

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MAYARA DE AQUINO MESQUITA

**ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL ENCAPSULADO DE *Eucalyptus
staigeriana* SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS
RUMINANTES**

**FORTALEZA
2012**

MAYARA DE AQUINO MESQUITA

ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL ENCAPSULADO DE *Eucalyptus staigeriana* SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Sanidade Animal

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecária Responsável – Leila Sátiro – CRB-3 / 544

M578a Mesquita, Mayara de Aquino.
Atividade do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes/ Mayara de Aquino Mesquita. — 2012.
CD-ROM : 52f. il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.
“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.
Orientação: Prof^a.Dr^a. Claudia Maria Leal Bevilaqua.
Co-orientação: Prof^a. Dr^a. Ana Lourdes Camurça F. Vasconcelos.
1. Fitoterapia. 2. Encapsulamento. 3. Quitosana. 4. Teste controlado. 5. Pequenos ruminantes. I. Título.

CDD: 636.08

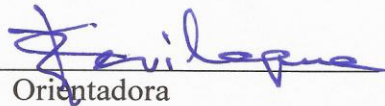
MAYARA DE AQUINO MESQUITA

ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL ENCAPSULADO DE *Eucalyptus
staigeriana* SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS
RUMINANTES

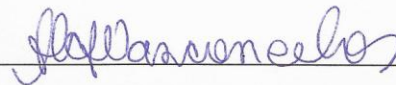
Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Aprovada em: 18 / 12 / 2012

BANCA EXAMINADORA


Orientadora

Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua



Dra. Ana Lourdes Camurça Fernandes Vasconcelos

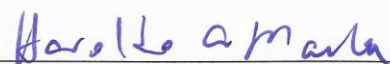
Co-orientadora

Examinadora - PRODOC/CAPES/UECE



Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro

Examinadora - UFPA



Prof. Dr. Haroldo Cesar Beserra de Paula

Examinador - UFC

Àqueles que amo,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudos.

À Universidade Estadual do Ceará e ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LABODOPAR).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, especialmente ao coordenador Doutor Davide Rondina.

A Deus por estar comigo sempre e por me dar forças para continuar.

À minha família, por ser a base de minha vida.

Às mulheres fortes que me inspiram e são fundamentais à minha existência: minha mãe Marilene, minha tia Adriana e minha avó Terezinha.

À minha priminha Ana Júlia, minha irmãzinha postiça, por sua alegria e seu amor.

À professora Claudia Maria Leal Bevilaqua, por me orientar durante o mestrado e acrescentar muito à minha vida, não só nos aspectos acadêmicos. Não há palavras pra exprimir sua importância no meu crescimento.

À doutora Ana Lourdes Camurça Fernandes Vasconcelos, pelo apoio, doçura, gentileza e ajuda constante. Mais que uma co-orientadora, foi fundamental para que esse projeto fosse realizado.

Ao professor Haroldo Beserra de Paula, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Química de Biopolímeros, compartilhando tecnologia e conhecimento, e também ao químico Erick Falcão de Oliveira, por realizar todos os procedimentos de análise e preparação do óleo encapsulado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, que compartilharam comigo parte de seu conhecimento e que contribuíram para o meu crescimento intelectual.

Aos doutores Maria Vivina Barros Monteiro e Cícero Temístocles Coutinho Costa que gentilmente aceitaram participar da banca da minha dissertação e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Aos membros do LABODOPAR, por todos os momentos compartilhados. E especialmente à Juliana, Jessica, Lorena, Iara e Wesley, pelas inúmeras idas à fazenda e também pelo apoio no dia da necrópsia dos animais.

Aos alunos de iniciação científica do LABODOPAR, pela ajuda direta ou indireta na concretização deste trabalho, principalmente aos “meus” ICs, Andressa e Jota, sem os quais eu não teria concluído este trabalho.

À fazenda Piamarta - Itaitinga, sob administração do sr. Lino e a todos os seus funcionários por ceder as instalações necessárias para a realização do experimento. Merecem agradecimento mais que especial, os tratadores Carlinhos e Luciano, que com sua simplicidade e experiência, cuidaram dos meus animais com todo carinho e atenção, estando sempre preocupados em fazer com que tudo desse certo.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, especialmente o sr. Selmar pela ajuda direta em meu trabalho.

A todos os meus amigos, por terem vivido comigo esta etapa, alguns de modo mais distante, mas todos comigo, sempre.

E a tantas outras pessoas que contribuíram para que eu chegasse onde estou. Seria impossível agradecer a todos individualmente.

Aos meus animais de estimação, pelo amor incondicional e por me alegrarem sempre.

Aos ovinos que cederam involuntariamente suas vidas para que inúmeras outras sejam salvas. A vocês, todo o meu respeito e gratidão.

"Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas. Dizem que são tão belas!"

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O parasitismo por nematóides gastrintestinais é responsável por grandes perdas econômicas na produção de pequenos ruminantes no Nordeste brasileiro. A existência de populações de nematóides resistentes aos anti-helmínticos sintéticos é, atualmente, o principal entrave no controle das nematodeoses. Dentre as alternativas de manejo que estão sendo estudadas, destaca-se a fitoterapia. Estudos evidenciaram a atividade anti-helmíntica de óleos essenciais, dentre eles o de *Eucalyptus staigeriana*. Diante disso, o processo de encapsulamento foi aplicado para aumentar a estabilidade e controle da liberação do óleo, incrementando sua eficácia. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar e encapsular o óleo de *E. staigeriana* e avaliar sua eficácia contra nematóides gastrintestinais em ovinos. O encapsulamento foi realizado através de formação de emulsão, utilizando como matriz, solução de quitosana a 4%. Para avaliação da eficácia *in vivo*, foi utilizado o teste controlado. Ovinos (n=18), sem raça definida, de ambos os sexos, com peso médio de 20 kg e idade estimada entre 3 e 6 meses, foram submetidos a exames coproparasitológicos e larvaculturas. De acordo com os resultados de ovos pro grama de fezes, os ovinos foram alocados em três grupos (n=6) homogêneos entre si. Os grupos receberam os seguintes tratamentos, em dose única, via oral: G1: 365 mg/kg do óleo de *E. staigeriana* encapsulado, G2: 200µg/kg de ivermectina e G3: matriz encapsulante em volume idêntico ao G1. Para determinação da carga parasitária, os animais foram eutanaziados e tiveram abomaso e intestinos examinados. O conteúdo e lavado de cada órgão foram coletados e alíquotas de 5% (100mL) foram examinadas. Os nematoides foram contados e identificados especificamente. A análise do óleo indicou limoneno como principal constituinte (72,91%). O produto final do encapsulamento foi um hidrogel contendo óleo de *E. staigeriana* na concentração de 36,5% m/m. Foram encontrados *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus axei* no abomaso; *Trichostrongylus colubriformis* e *Cooperia* spp. no intestino delgado; *Oesophagostomum* spp. e *Trichuris* spp. no intestino grosso. Os dados obtidos foram transformados (logx+1) e comparados pelo teste de Newman-Keuls (p<0,05) usando o programa GraphPad Prism 5. O cálculo da eficácia foi feito pela comparação da carga parasitária dos grupos tratados com o grupo controle. A eficácia do óleo encapsulado de *E. staigeriana* sobre a carga total foi de 67,2%, enquanto a ivermectina teve eficácia de 56,1%, ambos diferiram estatisticamente do controle negativo (p<0,05). A maior eficácia foi observada no abomaso (80%) e neste órgão, o grupo tratado com

ivermectina foi estatisticamente semelhante ($p>0,05$) ao grupo controle que recebeu a matriz, enquanto o hidrogel de *E. staigeriana* foi estatisticamente superior ($p<0,05$) a ambos controles. Assim, demonstrou-se que o óleo encapsulado de *E. staigeriana* pode ser utilizado como ferramenta no controle de nematodeoses, especialmente em casos de Hemoncose e Tricostrongilose, inclusive na presença de nematoides resistentes a anti-helmínticos.

Palavras-chave: Fitoterapia. Encapsulamento. Quitosana. Teste controlado. Pequenos ruminantes.

ABSTRACT

Parasitism by gastrointestinal nematodes is responsible for great economic losses in the production of small ruminants in the Brazilian Northeast. The existence of populations of nematodes resistant to anthelmintics synthetic is currently the main obstacle in the control of parasitic diseases. Among the management alternatives being studied, there is herbal medicine. Studies showed the anthelmintic activity of essential oils, including the *Eucalyptus staigeriana*. Therefore, the encapsulation process was applied to enhance oil stability and control of its release, increasing its effectiveness. The objective of this study was to analyze and encapsulate the oil *E. staigeriana* and evaluate their effectiveness against gastrointestinal nematodes in sheep. The encapsulation was performed by emulsion formation, using as matrix, 4% chitosan solution. To evaluate *in vivo* efficacy, we used the controlled test. Sheep (n = 18), of undefined breed, of both sexes, with average weight of 20 kg and estimated age between 3 and 6 months, underwent fecal examinations and larval cultures. According to the results of fecal eggs per gram, animals were allocated into three groups (n = 6) homogeneous to one another. The groups received the following treatments in a single dose orally: G1: 365 mg/kg *E. staigeriana* encapsulated oil, G2: 200µg/kg ivermectin and G3: 4% chitosan solution in identical volume to G1. For determination of worm burden, the animals were euthanized and abomasum and intestines were examined. The content and washed of each organ were collected and aliquots of 5% (100mL) were evaluated. The nematodes were counted and identified specifically. Oil analysis indicated limonene as major constituent (72.91%). The final product was a hydrogel containing *E. staigeriana* with concentration of 36.5% w/w. *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus axei* were founded in the abomasum; *Trichostrongylus colubriformis* and *Cooperia* spp. in the small intestine; *Oesophagostomum* spp. and *Trichuris* spp. in the large intestine. Data were transformed ($\log x + 1$) and compared by Newman-Keuls test ($p < 0.05$) using the GraphPad Prism 5. The calculation of effectiveness was done by comparing the worm burden of the treated groups with the control group. The efficacy of *E. staigeriana* encapsulated oil on the total worm burden was 67.2%, while the efficacy of ivermectin was 56.1%, both statistically different from the negative control ($p < 0.05$). The highest efficacy was observed in the abomasum (80%) and in this organ, the group treated with ivermectin was statistically equal ($p > 0.05$) to the group control which received chitosan, while the *E. staigeriana* hydrogel was statistically superior ($p < 0.05$) to both controls. Thus, was demonstrated that the encapsulated oil of *E.*

staigeriana can be used as a tool in controlling nematode diseases, especially in cases of Haemonchosis and Trichostrongilosis, even in presence of anthelmintic resistant nematodes.

Key-words: Phytoterapy. Encapsulation. Chitosan. Controlled test. Small ruminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas e flores de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	22
Figura 2 - Fórmula estrutural dos polímeros quitina e quitosana	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composition of Eucalyptus staigeriana oil obtained by gas chromatography/mass spectrometry using a Hewlett-Packard 5971 GC/MS instrument.....	38
Tabela 2 - Efficacy and mean of abomasal and small intestine nematodes and worm burden \pm standard error of sheep (n=6) treated with 365mg/kg of Eucalyptus staigeriana encapsulated oil, 200 μ g/kg of ivermectin and 4% chitosan solution	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm - Centímetro

CE50 - Concentração efetiva

°C - Graus Celsius

eV - Eletro volt

FECRT - Teste da Redução na Contagem de Ovos

g - Grama

kg - Quilograma

mg - Miligramas

µl - Microlitros

ml - Mililitros

m/v - Massa/volume

OPG - Ovos por grama de fezes

% - Porcentagem

SRD - Sem raça definida

TDAL - Teste de Desembainhamento Larvar Artificial

TDL - Teste de Desenvolvimento Larvar

TEO - Teste de Eclosão de Ovos

TIIAL - Teste de Inibição da Alimentação Larvar

UECE - Universidade Estadual do Ceará

UFC - Universidade Federal do Ceará

v/v - Volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	18
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	18
2.1. Parasitismo por nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes-----	19
2.2. Fitoterapia como alternativa de controle-----	20
2.3. Óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> -----	21
2.4. Encapsulamento -----	23
2.5. Teste controlado: um teste de eficácia <i>in vivo</i> -----	25
3. JUSTIFICATIVA -----	28
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA -----	29
5. OBJETIVOS -----	30
5.1. Objetivo geral-----	30
5.2. Objetivos específicos-----	30
6. CAPÍTULO 1 -----	31
7. CONCLUSÕES -----	45
8. PERSPECTIVAS -----	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	47

1. INTRODUÇÃO

A região Nordeste do Brasil possui significativo rebanho de ovinos e caprinos, no entanto, a produtividade destes rebanhos é prejudicada pelo parasitismo por nematóides gastrintestinais. Estes parasitos ocasionam redução na produção de carne e leite e são responsáveis por elevada mortalidade durante o período chuvoso (VIEIRA, 2008).

O controle de nematóides gastrintestinais é realizado quase exclusivamente com anti-helmínticos sintéticos. Entretanto, esses medicamentos apresentam uma série de desvantagens como: altos custos, presença de resíduos nos alimentos oriundos de animais tratados, risco de poluição ambiental (WALLER, 2006) e baixa eficácia, devido à resistência dos parasitos às diferentes classes dessas drogas (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). É importante destacar que o desenvolvimento de parasitos resistentes é uma realidade no Nordeste brasileiro (MELO et al., 2003). Por esse motivo tem sido recomendada a utilização de métodos que minimizem o uso regular e preventivo de anti-helmínticos sintéticos (ATHANASIADOU et al., 2008). Diante da limitação do número de alternativas terapêuticas e profiláticas, os compostos anti-helmínticos devem ser usados estrategicamente, associados a outras medidas que visem reduzir a dependência do controle químico, aumentando assim a vida útil das drogas, diminuindo o impacto do uso de anti-helmínticos na seleção para resistência (JACKSON; MILLER, 2006).

Uma alternativa que tem sido proposta para o controle de nematóides gastrintestinais é a fitoterapia, pois as plantas podem desempenhar um papel importante, ao serem associadas a outros métodos, promovendo o controle sustentável das infecções por nematoides gastrintestinais (GITHIORI et al., 2006; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

Os óleos essenciais constituem um grupo importante de produtos de origem vegetal que podem ser utilizados como alternativas ou aliados às terapias antiparasitárias convencionais (ANTHONY et al., 2005).

Entre as plantas que estão sendo testadas, destaca-se *Eucalyptus staigeriana*. Esta árvore é conhecida popularmente como eucalipto e pode ser encontrada em uma extensa área do Brasil (PEREIRA et al., 2006; SALARI et al., 2006). Em estudos *in vitro*, o óleo essencial de *E. staigeriana* inibiu 99,27% da eclosão de larvas na concentração de 1,35mg/mL e 99,26% do desenvolvimento larvar na concentração de 5,4mg/mL. Contudo, nos testes *in vivo*, os resultados do FECRT variaram entre 61,4 e 76,5% (MACEDO et al., 2010). Uma alternativa viável para

melhorar a eficácia do óleo essencial de *E. staigeriana* é o encapsulamento, pois este processo estabiliza as substâncias ativas e permite sua liberação controlada das mesmas (LEIMANN, 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Parasitismo por nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes

Várias espécies de helmintos parasitam o trato gastrintestinal dos pequenos ruminantes como *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides* spp., *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al., 2004). O parasitismo pelos gêneros *Trichostrongylus* spp. e *Cooperia* spp. ocasionam diarreia aquosa prolongada e debilitante, e conseqüentemente, fraqueza e emaciação. As manifestações clínicas resultantes da infecção por *Oesophagostomum* spp. estão relacionadas ao nódulos larvais na mucosa do intestino grosso. *H. contortus* é considerado o parasito mais importante dentre os estrongilídeos, sendo seu efeito patogênico mais marcante a anemia, devido ao seu hábito alimentar hematofágico (URQUHART, 1998; BOWMAN, 2006 ; ZAJAC, 2006).

As perdas econômicas causadas pelo parasitismo gastrintestinal são de dois tipos: as diretas, caracterizadas pela redução da produção, menor qualidade do produto e mortalidade e as indiretas, como os altos custos associados ao tratamento e controle, tais como diagnósticos laboratoriais, medicamentos e mão de obra para a administração (HOSTE et al., 2011). Estas perdas também podem estar relacionadas com o status nutricional do hospedeiro que é considerado um importante fator que influencia a relação parasito/hospedeiro e a patogenia das infecções parasitárias. Os parasitos gastrintestinais podem diminuir o consumo voluntário de alimento e a eficiência da utilização de nutrientes retardando o desenvolvimento dos animais, principalmente dos mais jovens que é a faixa etária mais atingida (VALDERRÁBANO et al., 2002).

O método mais utilizado para controlar o parasitismo gastrintestinal nos pequenos ruminantes é o controle químico por meio do uso de anti-helmínticos (JACKSON E MILLER, 2006). Contudo, o uso intenso e inadequado destes produtos tem favorecido o desenvolvimento de populações de nematóides resistentes. A utilização desses fármacos também apresenta outras

desvantagens, como o alto custo, a presença de resíduos nos alimentos e o risco de poluição ambiental (WALLER, 2006; MELO et al., 2009). Assim, torna-se necessário investir em pesquisas que visem à busca de alternativas de controle, que sejam de baixo custo e menos nocivas à saúde humana e ao meio ambiente (VIEIRA, 2008).

2.2. Fitoterapia como alternativa de controle

Com a disseminação da resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes, está claro que não há uma abordagem única que seja capaz de impedir a perda de eficácia que ocorre constantemente com os anti-helmínticos sintéticos. Na década de 60, foram lançados os primeiros anti-helmínticos de largo espectro. Entretanto, poucos anos depois já se registravam os primeiros casos de resistência anti-helmíntica e esta surge atualmente como a questão primordial no controle de parasitos de pequenos ruminantes. Os parasitologistas concordam que o paradigma convencional do controle dos parasitos por meio de uma base química deve ser substituído pela busca por abordagens alternativas de controle que ofereçam a perspectiva de não apenas reduzir a dependência da quimioprofilaxia, mas ao fazê-lo, ajudar a manter a eficácia dos atuais anti-helmínticos (VAN WYK et al., 2006 ; CEZAR et al., 2008 ; VIEIRA, 2008).

As plantas são produtoras de substâncias químicas que podem ser úteis no tratamento de uma grande variedade de doenças em homens e animais (MCGAW; ELOFF, 2008). Seus compostos ativos podem ser de dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em praticamente todos os organismos. Nas plantas superiores tais compostos se concentram frequentemente em sementes e órgãos de armazenamento e são necessários para o desenvolvimento fisiológico, pois possuem papel importante no metabolismo celular básico. Os metabólitos secundários são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários. Frequentemente representam adaptações químicas à pressão ambiental ou defensores químicos contra microrganismos, insetos e predadores superiores. As atividades biológicas das plantas medicinais são frequentemente atribuídas aos seus metabólitos secundários (CHAGAS, 2004). O uso desses metabólitos pode ser uma forma eficaz de tratar os animais parasitados em uma produção "orgânica" em que a utilização de anti-helmínticos sintéticos não é permitida

(LISONBEE et al., 2009). Dentre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais, que são produtos obtidos de partes das plantas, definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides (SIMÕES, 2004).

A possibilidade de se produzir um medicamento antiparasitário de menor custo, associado ao fato do medicamento ser um produto natural, está entre as vantagens da utilização das plantas medicinais como alternativa de controle do parasitismo gastrointestinal em pequenos ruminantes (CHAGAS, 2008).

Embora o mecanismo de ação das plantas medicinais contra nematóides gastrointestinais não esteja esclarecido (HOSTE et al., 2008), a atividade de extratos e óleos essenciais já foi demonstrada sobre diferentes estágios de vida dos parasitos. Em testes *in vitro* de inibição da eclosão de ovos (TEO), do desenvolvimento larvar (TDL), da inibição da alimentação (TIAL) e do desembainhamento artificial larvar (TDAL) os óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus* apresentaram elevada atividade contra tricostrongilídeos de ovinos. As CE50 dos óleos com melhor resultado variaram de 0,009 mg/mL no TIAL a 24,66 mg/mL no TDAL (KATIKI et al., 2011). Já em testes *in vivo*, a emulsão do óleo essencial de laranja na dose única de 600mg/kg (SQUIRES et al., 2010) promoveu redução de 98% no teste redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) e o óleo essencial de *Lippia sidoides* na dose de 283mg/kg durante cinco dias demonstrou eficácia de 43,7% no teste controlado (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

2.3. Óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*

Diversos estudos têm sido realizados visando validar a utilização de plantas popularmente conhecidas como medicinais. Tal fato mostra que a validação científica destas plantas é necessária a fim de assegurar a eficácia e a segurança da administração destas plantas ou de seus derivados em organismos vivos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; GITHIORI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

Entre as muitas plantas que vêm sendo testadas, pode-se citar os vegetais do gênero *Eucalyptus*, família Myrtaceae. *Eucalyptus staigeriana* (Fig.1) está entre as espécies de eucalipto mais cultivadas no Brasil, para obtenção de óleo essencial (VITTI; BRITO, 2003).



Fig. 1. Folhas e flores de *Eucalyptus staigeriana*

Fonte: <http://www.newdirections.com.cn/images/products/OEEUCASTAI>

Eucalyptus staigeriana é caracterizada como uma árvore de tamanho médio, podendo chegar a 22 m de altura, com copa reduzida e espalhada. Esta espécie está adaptada em zonas climáticas quentes e subúmidas, sobre solos pobres e bem drenados. A cultura do eucalipto é destinada basicamente à obtenção de óleos essenciais para perfumaria sendo a madeira vendida como lenha (VITTI; BRITO, 2003).

Estudos mostraram a eficácia de limoneno e citral, relatados como principais componentes do óleo essencial de *E. staigeriana* sobre diferentes agentes patológicos, dentre eles: bactérias e fungos (FISHER et al., 2007; VUUREN; VILJOEN, 2007; GILLES et al., 2010), leishmânias e tripanossomatídeos (GRAEBIN et al., 2010, MACIEL et al., 2010), insetos (LEE et al. 2003; YANG et al., 2005; SANTOS et al., 2011), carrapatos (CHAGAS et al., 2002) e ácaros (GEORGE et al., 2008).

A atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *E. staigeriana* na dose de 500 mg kg⁻¹ já foi testada e apresentou eficácia de 86,3% na redução da carga parasitária de camundongos (MACEDO, 2008). Em estudo utilizando o FECRT, 500mg kg⁻¹ de *E. staigeriana* administrado durante três dias em caprinos infectados por *H. contortus*, apresentou eficácia variável entre 61,4

e 76,57% nos dias 8 e 15 após tratamento. No mesmo período a eficácia da ivermectina variou entre 85,59 e 67,34% (MACEDO et al., 2010).

Estes dados demonstraram o potencial de uso deste óleo como anti-helmíntico, especialmente quando comparado à ivermectina, que apresentou baixa eficácia. É importante ressaltar que esses estudos utilizaram o óleo essencial puro de *E. stageriana* e os óleos essenciais são compostos instáveis que podem reagir com outras substâncias. Deste modo podem tornar-se irritantes, volatilizar-se ou simplesmente oxidar-se. Assim, o encapsulamento se destaca como uma alternativa viável para aumentar a estabilidade destes compostos e permitir sua liberação controlada (LEIMANN, 2008).

2.4. Encapsulamento

O encapsulamento é uma técnica capaz de aumentar o tempo de vida útil de compostos voláteis, além de permitir a liberação controlada dos ingredientes e, assim, assegurar a dosagem adequada e melhorar a eficácia de aditivos nos alimentos, ampliando a escala de aplicação. (LEIMANN, 2008). Diversas técnicas estão disponíveis e a escolha do método mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (SUAVE et al., 2006). Dentre os métodos físicos tem-se: spray drying, spray cooling, pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, cocristalização e liofilização; Como exemplo de métodos químicos: inclusão molecular e polimerização interfacial; E os métodos físico-químicos: coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (SANTOS et al., 2000).

Os objetivos mais importantes do encapsulamento são: proteger uma substância frente a agentes externos (temperatura, umidade, radiação ultravioleta); reduzir a evaporação ou redução da taxa de liberação da cápsula para o ambiente; mascarar determinadas propriedades da

substância encapsulada (cheiro, sabor); proteger o ambiente da ação descontrolada da substância ativa (pesticidas tóxicos) (ADAMIEC; MARCINIAK, 2004).

Na área farmacêutica, o processo de encapsulamento é utilizado principalmente para aumentar a estabilidade de uma droga ou para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos de ação no organismo humano (RÉ, 2000). Como exemplo, pode ser citado o ácido acetilsalicílico, cujo processo de encapsulamento tem os seguintes objetivos: mascarar o sabor, reduzir a irritação da mucosa gástrica e promover a liberação controlada do mesmo (SUAVE et al., 2006).

Hidrogéis são redes poliméricas reticuladas que possuem a propriedade de intumescer em ambientes abundantes em água ou fluidos biológicos, os quais podem ser usados como carreadores de fármacos (microcápsulas). Essa estrutura reticulada A parede polimérica reticulada proporciona a proteção do material contido no núcleo das microcápsulas e permite sua interação com a mucosa do trato gastrointestinal, cólon, vagina, nariz e outras partes do corpo prolongando seu tempo de residência para liberação (ROHINDRA et al., 2004; LEIMANN, 2008).

Os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros sintéticos, como o glutaraldeído ou a partir de polímeros naturais, como a quitosana. Este último, é um abundante polissacarídeo, de baixo custo, biocompatível e biodegradável, obtido por meio de N-deacetilação alcalina da quitina (Fig. 3) (DENKBAS et al., 2002 ; HEJAZI; AMIJI, 2003 ; PARK et al., 2010).

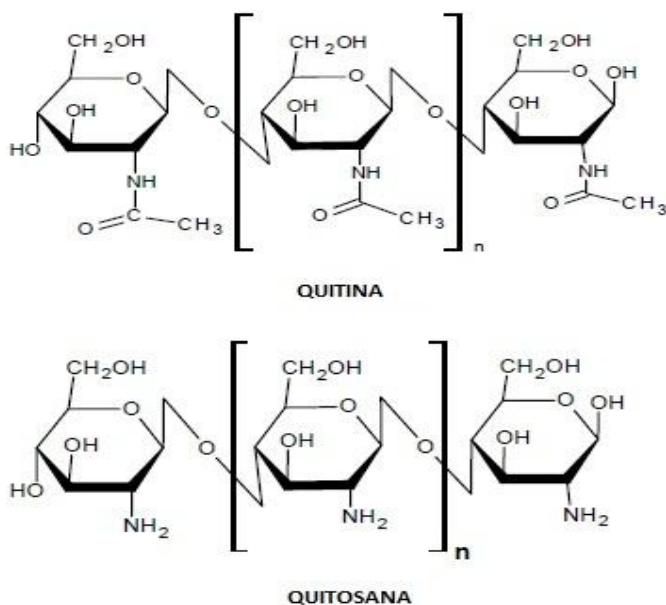


Fig. 2. Fórmula estrutural dos polímeros quitina e quitosana

Os efeitos positivos das técnicas de encapsulamento tem sido observados e há relatos que a biodisponibilidade do produto encapsulado pode ser aumentada, ter sua hidrofobicidade reduzida, sua propriedade antioxidante protegida, estabilidade melhorada diante de condições ambientais diversas e taxa de liberação controlada modificada de acordo com o pH (BARBOSA et al., 2002; AUGUSTIN et al., 2011; JUN-XIA et al., 2011; ZHENG, 2011). A quitosana demonstrou ser útil como carreador de drogas em sistemas de liberação controlada e entrega dirigida (PARK et al., 2010). Sabe-se também que é capaz de melhorar a taxa de dissolução de drogas pouco solúveis e, portanto, pode ser utilizada para o aperfeiçoamento da biodisponibilidade dessas drogas (SINHA et al., 2004). Outra vantagem que merece destaque é sua capacidade de muco- adesão (KAST; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2001), a qual pode ser responsável pelo aumento da eficácia do óleo de *E. staigeriana*, pelo aumento no tempo de exposição dos nematóides ao óleo no órgão alvo.

2.5. Teste controlado: um teste de eficácia *in vivo*

Os testes de eficácia com a espécie alvo devem ser os últimos a serem realizados numa pesquisa sobre atividade de plantas medicinais. Alguns testes foram desenvolvidos para avaliar a resistência aos anti-helmínticos disponíveis no mercado e vêm sendo utilizados para determinar a eficácia de drogas contra nematóides (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005).

Dentre essas técnicas, destacam-se o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) conforme recomendado por Coles et al. (1992) e o teste controlado indicado por Wood et al. (1995).

Embora já tenha sido realizado o FECRT com o óleo de *E. staigeriana* (MACEDO et al., 2010) recomenda-se a realização de novo teste *in vivo*, não só pela aplicação de nova formulação, mas também porque óleos essenciais de uma mesma espécie vegetal podem diferir em sua composição (CHAGAS et al., 2002 ; MACIEL et al., 2010).

Além disso, o teste controlado é o estágio final da validação de um fitoterápico, pois dentre os testes *in vivo*, é considerado o mais confiável (TAYLOR et al., 2002; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Contudo, é mais dispendioso em termos de requerimento de mão-de-obra e de animais, quando comparado ao FECRT (TAYLOR et al., 2002), pois para

determinar a eficácia anti-helmíntica é feita a comparação das cargas parasitárias no grupo tratado com as do grupo não tratado, exigindo assim a necropsia dos animais(WOOD et al.,1995).

Para avaliação da atividade anti-helmíntica a “World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.)” recomenda (WOOD et al., 1995) que:

1. A afirmação de eficácia de um produto deve ser expressa contra cada gênero/espécie (larva/adulto) como: altamente eficaz (acima de 98%), eficaz (90-98%), moderadamente eficaz (80-89%) ou insuficientemente ativo (menos de 80%);

2. As doses devem ser baseadas no peso corporal;

3. O conhecimento do modo de ação de um produto não é um requerimento exigido para registro. Entretanto pode ser útil para estabelecer se o produto poderá ser eficaz contra populações resistentes de parasitos;

4. A distribuição dos animais nos grupos deve ser feita ao acaso, entretanto quando usadas infecções naturalmente adquiridas, uma maior uniformidade pode ser atingida se a contagem de ovos nas fezes ou larvas de parasitos for usada como critério de infecção;

5. Com relação ao procedimento de tratamento, um fator essencial é garantir que cada animal receba uma dose adequada, portanto os seguintes procedimentos visam minimizar erros experimentais:

- horário de tratamento: dispensar tempo adequado para os tratamentos, evitando pressa;
- identificação do animal antes do início de cada tratamento;
- calibragem do equipamento de dosificação dos animais;
- a pesagem dos animais deve ser feita no máximo dois dias antes dos tratamentos e não no dia dos tratamentos para evitar confusão com muitas tarefas;
- o cálculo das doses dos tratamentos deve ser feito baseado no peso corporal dos animais, e deve ser feito antes da hora do tratamento;
- checagem cautelosa da identificação dos animais antes dos tratamentos para evitar erros de administração;
- observações pós-tratamentos devem ser feitas por pelo menos 4 h, e depois diariamente, para detectar possíveis efeitos adversos.

O intervalo entre os tratamentos e o procedimento das necropsias varia em função da farmacocinética e/ou persistência das formulações. Para produtos orais que atingem níveis terapêuticos rapidamente e/ou possuem pouca ou nenhuma atividade persistente, a necropsia deve ser feita 4 a 7 dias após o tratamento contra nematóides adultos (WOOD et al., 1995). Quando a necropsia de todos os animais não pode ser completada em 1 dia, réplica ou um número igual de animais de cada grupo de tratamento deve ser examinado, diariamente e tão rápido quanto possível, preferivelmente dentro de 3-4 dias (WOOD et al., 1995).

A eficácia dos tratamentos é expressa como a percentagem de eficácia (% E) da dose contra uma determinada espécie de parasito (S) em um único grupo de tratamento (T) quando comparado com o controle não tratado (C), dado pela seguinte fórmula (WOOD et al., 1995):

$$(\% E) = (\text{Média de S em C} - \text{Média de S em T}) \times 100 / \text{Média de S em C}$$

Por se tratar de um teste extremamente laborioso associado à necessidade da necropsia de animais, em geral é a última etapa realizada na avaliação de substâncias com atividade anti-helmíntica. Geralmente esse teste é utilizado na determinação de eficácia anti-helmíntica e há relatos de seu uso na pesquisa de fitoterápicos. Dentre esses, destacam-se Oliveira et al. (2009) cujos resultados obtidos com o extrato de *Cocos nucifera* não diferiram estatisticamente do controle negativo com DMSO 3% e Camurça-Vasconcelos et al. (2008) que testaram o óleo essencial de *Lippia sidoides* e obtiveram eficácia semelhante ao controle com ivermectina.

3. JUSTIFICATIVA

O parasitismo por nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes é responsável por grandes perdas econômicas na ovinocaprino cultura da região nordeste do Brasil, tanto pelo elevado custo dos anti-helmínticos sintéticos quanto pela presença de populações de nematóides resistentes a esses medicamentos. Tal fato torna necessária a busca por alternativas de controle, como por exemplo, o óleo essencial de *E. staigeriana* testado anteriormente e que apresentou bom resultado anti-helmíntico. Além disso, acredita-se que o processo de encapsulamento pode aumentar a estabilidade e controlar a liberação do óleo essencial de *E. staigeriana* no trato gastrintestinal dos animais e, conseqüentemente, sua eficácia contra nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

O óleo essencial encapsulado de *E. staigeriana* é eficaz no controle de nematóides gastrointestinais de pequenos ruminantes.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Desenvolver uma formulação com tecnologia agregada do óleo de *E. staigeriana*, por meio de encapsulamento, e avaliar sua eficácia no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

5.2. Objetivos específicos

- Analisar quimicamente o óleo essencial de *E. staigeriana*
- Encapsular o óleo essencial de *E. staigeriana*
- Determinar a atividade anti-helmíntica do óleo essencial encapsulado de *E. staigeriana* contra nematóides gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados

6. CAPÍTULO 1

Atividade anti-helmíntica do óleo encapsulado de *Eucalyptus staigeriana* sobre nematoides
gastrointestinais de ovinos

Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal
nematodes

Veterinary Parasitology
Submetido em novembro de 2012

Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal nematodes

Mayara de Aquino Mesquita^a ; João Batista e Silva Júnior^a ; Andressa Machado Panassol^a ; Erick Falcão de Oliveira^b ; Ana Lourdes Camurça Fernandes Vasconcelos^a ; Haroldo Cesar Beserra de Paula^b ; Claudia Maria Leal Bevilaqua^a

^aFaculdade de Veterinária/Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará, Brasil;

^bULaboratório de Química de Biopolímero/Universidade Federal do Ceará, Brasil

Corresponding author:

Universidade Estadual do Ceará/Laboratório de Doenças Parasitárias/PPGCV,
Av. Dedé Brasil, 1700, CEP 60740-903 Fortaleza, Ceará, Brasil.

Phone. 55. 85.31019853; fax 55.85.31019860

e-mail: claudiamlb@yahoo.com.br

RESUMO

A atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* foi demonstrada através de testes *in vitro* e *in vivo*. Assim, um processo de encapsulamento foi realizado para incrementar sua estabilidade, promover sua liberação controlada em órgãos alvo, reduzir a dosagem e aumentar sua eficácia. Os objetivos desse trabalho foram analisar encapsular o óleo essencial de *E. staigeriana* e verificar sua atividade anti-helmíntica em ovinos. O processo de encapsulamento foi realizado através de formação de emulsão, utilizando uma solução de quitosana a 4% como matriz. A atividade anti-helmíntica foi estabelecida através do teste controlado com 18 ovinos que foram alocados em três grupos: G1 tratado com uma dose única de 365 mg/kg de óleo encapsulado de *E. staigeriana*; G2 tratado com 200 µg/kg de ivermectina; e G3 tratado com solução de quitosana a 4%, como controle negativo. Os ovinos foram eutanaziados e necropsiados 13 dias após o tratamento para avaliação da carga parasitária. Limoneno foi o principal constituinte do óleo (72,91%). O produto final foi um hidrogel com 36.5% (m/m) de óleo essencial de *E. staigeriana* por grama. Sua eficácia contra nematoides gastrintestinais foi de 60,79%. A maior eficácia foi contra nematóides do abomaso, 83,75%. Novos estudos são necessários para explorar a possibilidade de aumento da eficácia do hidrogel; contudo, mostrou-se que o óleo encapsulado de *E. staigeriana* possui atividade anti-helmíntica e pode ser usado no controle de nematoides gastrintestinais.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterapia ; Encapsulamento ; Hidrogel ; Pequenos ruminantes ; Teste controlado ; Nematóides gastrointestinais

ABSTRACT

The anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* essential oil has previously been inferred through both *in vitro* and *in vivo* tests. Thus, an encapsulation process was conducted to improve oil stability, promote controlled release in target organs, reduce dosage and increase efficacy. The aims of this study were to analyze and encapsulate *E. staigeriana* essential oil and to verify its anthelmintic activity in sheep. The encapsulation process was accomplished through emulsion using a 4% chitosan solution as the matrix. Anthelmintic activity was established through controlled testing using 18 sheep that were separated into three groups: Group 1 (G1) was treated with a single dose of 365 mg/kg of *E. staigeriana* encapsulated oil; G2 was treated with 200 µg/kg of ivermectin; and G3 was treated with a 4% chitosan solution as a negative control. The sheep were euthanized and necropsied 13 days post treatment to evaluate worm burden. Limonene was the major oil component (72.91%). The final product was a hydrogel with 36.5% (w/w) *E. staigeriana* essential oil per gram. Its efficacy on gastrointestinal nematodes was 60.79%. The highest efficacy was against abomasal nematodes, with 83.75% efficacy. Further studies are necessary to explore the possibility of increasing the hydrogel efficacy; nevertheless, we can state *E. staigeriana* encapsulated oil had anthelmintic activity and can be used in gastrointestinal nematode control.

KEYWORDS: Phytotherapy; Encapsulation; Hydrogel; Small ruminants; Controlled test; Gastrointestinal nematodes

INTRODUCTION

Gastrointestinal parasitism is an endoparasitic disease with major economic importance in small ruminant production (Vieira, 2008). Furthermore, the effectiveness of commercial anthelmintics has been threatened by the development of resistance in nematode populations (Miller et al., 2012). To combat this resistance, many studies on medicinal plants with anthelmintic properties have recently been performed (Camurça-Vasconcelos et al., 2008; Oliveira et al., 2011). A previous study evaluated the anthelmintic activity of *E. staigeriana* essential oil *in vitro*, using the egg hatch and the larval development assays. In addition, anthelmintic activity was observed *in vivo* through fecal egg count reduction test in goats (Macedo et al., 2010).

Oils are unstable compounds that are difficult to preserve because they are susceptible to changes through oxidation and volatilization (Simões et al., 2004). Thus, encapsulation stands out as a viable alternative to increase the stability of these compounds and to allow their controlled release in target organs (Leimann, 2008). The most important aims and advantages of encapsulation include the following: the protection of an active substance against external agents (e.g., temperature, humidity, or interaction with other substances or UV radiation); reduction of the evaporation or active substance release rate from the capsule to the environment; and the masking of certain properties of the active substances (e.g., smell, flavor, or catalytic activity). Among the polymers that can be used as encapsulating agents, chitosan is frequently used due to its biocompatibility, biodegradability and abundance (Illum et al., 2001).

Chitosan is a natural polysaccharide that is found in the exoskeleton of crustaceans and is composed of β -(1 \rightarrow 4)-linked D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine units that are obtained by the alkaline deacetylation of chitin (Kumar et al., 2004). This biopolymer has previously been used as the matrix in encapsulation of essential oils as *Lippia sidoides* (Paula et al., 2011) and one of its major components, D-limonene (Borgognoni et al., 2006).

The objectives of this work were to analyze and encapsulate *E. staigeriana* essential oil and to evaluate its anthelmintic activity in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes.

MATERIALS AND METHODS

All of the experiments were approved by the Ethics Committee of Ceará State University (number: 11585691-9/03).

2.1. Encapsulation and analysis of *E. staigeriana* essential oil

E. staigeriana essential oil was purchased from FERQUIMA Ind. & Com. Ltda (Vargem Grande Paulista - SP, Brazil), Lot no. 109 and analyzed using gas chromatography/mass spectrometry. The following equipment was used: a Hewlett-Packard 5971 GC/MS; a dimethylpolysiloxane DB-1-fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm); and He carrier gas (1 ml/min). The injector temperature was 250 °C, and the detector temperature was 200 °C. The column temperature program was raised from 35 °C to 180 °C at 4 °C/min, and then from 180 °C to 250 °C it was raised at 10 °C/min. For mass spectrometry, the electron impact was 70 eV. Compounds were identified by comparison of retention indices and visual interpretation of the mass spectra through computer-based library search. To promote the encapsulation process, a 4% (m/v) chitosan solution was added to a 30 ml initial solution that contained two parts *E. staigeriana* to one part Tween-80 (v/v) in a magnetic stirrer over 10 min at 27 °C. The solution was maintained at rest for 24 h to complete hydrogel formation.

Controlled test

Eighteen sheep of undefined breed and of both sexes aged from 3 to 6 months with a mean live weight of 14.5 kg were kept indoors in a collective stall. They were fed with Coastcross hay (*Cynodon dactylon*) and supplemented with commercial feed (Ovino Top® Integral Mix) and water *ad libitum*. Before beginning the controlled test, all of the animals were given an individual fecal exam to determine the level of gastrointestinal nematode infection using a modified McMaster technique (Ueno and Gonçalves, 1998). Fecal culturing using the method of Roberts and O'Sullivan (1950) was performed using a pool of feces to obtain infective larvae (L3). Animals with fecal eggs per gram (epg) counts of less than 1000 were inoculated with 4000 L3 obtained from fecal cultures from themselves over three consecutive days. Twenty-one days later, the sheep were examined again to confirm infection.

The sheep were grouped according to epg counts into three homogeneous groups (n=6) treated by oral administration with: Group 1 (G1) 365 mg/kg of *E. staigeriana* encapsulated oil; G2 sheep were positive controls and received 200 µg/kg of ivermectin (Ivomec® Merial). G3

sheep were negative controls and received matrix (chitosan 4% + Tween-80 solution) in the same volume as the G1 sheep. This dose was chosen after a pilot experiment in which some efficacy and no toxicity were observed. All treatments were administered using a drench gun, and to improve administration, the hydrogel was mixed with distilled water. The animals were fasted for eight hours before treatment and had normal access to feed and water after treatment.

Thirteen days after treatment, the sheep were euthanized and necropsied in an abattoir. The animals' feed was withdrawn 24 h prior to euthanasia. Immediately after death, the abomasum, small intestines and large intestines were tied off and processed separately. Double ligatures were placed between each organ, and then they were detached and placed into trays. The gut contents and their washings were collected according to Wood et al. (1995). Briefly, the organs were opened and their contents thoroughly separated into beakers. The washings were collected in two beakers through careful rubbing under a slow running jet of water. The contents and washing volumes of each organ were brought up to 2 liters. Then the solutions were mixed, and two 5% aliquots (100 ml) from each beaker were collected. Each aliquot received the same volume of an AFA (alcohol, formol, acetic acid and water) solution to preserve and, posteriorly, adult nematodes were identified and counted (Ueno and Gonçalves, 1998).

Statistical analysis

The efficacy of treatment was calculated according to Wood et al. (1995). The data from each group were log transformed ($\log_{10}[x+1]$) to stabilize the variance, analyzed by ANOVA and compared by the Newman-Keuls test ($P < 0.05$) using the GraphPad Prism 5 program. The total adult worm count data were presented as means \pm standard error.

RESULTS

The major components of *E. staigeriana* oil determined by GC/MS were limonene (72.91%), cineole (9.47%) and o-cymene (4.59%) as shown in Table 1.

Table 1. Composition of *Eucalyptus staigeriana* oil obtained by gas chromatography/mass spectrometry using a Hewlett-Packard 5971 GC/MS instrument

Component	Relative percentage
Limonene	72.91
Cineole	9.47
o-Cymene	4.59
p-Cymene	2.60
α -Terpinolene	2.24
Myrcene	1.68
L- α -Pinene	1.32
Vinyl 2-butenolate	1.32
α -Thujene	1.23
Propyl cyanide	0.64
Prenyl bromide	0.48
Total	98.48

Using the above methodology, all of the constituents were encapsulated in the chitosan matrix, resulting in a hydrogel with final concentration of 36.5% (w/w).

Haemonchus spp; *Oesophagostomum* spp; *Trichostrongylus* spp; *Cooperia* spp. were present on nematode natural infection. The adult nematodes recovered and identified were as follows: *H. contortus* and *Trichostrongylus axei* in the abomasum; *Trichostrongylus colubriformis* and *Cooperia* spp. in the small intestine; and *Oesophagostomum columbianum* and *Trichuris ovis* in the large intestine.

Table 2 contains the efficacy data for *E. staigeriana* encapsulated oil and ivermectin against the most prevalent gastrointestinal nematodes from the abomasum and small intestines, respectively, and on worm burden.

Table 2. Efficacy and mean of abomasal and small intestine nematodes and worm burden \pm standard error of sheep (n=6) treated with 365mg/kg of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil, 200 μ g/kg of ivermectin and 4% chitosan solution

Treatment		Abomasal nematodes	Small intestine nematodes	Worm burden
<i>E. staigeriana</i> encapsulated oil	Adult \pm S.E.	513 \pm 199a	597 \pm 111a	1151 \pm 183a
	Efficacy	83.75%	22.33%	60.79%
Ivermectin	Adult \pm S.E.	1,270 \pm 289b	357 \pm 159a	1506 \pm 270a
	Efficacy	35.00%	73.72%	48.70%
Chitosan	Adult \pm S.E.	2,567 \pm 954b	957 \pm 349a	2936 \pm 1240b
	Efficacy	-	-	-

Letters compare mean in the lines. Different letters indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Due to the small number of specimens, the worm burden of large intestine was not statistically analyzed. The highest efficacy of *E. staigeriana* encapsulated oil was against abomasal nematodes at 83.75%. The efficacy of the oil on nematodes from the abomasum was higher than the commercial drug ($P < 0.05$).

DISCUSSION

When tested previously, limonene was one of the main constituents of *E. staigeriana* oil, and its anthelmintic effect was demonstrated through *in vitro* and *in vivo* tests (Macedo et al., 2010). Thus, the encapsulation process was employed to test for an improvement in the efficacy due to higher liberation and absorption in the abomasum and longer exposure times of the worms to the encapsulated *E. staigeriana* oil.

Bioactive plants affect nematodes at various stages of their life by inhibiting their larval establishment (Brunet et al., 2008) and reducing epg counts (Hernández-Villegas et al., 2012), worm size (Martínez-Ortíz-de-Montellano et al., 2010) and worm burden (Camurça-Vasconcelos et al., 2008), but the identification of the role played by the plants' active components is usually

absent or incomplete. Such identification is necessary to understand the mechanisms of action of anthelmintic plants and their interactions with the elements that comprise the digestive luminal contents (Hoste et al., 2008).

The efficacy of 283 mg/kg of *L. sidoides* essential oil over five days was 43.7% against gastrointestinal nematodes (Camurça-Vasconcelos et al., 2008). *E. staigeriana* encapsulated oil efficacy was 60.79% with a single dose of 365 mg/kg. In addition to higher efficacy, the lower dosage and the single dosing is an important aspect for farmers since lower dosages reduces the cost and the time needed for administration.

Limonene, the major constituent of *E. staigeriana* encapsulated oil (72.9%) is likely responsible for its anthelmintic properties. This component has previously been shown to be responsible for the activity of an orange oil emulsion against *H. contortus* in gerbils and sheep. This oil (95% limonene) was 97.4% effective on fecal egg count reduction test, with a single dose of 600 mg/kg (Squires et al., 2010). It was also shown to have antimicrobial (Vuuren and Viljoen, 2007) and insecticidal activity (Santos et al., 2011). Furthermore, limonene derivatives have shown *in vitro* activity against *Leishmania (V.) braziliensis* and *Trypanosoma cruzi* (Graebin et al., 2010).

The results obtained in our controlled test demonstrated that *E. staigeriana* encapsulated oil was more effective against gastrointestinal nematodes (60.79%) than ivermectin (48.70%). It is noteworthy that the highest efficacy of *E. staigeriana* encapsulated oil was observed against abomasal nematodes which have high prevalence and intensity of infection (Costa et al., 2011), the target organ of *E. staigeriana* encapsulated oil. The activity of the oil against abomasal nematodes was probably improved by the encapsulation process with chitosan, which is a bioadhesive polymer that is used in drug delivery systems. The use of chitosan to target drugs to the gastrointestinal tract is supported by *in vivo* studies. Adhesion of the drug delivery system in the stomach offers various advantages: longer residence times of the dosage form on mucosal tissues, which improves absorption of the drug and increases drug bioavailability; enhancement of topical action; and finally, higher drug concentrations at the site of adhesion-absorption (Hejazi and Amiji, 2003). Similar results were not observed in nematodes from the small intestine ($P > 0.05$). In addition, it has been shown that the efficacy varies according to nematode species, particularly when they inhabit separate digestive organs (Hoste et al., 2008).

CONCLUSION

The mechanism of action of *E. staigeriana* encapsulated oil is unknown, but its anthelmintic activity has been demonstrated. Thus, these efficacy results suggest that an *E. staigeriana* hydrogel may be useful in small ruminant nematode control even in the case of resistant populations, particularly against abomasal nematodes.

Acknowledgements

The authors would like to thank PRODOC/CAPES and FUNCAP for financial support and CAPES for a scholarship. Dr. Bevilaqua and Dr. Camurça-Vasconcelos have grants from CNPq and CAPES, respectively.

REFERENCES

- Borgognoni, C.F., Polakiewicz, B., Pitombo, R. N. De M., 2006. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. Ciênc. Tecnol. Aliment. 26, 502-508.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explant. Int. J. Parasitol. 38, 783-790.
- Camurça-Vasconcelos, A.L.F.; Bevilaqua, C.M.L.; Morais, S.M.; Maciel, M.V.; Costa, C.T.C.; Macedo, I.T.F.; Oliveira, L.M.B.; Braga, R.R.; Silva, R.A.; Vieira L.S.; Navarro, A.M.C., 2008. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol., 154, 167-170.
- Costa, V.M.M., Simões, S. V.D., Riet-Correa, F. 2011. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 31, 65-71.
- Graebin, C. S., Madeir, M. de F., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U. Miguel, D.C., Uliana, S.R.B., Benitez, D., Cerecetto, H., González, M., da Rosa, R. G., Eifler-Lima, V.L., 2010. Synthesis and

in vitro activity of limonene derivatives against Leishmania and Trypanosoma. Eur. J. Med. Chem. 45, 1524-1528

Hejazi, R., Amiji, M., 2003. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. J. Control Release. 89, 151-165.

Hernández-Villegas, M.M., Borges-Argáez, R., Rodríguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F.J., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., 2012 In vivo anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. Vet. Parasitol. 189, 284-290.

Hoste, H.; Torres-Acosta, J. F.; Alonso-Díaz, M. Á.; Brunet, S.; Sandoval-Castro, C.; Adote, S. H., 2008. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. Trop. Biomed. 25, 56-72.

Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N., Davis, S.S., 2001. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. Adv. Drug Delivery Rev. 51, 81-96.

Kumar, M.N., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J., 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chem. Rev. 104, 6017-6084.

Leimann, F.V., 2008. Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 98 pp.

Macedo, I. T.F.; Bevilaqua, C M.L.; Oliveira, L.M.B.; Camurça-Vasconcelos, A.L.F.; Vieira, L.S.; Oliveira, F.R.; Queiroz-Junior, E.M.; Tomé, A.R.; Nascimento, N. R.F., 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 173, 93-98.

Martínez-Ortíz-De-Montellano, C.; Vargas-MagaNa, J. J.; Canul-Ku, H. L.; Miranda-Soberanis, R.; Capetillo-Leal, C.; Sandoval-Castro, C. A.; Hoste, H.; Torres-Acosta, J. F. J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Parasitol. 172, 283-290.

- Miller, C.M., Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Candy, P.M., Oliver, A-M.B., Watson, T.G., 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs C.M. Vet. Parasitol.186, 376-38.
- Oliveira, L.M.B., Bevilaqua, C.M.L., Macedo, I.T.F., Morais, S.M., Machado, L.K.A., Campello, C.C., Mesquita, M.A., 2011. Effects of *Myracrodruon urundeuva* extracts on egg hatching and larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. Parasitol. Res., 109, 893-898.
- Paula, H. C.B., Sombra, F. M., Cavalcante, R.F., Abreu, F.O.M.S., De Paula, R.C.M., 2011. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. Mater.Sci. Eng. C 31, 173-178.
- Roberts, F.H.S., O'Sullivan, P.J., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. Aust. J. Agric. Res. 1, 99-102.
- Santos, S.R.L., Melo, M.A., Cardoso, A.V., Santos, R.L.C., Sousa, D.P., Cavalcanti, S.C.H., 2011. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. Chemosphere. 84, 150-153.
- Simões, C.M.O. (Ed.), 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Brazil, 1102 pp.
- Squires, J.M.; Foster, J.G.; Lindsay, D.S.; Caudell, D.L.; Zajac, A.M., 2010. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. Vet. Parasitol., 172, p.95–99, 2010.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency, Tokyo.
- Vieira, L.S., 2008. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. Rev. Tecnol. Ciên. Agropec., 2, 49-56.
- Vuuren, S. F. van., Viljoen, A. M., 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. Flavour. Fragr. J. 22, 540-544.

Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58, 181-213.

7. CONCLUSÕES

O óleo encapsulado de *Eucalyptus staigeriana* foi efetivo no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos, em especial, contra parasitos do abomaso e mesmo em populações resistentes à ivermectina. Deste modo, pode ser adotado como alternativa no controle do parasitismo gastrintestinal pelos produtores de pequenos ruminantes.

8. PERSPECTIVAS

A partir desse trabalho confirmam-se as perspectivas da utilização do óleo encapsulado de *E. stageriana* no manejo do controle do parasitismo gastrintestinal de pequenos ruminantes, especialmente contra nematóides do abomaso. No entanto, é necessário aprimorar a formulação do hidrogel, mantendo os benefícios do encapsulamento e tornando sua administração prática a campo. Além disso, novos estudos devem ser realizados a respeito da farmacocinética e farmacodinâmica do hidrogel, assim como elucidar seu provável mecanismo de ação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIEC, J.; MARCINIACK, E. Microencapsulation of oil/matrix/water system during spray drying process. In: *DRYING 2004 – PROCEEDINGS OF THE 14th INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM*, v.C, p. 2043-2050, 2004.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology*, v. 120, n. 1-2, p. 91-106, 2004.

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, v.21 p.462-467, 2005.

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

AUGUSTIN, M.A.; ABEYWARDENA, M.Y.; PATTEN, G.; HEAD, R.; LOCKETT, A.; DE LUCA, A.; SANGUANSRI, L. Effects of microencapsulation on the gastrointestinal transit and tissue distribution of a bioactive mixture of fish oil, tributyrin and resveratrol. *Journal of Functional Foods*, Article in press, 2011.

BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; LOPES, D.C.F.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Microencapsulamento de hidrolisados de caseína em liposferas para mascarar o sabor amargo: avaliação físico-química e sensorial. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.38, p.361-370, 2002.

BOWMAN, D. D. *Georgis Parasitology for Veterinarians*. 8 ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. EUA. 422p., 2006.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G, BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.

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

- CEZAR, A.S.; BIANCHIN, J.B.C. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, v.38, p.2083-2091, 2008.
- CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilia. Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, p.247-253, 2002.
- CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, v. 13, p. 156-160, 2004.
- CHAGAS, A.C.S. Natural antiparasitics have potential to extend product life. *Animal Pharm.*, Londres, p. 12-13, 12 dez. 2008
- COLES, G. C.; BAUER, F. H. M.; BORGSTEEDE, S.; GREERTS, S.; KLEI, M. A.; WALLER, P. J. 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.*, v. 44, p. 35-44, 1992.
- DENKBAS, E. B.; KILIÇAY, E.; BIRLIKSEVENB, C.; ÖZTÜRK, E. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. *Reactive & Functional Polymers*, v.50, p.225–232, 2002.
- FISHER, K.; ROWE, C.; PHILLIPS, C.A. The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, v.44, p.495-499, 2007.
- GEORGE, D.R.; MASIC, D.; SPARAGANO, O. A. E.; GUY, J. H. Variation in chemical composition and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* of four eucalyptus essential oils. *Experimental & Applied Acarology*, v.48, p.43-50, 2008.
- GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, v.119, p.731-737, 2010.
- GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, v.139, p. 308-320, 2006.

GRAEBIN, C.S.; MADEIRA, M.F.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; MIGUEL, D.C.; ULIANA, S.R.B.; BENITEZ, D.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; GOMES DA ROSA, R.; EIFLER-LIMA, V.L. Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against Leishmania and Trypanosoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.45 p.1524–1528, 2010.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v.89, p.151–165, 2003.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.; ALONSO-DIAZ, M.Á.; BRUNET, S.; SANDOVAL-CASTRO, C.; ADOTE, S.H. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Tropical Biomedicine*, v. 25, p.56-72, 2008.

HOSTE, H.; SOTIRAKI, S.; TORRES-ACOSTA, J.F.J. Control of endoparasitic nematode infections in goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* v. 27 p.163-173, 2011.

JACKSON, F.; MILLER, J. Alternative approaches to control- Quo vadit? *Veterinary Parasitology*, v.139, p.371-384, 2006.

JUN-XIA, X; YANG JIAN, Y. H.-Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, v. 125, p. 1267–1272, 2011.

KAST, C.E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated polymers - thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan–thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*, v.22, p.2345–2352, 2001.

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

LEE, S.; PETERSON, C.J.; COATS, J.R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, v. 39, p. 77-85, 2003.

LEIMANN, F.V., Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples. 98f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LISONBEE, L. D.; VILLALBA, J. J.; PROVENZA, F. D. Tannins and self-medication: implications for sustainable parasite control in herbivores. *Behaviour Processes*, v. 82, p. 184-189, 2009.

- MACEDO, I.T.F. Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre nematóides gastrintestinais. 87f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.
- MACEDO, I. T.F.; BEVILAQUA, C M.L.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; OLIVEIRA, F.R.; QUEIROZ-JUNIOR, E.M.; TOMÉ, A.R.; NASCIMENTO, N. R.F. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, v.173, p.93-98, 2010.
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; SILVA, R.A.; BARROS, R.S.; SOUSA, R.N.; SOUSA, L.C.; BRITO, E.S.; SOUZA-NETO, M.A. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*, v.167, p. 1–7, 2010.
- MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of Southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, v.119, p. 559-574, 2008.
- MELO, A. C. F. L., REIS, I. F., BEVILAQUA, C. M. L., VIEIRA, L. S., ECHEVARRIA, F. A. M., MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 33, p. 339-344, 2003.
- MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L.; REIS, I.F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semi-árido nordestino brasileiro. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, p. 294-300, 2009.
- OLIVEIRA, L. M. B.; BEVILAQUA, C.M.L.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; BARROS, R.S.; RODRIGUES, A.C.M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; LIMA, Y.C.; VIEIRA, L.S.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, v.159, p.55-59, 2009.
- PARK, J.H.; SARAVANAKUMAR, G.; KIM, K.; KWON, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, p.28–41, 2010.
- PEREIRA, L.G.B.; FERNANDES, J.B.; CÔRREA, A.G.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C. Electrophysiological responses of eucalyptus brown looper *Thyrinteina arnobia* to essential oils of seven *Eucalyptus* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, 2006.
- RÉ, M.I. Microencapsulamento em busca de produtos “inteligentes”. *Ciência Hoje*, v.27, p. 24-29, 2000.

- SALARI, M.H.; AMINE, G.; SHIRAZI, M.H.; HAFEZI, R.; MOHAMMADYPOUR, M. Antibacterial effects of Eucalyptus globules leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. *Clinical Microbiology and Infection*, v.12, p. 178-196, 2006.
- SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.16, p.26-30, 2000.
- SANTOS, S.R.L.; MELO, M. A.; CARDOSO, A.V.; SANTOS, R.L.C.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*, v.84, p.150–153, 2011.
- SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.274, p.1–33, 2004.
- SQUIRES, J.M.; FOSTER, J.G.; LINDSAY, D.S.; CAUDELL, D.L.; ZAJAC, A.M. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. *Veterinary Parasitology*, v.172, p.95–99, 2010.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, v.7, p.12-20, 2006.
- TAYLOR, M.A., HUNT, K. R., GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, v. 103, p. 183-194, 2002.
- TORRES-ACOSTA, J.F.J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, v.77, p.159–173, 2008.
- URQUHART, G.M.; JARMOUR; DUNCAN, J.L; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.18, 1998.
- VALDERRÁBANO, J.; DELFA, R.; URIARTE, J. Effect of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. *Veterinary Parasitology*, v. 104, p. 327-338, 2002.
- VAN WYK, J.A., HOSTE, H., KAPLAN, R.M., BESIÉ, R.B. Targeted selective treatment for worm management—how do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology*, v. 139, p. 336-346, 2006.

- VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v.2, p. 49-56, 2008.
- VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de eucalipto (Documentos florestais). Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, v.17, 2003.
- VUUREN, S.F.VAN; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, v.22, p.540–544, 2007.
- WALLER, P.J. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology*, v.139, p.1-14, 2006.
- WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE, J. B.; PANKAVICH, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M. AND VERCROYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*. v. 58, p. 181-213, 1995.
- YANG, P., MA, Y., ZHENG, S., Adulticidal Activity of Five Essential Oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Journal of Pesticide Science* v.30, p.84-89, 2005.
- ZAJAC, A.M. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: Life cycles, anthelmintics and diagnosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Practice*, v. 22: p. 529-541, 2006.
- ZHENG, L.; DING, Z.; ZHANG, M.; SUN, J. Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *Journal of Food Engineering*, v.104, p.89–95, 2011.