K. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway. *Oncol Rep* 2017; 38(3): 1373-1382. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5841>
- Wang J, Su B, Zhu H, Chen C, Zhao G. Protective effect of geraniol inhibits inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in traumatic injury of the spinal cord through modulation of NF- κ B and p38 MAPK. *Exp Ther Med* 2016; 12(6): 3607-3613. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3850>
- Williams AR, Ramsay A, Hansen TV, Ropiak HM, Mejer H, Nejsum P, et al. Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A-and B-type proanthocyanidins

derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Sci Rep* 2015; 5(1): 1-12.
<https://doi.org/10.1038/srep14791>

Wu W, Li S, Yang M, Lin Y, Zheng K, Akutse KS. Citronellal perception and transmission by *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) females. *Sci Rep* 2020; 10(1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75782-3>

Zajac AM, Garza J. Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2020; 36(1): 73-87.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.005>

Figure 1: Nonlinear regression curves of EHAs with cinnamaldehyde (panel A), citronellal (panel B), geraniol (panel C) and anacardic acid (panel D) for the *H. contortus* isolates KOK, ISE and ECH. R^2 : Coefficient of determination.

Figure 2: Nonlinear regression curves of LDTs with cinnamaldehyde (panel A), citronellal (panel B), geraniol (panel C) and anacardic acid (panel D) for the *H. contortus* isolates KOK, ISE and ECH. R^2 : Coefficient of determination.

Table 1: Effective concentrations of cinnamaldehyde, citronellal, anacardic acid and geraniol for inhibiting 50% and 95% of egg hatching (EC_{50} and EC_{95}), 95% confidence intervals (CI) and resistance factors for *Haemonchus contortus* isolates KOK, ISE and ECH.

Table 2: Effective concentrations of cinnamaldehyde, citronellal, anacardic acid and geraniol for inhibiting 50% and 95% of larval development (EC_{50} and EC_{95}), 95% confidence intervals (95% CI) and resistance factors for *Haemonchus contortus* isolates KOK, ISE and ECH.

Table 1: Effective concentrations of cinnamaldehyde, citronellal, anacardic acid and geraniol for inhibiting 50% and 95% of egg hatching (EC₅₀ and EC₉₅), 95% confidence intervals (CI) and resistance factors for *Haemonchus contortus* isolates KOK, ISE and ECH.

	<i>H. contortus</i> isolates	EC ₅₀ (µM)	95% CI	RF ₅₀	EC ₉₅ (µM)	95% CI	RF ₉₅
Cinnamaldehyde	KOK	133.6	128.5 - 138.9	0.94	295.6	263.5 - 337.6	0.98
	ISE	142.8	137.7 - 148.1	1.00	301.1	270.4 - 340.8	1.00
	ECH	133.2	126.7 - 140.0	0.93	283.2	245.8 - 335.8	0.94
Citronellal	KOK	294.5	268.6 - 322.9	0.95	1,083.1	801.9 - 1,615.2	0.33
	ISE	308.7	276.6 - 344.5	1.00	3,317.3	2,300.2 - 5,120.1	1.00
	ECH	350.6	322.4 - 381.3	1.14	2,008.2	1,494.2 - 2,892.9	0.61
Anacardic acid	KOK	16.97	16.30 - 17.67	0.42	46.12	44.30 - 48.02	0.89
	ISE	40.44	27.67 - 59.12	1.00	52.02	35.60 - 76.10	1.00
	ECH	34.79	32.51 - 37.23	0.86	75.23	70.29 - 80.50	1.45
Geraniol	KOK	651.60	604.3 - 702.6	0.93	1,851.14	1,716.77 - 1,996.03	0.61
	ISE	697.90	659.9 - 738.1	1.00	3,028.71	2,863.80 - 3,203.17	1.00
	ECH	681.70	635.9 - 730.8	0.98	3,440.26	3,209.13 - 3,688.05	1.14

EC₅₀: effective concentration for inhibiting 50% of egg hatching; EC₉₅: effective concentration for inhibiting 95% of egg hatching; 95% CI: 95% confidence interval; RF₅₀: resistance factor for EC₅₀ (EC₅₀ of isolate X/EC₅₀ for the ISE isolate); RF₉₅: resistance factor for EC₉₅ (EC₉₅ of isolate X/EC₉₅ for the ISE isolate).

Table 2: Effective concentrations of cinnamaldehyde, citronellal, anacardic acid and geraniol for inhibiting 50% and 95% of larval development (EC₅₀ and EC₉₅), 95% confidence intervals (95% CI) and resistance factors for *Haemonchus contortus* isolates KOK, ISE and ECH.

	<i>H. contortus</i> isolates	EC ₅₀ (µM)	95% CI	RF ₅₀	EC ₉₅ (µM)	95% CI	RF ₉₅
Cinnamaldehyde	KOK	7,396	6,766 - 8,083	1.02	21,594	16,127 - 32,738	1.53
	ISE	7,232	6,787 - 7,706	1.00	14,115	11,510 - 19,164	1.00
	ECH	6,542	6,319 - 6,772	0.91	13,031	11,529 - 15,183	0.92
Citronellal	KOK	28,422	25,363 - 31,850	0.98	99,284	69,237 - 167,158	1.86
	ISE	28,883	26,809 - 31,117	1.00	53,319	41,555 - 86,254	1.00
	ECH	31,816	28,463 - 35,565	1.10	81,654	57,513 - 148,312	1.53
Anacardic acid	KOK	6.11	5.588 - 6.710	1.15	24.01	21.85 - 26.38	0.59
	ISE	5.31	4.929 - 5.719	1.00	40.85	37.93 - 44.01	1.00
	ECH	7.38	6.858 - 7.931	1.39	18.34	17.06 - 19.72	0.45
Geraniol	KOK	13,119	11,210 - 14,096	1.39	42,670	39,741 - 45,880	1.52
	ISE	9,430	8,822 - 10,081	1.00	28,154	26,338 - 30,097	1.00
	ECH	12,560	11,867 - 13,293	1.33	35,318	33,369 - 37,379	1.26

EC₅₀: effective concentration for inhibiting 50% of larval development; EC₉₅: effective concentration for inhibiting 95% of larval development; 95% CI: 95% confidence interval; RF₅₀: resistance factor for EC₅₀ (EC₅₀ of isolate X/EC₅₀ for the ISE isolate); RF₉₅: resistance factor for EC₉₅ (EC₉₅ of isolate X/EC₉₅ for the ISE isolate).

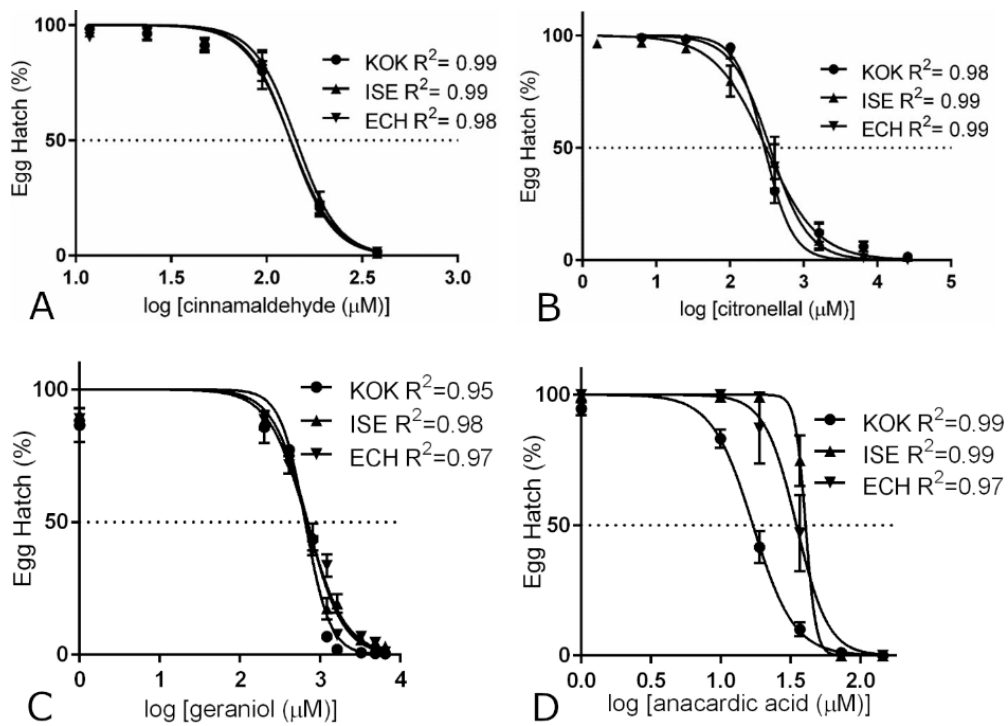


Figure 1: Nonlinear regression curves of EHAs with cinnamaldehyde (panel A), citronellal (panel B), geraniol (panel C) and anacardic acid (panel D) for the *H. contortus* isolates KOK, ISE and ECH. R²: Coefficient of determination.

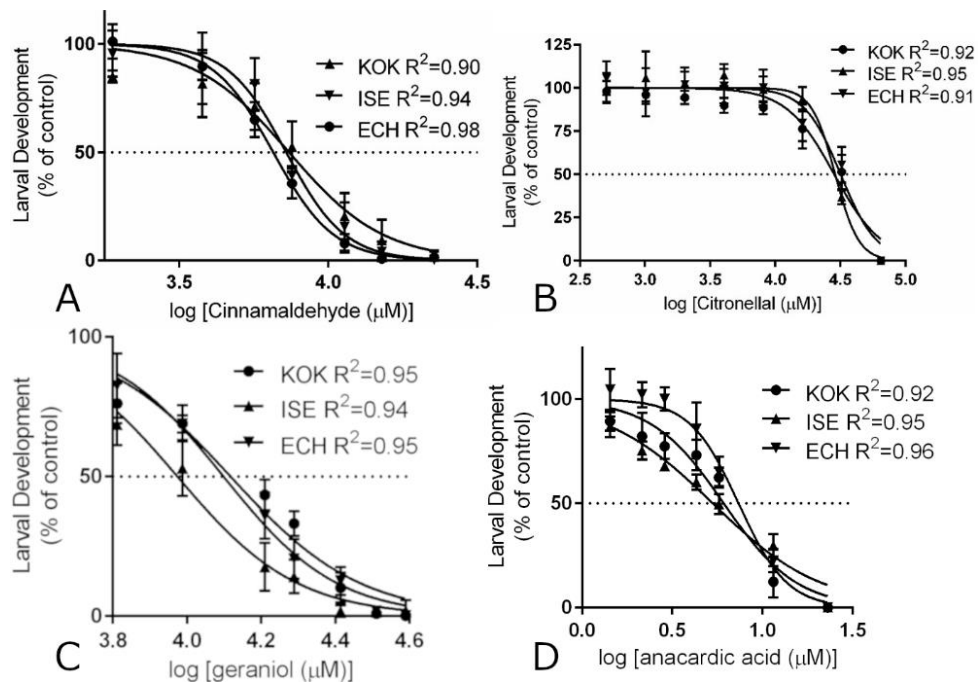


Figure 2: Nonlinear regression curves of LDTs with cinnamaldehyde (panel A), citronellal (panel B), geraniol (panel C) and anacardic acid (panel D) for the *H. contortus* isolates KOK, ISE and ECH. R²: Coefficient of determination.