

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

IARA TERSIA FREITAS MACEDO

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Eucalyptus spp SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS**

FORTALEZA-CE
2008

IARA TERSIA FREITAS MACEDO

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp
SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS**

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: Reprodução e Sanidade Animal
Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientador (a): Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

FORTALEZA-CE

2008

IARA TERSIA FREITAS MACEDO

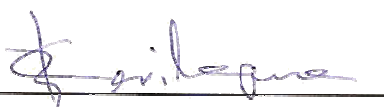
**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp
SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS**

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 19 / 12 / 2008


Nota: 10,0

Banca Examinadora:

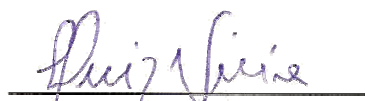


Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

Orientadora-UECE



Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo
Examinadora-UFPI



Luiz da Silva Vieira
Examinador-EMBRAPA

Aos meus pais,
Antônio Albuquerque de Macedo e
Adeilza Freitas de Carvalho;
À Deus

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua grande misericórdia me guiando e dando forças em mais esta etapa da minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro durante estes dois anos de trabalho.

À EMPRAPA/ Caprinos que gentilmente cedeu às instalações fundamentais para realização deste trabalho.

À professora Dra. Cláudia Maria Leal Bevilaqua por ter me ensinado e acompanhado durante todo esse período, pelo incentivo, paciência e acima de tudo, amizade e orientação.

Ao Dr. Luiz Vieira pelos ensinamentos e ajuda para a realização do projeto.

Aos professores Dra. Adriana da Rocha Tomé e Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento pela ajuda e colaboração que foram importantes para a concretização deste trabalho.

À Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo pela colaboração na defesa da dissertação.

À todos os meus companheiros do Laboratório de Doenças Parasitárias - PPGCV, que contribuíram para realização deste projeto e estiveram ao meu lado durante este período, Maria Vivina Barros Monteiro, Michelline do Vale Maciel, Fernanda Cristina Macedo Rondon, Rafaella Albuquerque e Silva, Marina Parissi Accioly, Vitor Luz Carvalho, Aline Araguão, Ana Carolina Moura Rodrigues, Camila de Albuquerque Almeida. Em especial, Ana Lourdes Camurça Fernandes Vasconcelos, Cícero Temístocles Coutinho Costa, Roberta da Rocha Braga, Fabrício Rebouças de Oliveira, Eudson Maia de Queiroz Júnior, Renata Simões Barros, Bruno Granjeiro Portela, cuja ajuda foi de fundamental importância para a realização desse trabalho.

Às minhas amigas Lorena Mayana Beserra de Oliveira e Sthenia Santos Albano Amóra, pela amizade, companheirismo e principalmente paciência, me ajudando em todos os momentos do trabalho, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos estagiários e funcionários do Laboratório de Parasitologia da EMBRAPA/Caprinos pela atenção e colaboração, especialmente a Helena Araújo da Ponte e Felipe Cavalcante Machado.

À Adriana Maria Sales Albuquerque e Ana Cristina Sabóia Nascimento, secretárias do PPGCV, que em muito me ajudaram durante todo o mestrado.

À minha família que sempre me apoiou, principalmente nos momentos difíceis da realização deste trabalho, em especial a meu pai e minha mãe, exemplo de dedicação;

Aos meus irmãos, pelo companheirismo e pela amizade que nos une.

Ao meu namorado, pelo amor ,carinho e compreensão.

E por fim, as demais pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente em mais uma etapa do caminho da minha realização profissional.

RESUMO

O parasitismo por nematóides gastrintestinais representa um dos principais problemas para a produção de ovinos e caprinos. Plantas com atividade anti-helmíntica vêm sendo pesquisadas como uma alternativa de controle destes parasitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* (OEEC), *E. staigeriana* (OEES) e *E. globulus* (OEEG) sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Os óleos foram avaliados através dos testes de eclosão de ovos e de desenvolvimento larvar sobre *Haemonchus contortus*. Identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada através da análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. OEEC e OEES foram submetidos aos testes de toxicidade aguda e subaguda utilizando animais de laboratório. A avaliação da atividade anti-helmíntica *in vivo* do OEEC e OEES foi realizada inicialmente sobre parasitos intestinais de camundongos e posteriormente sobre nematóides gastrintestinais de caprinos. As concentrações efetivas sobre ovos e larvas foram 10,6 e 2,65 mg ml⁻¹; 5,4 e 2,7 mg ml⁻¹ e 43,5 e 21,75 mg ml⁻¹, para OEEC, OEES e OEEG, respectivamente. A análise química revelou como principais componentes o citronellal no OEEC, o limoneno no OEES e o cineol no OEEG. No teste de toxicidade aguda a DL50 para o OEEC e OEES foi de 4153 e 4112,9 mg kg⁻¹, respectivamente. Os testes de toxicidade subaguda com OEEC e OEES não revelaram alterações que indicassem toxicidade. A dose de 500 mg kg⁻¹ dos óleos OEEC e OEES tiveram eficácia de 69% e 86,3% na redução da carga parasitária de camundongos e de 58% e 59% na redução da eliminação de ovos nas fezes de caprinos infectados com nematóides gastrintestinais. Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. staigeriana* demonstraram efeito promissor sobre o controle de nematóides gastrintestinais de caprinos.

Palavras-chave: Fitoterapia. *In vivo*. *In vitro*. Toxicidade. *Haemonchus contortus*

ABSTRACT

Gastrointestinal parasites represent one of the main problems for sheep and goat production. Plants with anthelmintic activity are being researched as one alternative of control of these parasites. The objective of this work was to evaluate the anthelmintic activity of *Eucalyptus citriodora* (EcEO), *E. staigeriana* (EsEO) and *E. globulus* (EgEO) essentials oils on small ruminant gastrointestinal nematodes. The oils were evaluated through egg hatching and larval development inhibition test against *Haemonchus contortus*. Essential oils constituents' identification was performed by gas chromatography coupled mass spectrometry. EcEO and EsEO were submitted by acute and subacute toxicity tests using laboratory animals. The assessment of *in vivo* anthelmintic activity of EcEO and EsEO was accomplished initially on mice intestinal parasites and after on goat gastrointestinal nematodes. The effective concentrations on eggs and larvae were 10.6 and 2.65 mg ml⁻¹; 5.4 and 2.7 mg ml⁻¹ and 43.5 and 21.75 mg ml⁻¹, to EcEO, EsEO and EgEO, respectively. Chemical analysis revealed as main components the citronellal to EcEO, limonene to EsEO and cineol to EgEO. DL50 of acute toxicity to EcEO and EsEO were 4153 and 4112.9 mg kg⁻¹, respectively. No alterations were found in the subacute toxicity test with EcEO and EsEO that indicating toxicity. In dose of 500 mg kg⁻¹ EcEO and EsEO, the efficacy was 69% and 86.3% on reduction of mice worm burden and efficacy of 58% and 59% on reduction elimination eggs in fecal of goat infected by gastrointestinal nematodes. The essentials oils of *E. citriodora* and *E. staigeriana* showed effect on control of gastrointestinal nematodes goat

Keywords: Phytotherapy. *In vivo*. *In vitro*. Toxicity. *Haemonchus contortus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA. 1. Flores e folhas de <i>Eucalyptus globulus</i>	17
FIGURA 2. Folhas de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	18
FIGURA 3. Flores e folhas de <i>Eucalyptus citriodora</i>	19

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Eficácia média \pm erro padrão do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*. 31

Tabela 2. Eficácia média \pm erro padrão do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* na inibição do desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*. 32

CAPITULO II

Table 1. Mean percentage efficacy \pm standard error of *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus* egg hatching (EHT) and larval development (LDT). 45

Table 2. Effect of 300 mg kg⁻¹ *Eucalyptus staigeriana* essential oil (mean \pm SE) on hematological parameters on rats (n=10) treated during 30 days. 46

Table 3. Effect of 300 mg kg⁻¹ *Eucalyptus staigeriana* essential oil (mean \pm SE) on biochemical parameters of rats (n=10) treated during 30 days. 46

Table 4. Mean efficacy (\pm SE) of *Eucalyptus staigeriana* essential oil and febendazole based on worm burden reduction of mice intestinal nematodes. 47

Table 5. Mean efficacy and epg (\pm SE) of *Eucalyptus staigeriana* essential oil and ivermectin based on fecal egg count reduction test in goats. 48

CAPITULO III

Table 1. Mean percentage efficacy \pm standard error of *Eucalyptus citriodora* essential oil on *Haemonchus contortus* egg hatching (EHT) and larval development (LDT). 65

Table 2. Mean \pm SE of hematological parameters on rats (n=10) treated with 400 mg kg⁻¹ *Eucalyptus citriodora* essential oil over 30 days. 65

Table 3. Effect (mean \pm SE) of 400 mg kg⁻¹ *Eucalyptus citriodora* essential oil on biochemical parameters of rats (n=10) treated during 30 days. 66

Table 4. Mean efficacy (\pm SE) of *Eucalyptus citriodora* essential oil and febendazole based on worm burden reduction of mice intestinal nematodes. 66

Table 5. Mean efficacy and epg (\pm SE) of 500 mg kg⁻¹ *Eucalyptus citriodora* essential oil and 0.2 mg kg⁻¹ ivermectin based on fecal egg count reduction test in goats. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT-alanine aminotransferase

AST-aspartate aminotransferase

CE₅₀/EC₅₀ - Concentração efetiva p/ inibir 50% de eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas/Effective concentration to inhibit 50% of egg hatching and larval development

DL₁₀/LD₁₀ - Dose letal para 10% dos camundongos/Letal dose to kill 10% of the mice

DL₅₀/LD₅₀ - Dose letal para 50% dos camundongos/Letal dose to kill 50% of the mice

Dp/sd – Desvio padrão/ Standart Deviation

EP/SE – Erro padrão/ Standart error

FECRT – Teste de redução da contagem de ovos nas fezes

Hb- Hemoglobin concentration

Ht- Hematocrit

Kg/g/mg - Kilograma/Grama/Miligrama

l/ml/µl – Litro/Mililitro/Microlitro

MCHC-Mean corpuscular hemoglobin concentration

MCV- Mean corpuscular volume

MHC- Mean corpuscular hemoglobin

OEEC/EcEO- Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*/ *E. citriodora* essential oil

OEEG/EgEO- Óleo essencial de *Eucalyptus globulus*/ *E. globulus* essential oil

OEEs/EsEO - Óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*/ *E. staigeriana* essential oil

OPG/EPG – Ovos por grama de fezes/ Egg counts per gram of feces

Plt-Platelets

RBC -Red blood cell count

TDL/LDT – Teste de desenvolvimento larvar/ Larval development test

TEO/EHT – Teste de eclosão de ovos/ Egg hatching test

WBC- White blood cell count

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	8
LISTA DE TABELAS -----	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS -----	10
1) INTRODUÇÃO -----	12
2) REVISÃO DE LITERATURA -----	13
2.1) Plantas Medicinais -----	13
2.2) Plantas com atividade anti-helmíntica -----	14
2.3) <i>Eucalyptus</i> spp -----	16
2.3.1) <i>Eucalyptus globulus</i> -----	16
2.3.2) <i>Eucalyptus staigeriana</i> -----	17
2.3.3) <i>Eucalyptus citriodora</i> -----	18
2.3.4) Óleos essenciais -----	19
2.3.5) Potencial uso <i>do Eucalyptus</i> spp-----	21
3) JUSTIFICATIVA -----	23
4) HIPÓTESE CIENTÍFICA -----	24
5) OBJETIVOS -----	25
6) CAPÍTULO I -----	26
7) CAPÍTULO II -----	38
8) CAPÍTULO III -----	57
9) CONCLUSÕES -----	75
10) PERSPECTIVAS -----	76
11) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	77

1. INTRODUÇÃO

Os nematóides gastrintestinais são um dos fatores limitantes para a produção de caprinos e ovinos em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais, onde os prejuízos econômicos são mais acentuados, acarretando atraso no crescimento, baixa produção leiteira, perda de peso e mortalidade (GASBARRE et al., 2001; GITHIGIA et al., 2001).

Anti-helmínticos têm sido desenvolvidos e empregados para controlar as nematodeoses e reduzir as perdas devido ao parasitismo. No entanto, o uso intenso e inadequado destes produtos tem favorecido o desenvolvimento de populações de nematóides resistentes, sendo um dos mais importantes e atuais problemas no controle de parasitos (MELO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007).

Além da resistência, as drogas anti-helmínticas disponíveis no comércio possuem desvantagens como alto custo, resíduos nos alimentos (WALLER, 2006), risco de poluição ambiental (HAMMOND et al., 1997) e redução da eficiência na produção de ovinos e caprinos devido à baixa eficácia. Considerando esses problemas, a fitoterapia vem sendo pesquisada como alternativa para auxiliar o controle das parasitoses gastrintestinais de pequenos ruminantes (VIEIRA, 2008).

O uso de plantas como medicamento é uma prática bastante difundida pela população, porém sem comprovação do nível de segurança e da atividade biológica (BARBOZA et al., 2007). Entretanto, é importante lembrar que o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados têm como etapa inicial obrigatória a sua validação pela pesquisa, envolvendo vários testes que visam confirmar a eficácia bem como determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos (RATES, 2001).

Muitas espécies do gênero *Eucalyptus* são usadas na medicina popular brasileira como analgésicos, antiinflamatórios e para sintomas de infecções respiratórias (SILVA et al., 2003). O eucalipto é uma das árvores mais plantadas no mundo sendo amplamente cultivado no Brasil. Já foi observada eficácia de uma espécie de eucalipto sobre nematóides de ruminantes, criando a expectativa sobre possível atividade de outras espécies deste gênero contra endoparasitos gastrintestinais (BENNET-JENKINS e BRYANT, 1996).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O emprego de vegetais como medicamentos foi uma das primeiras manifestações do esforço do homem em compreender e utilizar a natureza. As plantas medicinais são matéria prima de origem vegetal utilizadas para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou para alterar seu processo fisiológico e patológico (RATES, 2001). O conhecimento tradicional sobre sua utilização vem sendo adquirido pelas comunidades ao longo de muitos anos e transmitido verbalmente através das gerações (BARBOZA et al., 2007).

As primeiras drogas puras foram obtidas de plantas, que continuam a servir como fonte de novas e valiosas opções (THOMPSON, 1996). Atualmente relata-se que aproximadamente 25% das drogas prescritas mundialmente provêm de plantas, havendo 121 compostos ativos em uso corrente (RATES, 2001). Neste contexto, o Brasil ganha destaque, pois apresenta grande biodiversidade de espécies vegetais, o que constitui uma de suas maiores riquezas e uma possível fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (OMENA et al., 2007). Entretanto, menos de 10% dessa diversidade foi avaliada em relação as suas características biológicas e pouco menos de 5% foi submetida à análise fitoquímica (LUNA et al., 2005).

As plantas são produtoras de substâncias químicas que podem ser úteis no tratamento de uma grande variedade de doenças em homens e animais (McGAW e ELOFF, 2008). Seus compostos ativos podem ser originados 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 freqüentemente em sementes e órgãos de armazenamento e são necessários para o desenvolvimento fisiológico, já que possuem papel importante no metabolismo celular básico (CHAGAS, 2004a). Os metabólitos secundários são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários. Freqüentemente têm um papel ecológico, como: atrativos para polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou defensores químicos contra microrganismos, insetos e predadores superiores. As atividades biológicas das plantas medicinais são freqüentemente atribuídas aos seus

metabólitos secundários, como exemplos da sua utilidade comercial têm a nicotina, a morfina, a cocaína e os óleos de eucalipto (CHAGAS, 2004a).

Diversas doenças têm sido alvos de pesquisas que envolvem plantas, muitas destas afetam os animais de produção, com destaque para os nematóides gastrintestinais, considerados como uma das principais causas de redução na produtividade de ruminantes em todo o mundo (VIEIRA, 2008). Com a evolução da ciência intensificaram-se os estudos sobre as plantas medicinais utilizadas popularmente, relacionando sua composição química com seus efeitos (FRANCO, 2005), sendo indispensável a validação científica das plantas para a aceitação da sua utilização (MAKKAR et al., 2007).

2.3 Plantas com atividade anti-helmíntica

Uma variedade de plantas tem sido utilizada tradicionalmente para tratar doenças parasitárias que acometem os animais de produção. Embora a maioria das evidências da propriedade terapêutica seja baseada em relatos populares, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de investigar e comprovar a atividade anti-helmíntica de plantas (ATHANASIADOU et al., 2007). Entretanto, para aceitação de uma planta como anti-helmíntico pela medicina científica, é necessário que a eficácia seja avaliada e confirmada, assim como deve ser garantida que sua administração a organismos vivos ocorra sem riscos para saúde através do processo de validação científica (McGAW e ELOFF, 2008).

A primeira etapa no processo de validação científica é a seleção da planta a ser testada através de levantamento dos dados de literatura, incluindo identificação botânica e dados sobre o uso popular (parte da planta usada, forma de administração, doses e tempo de tratamento). Posteriormente, são necessários testes *in vitro* para avaliar a provável propriedade anti-helmíntica da planta através da observação do seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento ou motilidade de larvas. Estes são testes de triagem com as plantas, seus extratos ou óleos essenciais para escolha dos mais promissores, apresentando como vantagem a possibilidade de medir a eficácia, simultaneamente, de vários compostos, além da rapidez, simplicidade e baixo custo (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004). Como exemplos, testes com 0,5% do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e 1,33 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de *Ocimum gratissimum* apresentaram 100% de ação ovicida sobre *Haemonchus contortus* (KETZIS et al. 2002; PESSOA et al., 2002). O extrato acetato de etila das folhas

de *Azadirachta indica* na concentração de 50 mg ml⁻¹ inibiu em 51,31% a eclosão dos ovos e em 68,10% o desenvolvimento larvar de *H. contortus* (COSTA et al., 2008).

A seguir realizam-se os testes *in vivo* através estudos toxicológicos inicialmente em animais de laboratório para determinação da margem de segurança da planta em organismos vivos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Estes testes permitem determinar os possíveis efeitos decorrentes da exposição a determinadas substâncias (BARROS e DAVINO, 2003) que podem ser avaliados após 24 horas da administração, toxicidade aguda, ou após administrações em doses repetidas, toxicidade sub-crônica e crônica. Após a detreminação da margem de segurança, a planta é submetida a testes pré-clínicos de eficácia para avaliação da atividade anti-helmíntica em animais de laboratório. Estes testes possibilitam uma estimativa de doses para o uso terapêutico da planta na espécie alvo (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006). Em estudo usando camundongos naturalmente infectados com nematóides *Syphacia obvelata* e *Aspicularis tetraptera* observou-se que 800 mg kg⁻¹ de óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* e 240 mg kg⁻¹ de extrato de *Punica granatum* apresentaram eficácia de 46%, 11% e 67%, respectivamente na redução da carga parasitária (MICHELIN et al., 2005; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

A última etapa de uma pesquisa sobre a atividade de plantas medicinais são testes de eficácia anti-helmíntica realizados na espécie alvo, devido à laboriosidade, alto custo e necessidade de utilização de um grande número de animais (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). São considerados mais confiáveis e devem ser realizados com animais natural ou experimentalmente infectados (GITHIORI et al., 2006). Os ensaios mais utilizados são o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) (COLES et al., 1992) e o teste controlado (WOOD et al., 1995). Por exemplo, 0,90 g kg⁻¹ do extrato aquoso de *Coriadrum sativum* promoveu uma redução de 24,49% no número de ovos por grama de fezes (OPG) de ovinos após dois dias de tratamento (EGUALE et al., 2007). O extrato etanólico de *Spigelia anthelmia* na concentração de 500 mg kg⁻¹ reduziu em 76% o OPG de ovinos nove dias após o tratamento (ADEMOLA et al., 2007), e a administração de 283 mg kg⁻¹ de óleo essencial de *L. sidoides* causou redução de 54% no OPG de ovinos 13 dias após o tratamento (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

Estes resultados demonstram boas possibilidades da utilização de plantas no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

2.3 *Eucalyptus* spp

Eucalipto (do grego = "verdadeira cobertura") é a designação genérica das várias espécies vegetais do gênero *Eucalyptus*, família Myrtaceae, nativas da Austrália, amplamente cultivadas em áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, existe grande área plantada com eucalipto, cobrindo uma área de mais de três milhões de hectares (PEREIRA et al., 2006; SALARI et al., 2006). São, em termos gerais, árvores, em alguns raros casos, arbustos, que apresentam copa geralmente rala e alongada e o tronco quase sempre retilíneo e cilíndrico. As folhas possuem a característica comum, entre a maioria das espécies, o fato de serem aromáticas e dispostas nos ramos de maneira oposta na parte inferior e alternas na parte superior. Os frutos são constituídos por cápsulas lenhosas deiscentes com sementes muito pequenas. As flores geralmente são melíferas, contribuindo para a produção de mel de abelha (BAKKALI et al., 2008).

O gênero *Eucalyptus* é composto de espécies de múltiplos usos, podendo sua madeira ser utilizada como combustível para siderurgia, indústria de móveis, na construção civil, como postes, na produção de celulose, mel, e, suas folhas serem utilizadas para extração de óleos essenciais usados na fabricação de produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e medicamentos (VITTI e BRITO, 2003). Existem mais de 600 espécies e variedades, das quais 20 têm sido exploradas comercialmente e menos de 12 têm importância econômica no mercado mundial de óleos essenciais (FRANCO, 2005). No Brasil, as principais espécies de eucalipto exploradas para a produção de óleo essencial são: *E. globulosus*, *E. staigeriana* e *E. citriodora*.

2.3.1 *Eucalyptus globulus*

E. globulus é uma árvore frondosa e de grande porte que mede até 60 m de altura. Sua casca lisa branco-cremosa vai se renovando ao longo do tempo; a folhagem juvenil é ovalada e de coloração prata-azulada. As folhas adultas são brilhantes, têm formato de foice e medem até 25 cm de comprimento (FIGURA 1) e são cultivadas para extração de óleo essencial medicinal. A madeira desta espécie é usada apenas como lenha, apesar das referências favoráveis para a produção de celulose e papel (VITTI e BRITO, 2003).



FIGURA 1. Folhas e flores de *Eucalyptus globulus*

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eucalyptus_globulus...

Seus principais constituintes obtidos por cromatografia gasosa são 1,8-cineol ou eucalyptol (85,84%), alfa-pineno (9,93%), gama-terpineno (1,24%), beta-mirceno (1,23%), beta-pineno (0,88%), 1-felandreno (0,56%) e alfa-terpinoleno (0,32%) (CHAGAS et al., 2002). Existem relatos da atividade do eucaliptol sobre as bactérias *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CARSON e RILLEY, 1995; CHA et al., 2007), os fungos *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *Pyrenophora graminea* (TERZI et al., 2007) e os coleopteros *Tribolium castanaeum* (TRIPATHI et al., 2001; STAMOPOULOS et al., 2007), *Sitophilus oryzae* e *Rhyzopertha dominica* (LEE et al., 2004). O eucaliptol também apresentou atividade *in vitro* sobre larva do nematóide *Anisakis simplex* (NAVARRO et al., 2008).

2.3.2 *Eucalyptus staigeriana*

E. staigeriana é uma árvore de tamanho médio, podendo chegar a 22 m de altura, com copa reduzida e espalhada. As folhas (FIGURA 2) apresentam cheiro característico cítrico, proveniente do seu principal componente, o citral. Está adaptada a zonas climáticas quentes e subúmidas, a solos pobres e bem drenados, matas ou florestas

abertas. Sua cultura é destinada basicamente à obtenção de óleos essenciais para perfumaria sendo a madeira vendida como lenha (VITTI e BRITO, 2003).



FIGURA 2. Folhas de *Eucalyptus staigeriana*

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Eucalyptus_staigeriana

Seus principais constituintes obtidos por cromatografia gasosa são dl-limoneno (24,78%), E-citral (14,99%), Z-citral (11,36%), alfa-terpinoleno (10,78%), acetato de geranila (7,61%), 1-felandreno (3,32%), alfa-pineno (3,37%), gama-terpinemo (2,36%), beta-pineno (2,30%), beta-mirceno (0,97%), entre outros em menor percentual (CHAGAS et al., 2002). Estudos têm sido realizados com seu principal constituinte, citral, reportando atividade sobre insetos *Culex pipiens* (LEE et al. 2003; YANG et al., 2005), sobre bactérias e fungos (FISHER et al., 2007; YAMASAKI et al., 2007), sobre os fitonematóides *Bursaphelenchus xylophilus* e *Meloidogyne incognita* (BAUSKE et al., 1994; CHOI et al., 2007), bem como sobre larvas do nematóide *A. simplex* (HIERO et al., 2006).

2.3.3 *Eucalyptus citriodora*

Conhecida popularmente como eucalipto limão é uma árvore de porte médio, com casca áspera e pulverulenta de coloração branca, às vezes rosa ou vermelha e folhas juvenis lanceoladas. A folhagem adulta é lisa (FIGURA 3), estreita e mais longa que a

juvenil. Todas as partes contêm forte aroma de limão. É utilizada para produção de carvão vegetal, postes, madeira para serraria, como lenha, sendo mais cultivado para obtenção de óleo essencial para perfumaria (VITTI e BRITO, 2003).



FIGURA 3. Folhas e flores de *Eucalyptus citriodora*

Fonte: http://www.pbase.com/yvonneii/gum_blossoms

Seus constituintes obtidos por cromatografia gasosa são: acetato de citronelila (2,61%), trans-cariofileno (2,49%) e o principal constituinte citronelal (94,9%), (CHAGAS et al., 2002). O metabólito secundário citronelal é usado em perfumaria, detergentes e como repelentes de insetos. Estudos com citronelal mostraram atividade inseticida sobre *Musca domestica* (LEE et al., 2003) e larvas da mosca *Lucilia sericata* (SILVA, et al., 2007), além de atividade sobre o fitonematóide *Bursaphelenchus xylophilus* (CHOI et al., 2007).

2.3.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de eucalipto são compostos formados por uma complexa mistura de diferentes concentrações de componentes orgânicos voláteis, e apresentam grupos químicos como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. A grande maioria, no entanto, é constituída de terpenos complexos, que constituem uma grande variedade de substâncias vegetais derivadas de unidades do isopreno. Os compostos

terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (90 % dos óleos) e os sesquiterpenos (SALGADO et al., 2003).

Os monoterpenos são metabólitos secundários que podem causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas dos parasitos, apresentando a vantagem de, na maioria das vezes, serem pouco tóxicos para os mamíferos (RICE e COATS, 1994). Alguns monoterpenos têm sido considerados como alternativas aos produtos comerciais sintéticos, sendo utilizados como condimentos artificiais, perfumes (TEMPLETON, 1998) e em formulações de expectorantes, descongestionantes, analgésicos externos e anti-sépticos (WINDHOLZ et al., 1998).

Os óleos de eucalipto ocorrem, principalmente, nas folhas, onde são produzidos em pequenas cavidades globulares, chamadas glândulas. Existem vários fatores que podem exercer influência na variação da composição desses óleos. Os mais típicos são a variabilidade genética, a idade das folhas, as condições ambientais, o tipo de manejo florestal, os métodos utilizados para amostragem das folhas, os processos de extração e de análise do óleo (CIMANGA et al., 2002; BAKKALI et al., 2008).

A ação dos óleos essenciais está relacionada com a sua volatilidade, pois, por meio dessa característica, agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como arma de defesa contra o reino animal. Eles já foram considerados como repelentes de insetos que se alimentavam de suas folhas, inibidores da germinação e de crescimento de outras plantas, controladores da atividade microbiológica de alguns fungos e bactérias, atrativos de polinizadores, proteção contra a perda de água e aumento de temperatura entre outros (FRANCO, 2005).

Em função do seu uso final, os óleos essenciais de eucalipto podem ser divididos em três grupos: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumaria (VITTI e BRITO, 2003). Óleos medicinais são aqueles que apresentam como componente principal o cineol e são destinados à fabricação de produtos farmacêuticos como inalante, estimulantes de secreção nasal, produtos de higiene bucal, dentre outros. A principal espécie produtora deste óleo no Brasil é *E. globulus*. Os óleos industriais têm como componentes principais o felandreno, que é usado como solvente e matéria-prima na produção de desinfetantes e desodorizantes e o mentol usado como aromatizante de produtos medicinais. E os óleos de perfumaria fazem parte da composição de perfumes, sendo mais usados nos produtos de limpeza, *E. citriodora* é a principal espécie cultivada

no Brasil para a produção deste tipo de óleo, seguida pela espécie *E. staigeriana* (VITTI e BRITO, 2003).

2.3.5 Potencial uso do *Eucalyptus* spp

Muitas espécies do gênero *Eucalyptus* são usadas na medicina popular brasileira para uma variedade de condições medicinais. Os óleos essenciais de eucalipto são também amplamente empregados como cosméticos, em alimentos e na indústria farmacêutica (SILVA et al., 2003). O efeito biológico do óleo pode ser resultado do sinergismo de todas as moléculas ou somente da ação do principal componente presente em níveis mais altos.

Vários trabalhos foram realizados demonstrando efeitos das espécies de *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* sobre vários organismos.

O extrato aquoso das folhas secas de *E. citriodora* é tradicionalmente usado como analgésico, antiinflamatório, antipirético e para tratar infecções respiratórias (BAKKALI et al., 2008). O óleo essencial de *E. citriodora* apresentou atividade inibitória sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli* (ESTANISLAU et al., 2001), os fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. sublineolum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria triticina*, *A. alternata* e *Rhizoctonia solani* (RAMEZANI et al., 2002; BONALDO et al., 2007), os insetos coleópteros *Acanthoscelideos obtectus* (MAZZONETTO e VENDAMIM, 2003). Esse óleo também apresentou atividade tóxica *in vitro* sobre as larvas do fitonematóide *Meloidogyne incognita* (PANDEY et al., 2000).

E. globulus é uma erva aromática, estimulante, descongestionante e expectorante, relaxa espasmos e diminui febre. É usada externamente em inalações para bronquite, sinusite, resfriados e gripe; para contusões e dores musculares; em feridas e abscessos. O uso do óleo essencial de *E. globulus* apresenta múltiplas aplicações medicinais, incluindo atividade antiinflamatória, analgésica (SILVA et al., 2003) e antioxidante (CRUZ et al., 2005). Estudos demonstraram atividade desse óleo sobre bactérias e fungos (NAVARRO et al., 1996; TAKAHASHI et al., 2004; SALARI et al., 2006), sobre o carrapato *Boophilus microplus* (CHAGAS et al., 2002), bem como atividade inseticida sobre *M. domestica* (MORSY e HALIM, 2005), *Pediculus humanus capitis* (YANG et al., 2004), além do coleóptero *Acanthoscelides obtectus* (PAPACHRISTOS e STAMOPOULOS, 2004). Através do processo de hidrodestilação, esse óleo apresentou

atividade inseticida sobre o caruncho do milho *Sitophilus zeamais* (SANDI e BLANCO, 2007).

O óleo essencial *E. staigeriana* mostrou-se eficiente no controle do coleoptero *Callosobruchus maculatus* provocando mortalidade de adultos através do processo de fumigação (BRITO et al., 2006). O mesmo óleo foi testado quanto à ação acaricida verificando-se atividade sobre larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus* (CHAGAS et al., 2002).

Testes preliminares utilizando os óleos essenciais das espécies *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* foram realizados *in vitro* verificando-se inibição do desenvolvimento larvar de helmintos gastrintestinais de caprinos (CHAGAS, 2004b). Tais resultados são extremamente significativos, pois criam à possibilidade de utilização destes compostos no controle de endoparasitos.

3. JUSTIFICATIVA

A aplicação de medidas de controle para o parasitismo causado por nematóides gastrintestinais é essencial para o sucesso na produtividade da ovinocaprinocultura. Esse controle é feito basicamente pela utilização de anti-helmínticos onerosos e, algumas vezes, pouco eficazes devido ao desenvolvimento de populações resistentes. Acredita-se que a aplicação de compostos naturais vegetais, como óleos essenciais de *Eucalyptus* spp, pode ser uma alternativa para controlar o parasitismo, pois apresentam como vantagens um desenvolvimento mais lento da resistência, além serem biodegradáveis, não causarem poluição ambiental, diminuir o problema dos resíduos, redução nos custos, além de prolongar a vida útil dos produtos disponíveis no mercado.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *E. staigeriana* e *E. globulus* possuem atividade contra nematóides gastrintestinais de caprinos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Identificar um fitoterápico para controlar as nematodioses de pequenos ruminantes.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade ovicida e larvicida dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* sobre ovos e larvas de *H. contortus*;
- Determinar a toxicidade aguda e subaguda dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. staigeriana* em animais de laboratório;
- Avaliar *in vivo* a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. staigeriana* na redução da carga parasitária de camundongos infectados com parasitos intestinais;
- Avaliar *in vivo* a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. staigeriana* na redução do OPG de caprinos infectados por nematóides gastrintestinais.

Capítulo I

ARTIGO

Atividade ovicida e larvicida do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*

(Ovicidal and larvicidal activity of *Eucalyptus globulus* essential oils
by *Haemonchus contortus*)

Artigo submetido à revista: Ciência Animal

Iara T. F. Macedo^a, Claudia M L Bevilaqua^{a*}, Lorena M. B. de Oliveira^a, Ana L. F. Camurça-Vasconcelos^a, Luiz da S. Vieira^b, Fabrício R. Oliveira^a, Eudson M. Queiroz-Junior^a, Bruno G. Portela^a, Renata S. Barros^a, Ana C.S. Chagas^b

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Brasil;

^bEMBRAPA/CNPC, Brasil.

Atividade ovicida e larvicida do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito ovicida e larvicida do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (OEEG) sobre *Haemonchus contortus*. A determinação da composição química do OEEG foi feita através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. No teste de eclosão de ovos (TEO) foram utilizadas as concentrações 21,75; 17,4; 8,7; 5,43 e 2,71 mg ml⁻¹, e no desenvolvimento larvar (TDL) as concentrações foram 43,5; 21,75; 10,87; 5,43 e 2,71 mg ml⁻¹. Cada ensaio foi acompanhado por um controle negativo com o diluente Tween 80 (3%) e controle positivo, 0,02 mg ml⁻¹ tiabendazol, no TEO e 0,008 mg ml⁻¹ ivermectina no TDL. A eficácia máxima obtida pelo OEEG sobre ovos foi de 99,3% na concentração de 21,75 mg ml⁻¹ e sobre larvas foi de 98,7% na concentração de 43,5 mg ml⁻¹. A concentração do OEEG que inviabilizou 50% dos ovos e das larvas do parasito foi de 8,3 mg ml⁻¹ e 6,92 mg ml⁻¹, respectivamente. A análise química do óleo identificou como principal componente o monoterpeno 1,8-cineol. O OEEG apresentou atividade ovicida e larvicida sobre *H. contortus*, revelando um bom potencial para utilização no controle de nematóides gastrintestinais.

PALAVRAS-CHAVE: fitoterapia, *Haemonchus contortus*, anti-helmíntico.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate ovicidal and larvicidal effect of *Eucalyptus globulus* essential oil (EgEO) on *Haemonchus contortus*. The chemical composition determination of EgEO was through gas chromatography and mass spectrometry. Egg hatch test (EHT) was performed in concentrations 21.75; 17.4; 8.7; 5.43 e 2.71 mg ml⁻¹, and in larval development test (LDT) were used the concentrations 43.5; 21.75; 10.87; 5.43 e 2.71 mg ml⁻¹. Each trial was conducted by negative control with Tween 80 (3%) and positive control, 0.02 mg ml⁻¹ of thiabendazole in EHT and 0.008 mg ml⁻¹ of ivermectin in LDT. The maximum effectiveness of EgEO on eggs was 99.3% in concentration of 21.75

mg ml⁻¹ and on larvae was 98.7% in concentration 43.5 mg ml⁻¹. The concentration of EgEO that inhibits 50% of the eggs and larvae was 8.3 mg ml⁻¹ and 6.92 mg ml⁻¹, respectively. The oil chemical analysis identified as main component the monoterpen 1,8-cineol. The EgEO presented ovicidal and larvicidal activity, revealing a good potential for use in the control of gastrointestinal nematodes.

KEY WORDS: phytoterapic, *Haemonchus contortus*, anthelmintic.

INTRODUÇÃO

As endoparasitoses gastrintestinais se constituem no principal entrave da ovinocultura, em todo o mundo, especialmente, nas regiões tropicais, onde os prejuízos econômicos são mais acentuados (VIEIRA, 2008). Dentre os parasitos gastrintestinais, destaca-se o nematóide hematófago *Haemonchus contortus*, devido a sua alta prevalência e patogenicidade (AROSEMENA et al., 1999). O comprometimento da produção ocorre em decorrência da perda de apetite, diarreia, anemia e em casos severos, morte do animal (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004).

Para tentar controlar e reduzir as perdas causadas pelas infecções por helmintos são utilizados anti-helmínticos sintéticos (EGUALE et al., 2007). Entretanto, o rápido desenvolvimento de populações de nematóides resistentes, associado ao alto custo, risco de resíduos nos alimentos e de contaminação ambiental tornou necessária a busca por novas alternativas de controle (HERD, 1996; MELO et al., 2003). Opções como a utilização de plantas medicinais pode representar uma alternativa para o controle das nematodeoses e minimizar alguns desses problemas apresentando a vantagem de serem sustentáveis e ambientalmente aceitas (COSTA et al., 2008).

Eucalyptus globulus pertence à família Myrtaceae é uma espécie nativa da Austrália que está distribuída mundialmente. Essa espécie vegetal é eficaz no tratamento de inflamações pulmonares e excessiva mucosidade (ROCHA e SANTOS, 2007). O uso do óleo essencial obtido a partir das suas folhas apresenta importância farmacêutica, sendo propostas múltiplas aplicações medicinais, incluindo atividade antiinflamatória, analgésica (SILVA et al., 2003) e anti-oxidante (CRUZ et al., 2005). Estudos demonstraram atividade desse óleo sobre bactérias e fungos (NAVARRO et al., 1996; TAKAHASHI et al., 2004; SALARI et al., 2006; CARMELLI et al., 2008), sobre o carrapato *Boophilus microplus*

(CHAGAS et al., 2002), bem como atividade inseticida sobre *Musca domestica* (MORSY e HALIM, 2005), *Pediculus humanus capitis* (YANG et al., 2004), além dos coleópteros *Acanthoscelides obtectus* (PAPACHRISTOS e STAMOPOULOS, 2004), *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (BRITO et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *E. globulus* sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de *H. contortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do óleo essencial

Foi utilizada uma preparação comercial do óleo essencial de *E. globulus* (OEEG) adquirido de Dierberguer óleos essenciais Ltda. Para aumentar a solubilidade em meio aquoso, o óleo foi diluído em Tween 80 a 3%.

Obtenção de ovos e larvas de H. contortus

Dois ovinos sem raça definida foram mantidos em gaiolas metabólicas e tratados inicialmente com três anti-helmínticos de diferentes princípios ativos em dias alternados para eliminar todos os nematóides gastrintestinais. Após a constatação da eliminação da infecção foram inoculadas 5.000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* e posteriormente foram realizados exames coprológicos para confirmar o estabelecimento da infecção experimental.

Teste de eclosão de ovos (TEO)

Foram coletadas 10 g de fezes diretamente da ampola retal de ovino portador de infecção monoespecífica por *H. contortus*. As fezes foram processadas de acordo com a técnica descrita por Hubert e Kerbeouf (1992) para recuperação de ovos. O teste de eclosão de ovos foi baseado na metodologia descrita por Coles et al. (1992). Aproximadamente 250 µl de solução de ovos, contendo no mínimo 100 ovos, foram incubados com 250 µl da solução a ser testada de acordo com os seguintes tratamentos: T1: diluente Tween 80 a 3%, controle negativo; T2: 0,02 mg ml⁻¹ tiabendazol, controle positivo; T3: óleo essencial de *E. globulus* nas concentrações 2,71; 5,43; 8,7; 17,4 e 21,75 mg ml⁻¹. Após 48 horas, foi acrescentado Lugol objetivando interromper a eclosão dos ovos

e realizar a contagem de ovos e larvas eclodidas. Foram realizadas três repetições com cinco réplicas para cada tratamento.

Teste de desenvolvimento larval (TDL)

Para a obtenção das larvas de primeiro estágio (L1), uma alíquota da suspensão de ovos obtida segundo Hubert e Kerbeouf (1992) foi incubada por 24 h em estufa a 37°C. O teste de desenvolvimento larvar foi realizado conforme método descrito por Roberts e O'Sullivan (1950) modificado. Uma alíquota de 1 ml, contendo aproximadamente 250 L1 de *H. contortus*, foi incubada durante 6 dias com 2 g de fezes provenientes de um animal livre de nematóides gastrintestinais, juntamente com 1 ml do óleo essencial de *E. globulus* nas concentrações 2,71; 5,43; 10,87; 21,75 e 43,5 mg ml⁻¹. O controle negativo foi constituído pelo diluente Tween 80 (3%) e o positivo, por ivermectina (0,008 mg ml⁻¹). Ao final, foi acrescentado lugol e realizada a contagem de larvas de 3º estágio. Foram realizadas três repetições com cinco réplicas para cada tratamento.

Análise química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial usado neste estudo foi determinada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. O óleo essencial foi analisado usando o equipamento Velocity XPT sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida dimetilpolisiloxano DB 5ms; gás de arraste: Ne (1 mL/min); temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 200°C; temperatura da coluna: 35- 180°C a 4°C /min e depois 180-25°C a 10°C /min. Amostras foram analisadas pelo CG- SM no QP2010, com impacto eletrônico a 70 e V.

Análise estatística

Nos testes *in vitro*, os resultados foram expressos em percentagem de eficácia da inibição da eclosão de ovos e do desenvolvimento larvar de *H. contortus*. Os resultados foram analisados usando ANOVA e comparados através do teste de Tukey com nível de significância de 5% usando o programa Prism 3.0.

A eficácia de cada tratamento no teste de eclosão de ovos foi determinada com base no percentual de eclosão calculado usando-se a seguinte fórmula: (nº de larvas eclodidas/ nº de larvas eclodidas + nº de ovos) x 100.

No teste de desenvolvimento larvar, a eficácia foi calculada usando a fórmula: (L3 grupo controle negativo - L3 grupo tratado) / L3 grupo controle negativo x 100.

A concentração efetiva 50 (CE50), ou seja, a concentração capaz de inibir 50% da eclosão de ovos ou do desenvolvimento larvar foi calculada usando o programa estatístico SPSS 8.0 para Windows.

RESULTADOS

As percentagens médias de eficácia do OEEG obtidas no teste de eclosão de ovos estão dispostas na tabela 1. O OEEG na concentração de 17,4 mg ml⁻¹ apresentou 87,3% de eficácia não sendo diferente estatisticamente do anti-helmíntico ($p>0,05$). A CE50 do OEEG foi de 8,3 (5,46 - 12,31) mg ml⁻¹.

Tabela 1. Eficácia média \pm erro padrão do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentrações (mg ml ⁻¹)	Eficácia \pm e.p
21,75	99,07 \pm 0,28A
17,4	87,3 \pm 2,55B
8,7	43,25 \pm 1,05C
5,43	21,87 \pm 2,27D
2,71	9,93 \pm 1,49E
Controle negativo (3% Tween 80)	3,12 \pm 0,45E
Controle positivo (0.025 mg ml ⁻¹ Tiabendazol)	92,7 \pm 1,28AB

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas ($p<0,05$)

A tabela 2 apresenta as percentagens médias de eficácia do OEEG no teste de desenvolvimento larvar. Na concentração de 21,75 mg ml⁻¹, o OEEG inibiu em 90,96% o desenvolvimento larvar, sendo equivalente à eficácia do anti-helmíntico ($p>0,05$). A CE50 do OEEG foi de 6,92 (5,12- 9,01) mg ml⁻¹.

Tabela 2. Eficácia média \pm erro padrão do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* na inibição do desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Concentrações (mg mL ⁻¹)	Eficácia \pm e.p
43,5	98,7 \pm 0,36A
21,75	90,96 \pm 2,17A
10,87	67,75 \pm 3,83B
5,43	47,6 \pm 4,56C
2,71	8,37 \pm 2,08D
Controle negativo (3% Tween 80)	3,5 \pm 0,57D
Controle positivo (0.008 mg mL ⁻¹ Ivermectina)	99,81 \pm 0,1A

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas ($p < 0,05$)

O óleo essencial apresentou efeito inibitório dose-dependente sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de *H. contortus*.

A análise obtida por cromatografia gasosa indicou como principais constituintes e suas concentrações: α -pineno (4,15%), o-cimeno (2,93%), (+)-limoneno (8,16%), eucaliptol (83,89%) e γ -terpineno (0,87%).

DISCUSSÃO

O modelo *in vitro* reportado neste estudo demonstrou efeito anti-helmíntico do OEEG, sugerindo a presença de algum constituinte químico que atua sobre ovos e larvas de *H. contortus*. O uso de *H. contortus* nesses testes pode ser justificado pelo fato de que este nematóide é um parasito gastrointestinal de grande importância econômica na produção de pequenos ruminantes, apresentando alta prevalência e patogenicidade (DIEHL et al., 2004). Em trabalho anterior o óleo essencial de *E. globulus* também apresentou atividade *in vitro* sobre nematóides gastrointestinais na concentração de 5%, entretanto o teste utilizou outra metodologia baseada em coproculturas de caprinos com infecção mista e o óleo foi testado na forma de emulsão (CHAGAS, 2004).

Os testes *in vitro* se constituem na observação da ação do fármaco pelo contato direto com os estágios de ovo ou larva do parasito para avaliar seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento de larvas. Atualmente estes testes além de verificarem a ação de anti-helmínticos sintéticos, têm sido utilizados para triagem de plantas medicinais, apresentando as vantagens de facilidade de execução, baixo custo e rapidez. Esses ensaios servem como uma indicação inicial da atividade a ser pesquisada e permitem a seleção dos extratos mais promissores, diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Neste estudo, o OEEG apresentou atividade *in vitro* sobre *H. contortus* superior a outras plantas testadas. Como exemplo é possível citar que 50 mg ml⁻¹ do extrato hexânico das folhas de *Melia azedarachta* inibiram em 16,92% a eclosão de ovos e em 67,9% o desenvolvimento larvar, respectivamente (MACIEL et al., 2006); o extrato acetato de etila de *Azadirachta indica* inibiu 51,31% a eclosão de ovos e 68,10% o desenvolvimento larvar na concentração de 50 mg ml⁻¹ (COSTA et al., 2008); o extrato metanólico de *Spigelia anthelmia* inibiu 97,4% a eclosão de ovos e 84,4% o desenvolvimento larvar na concentração de 50 mg ml⁻¹ (ASSIS et al., 2003).

Neste trabalho OEEG foi menos efetivo que os anti-helmínticos sintéticos usados como controle positivo. Entretanto o tiabendazol e a ivermectina são substancias ativas isoladas, enquanto que o óleo essencial é uma mistura contendo vários constituintes químicos, dentre eles o princípio ativo com ação ovicida e larvicida, porém em pequenas quantidades.

A investigação de componentes químicos provenientes de produtos naturais é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas drogas anti-helmínticas (ASSIS et al., 2003). Neste estudo, a análise CG-SM identificou que o OEEG é composto por cinco constituintes químicos que podem ser responsáveis pela potencial atividade anti-helmíntica encontrada *in vitro*. O principal constituinte encontrado foi o monoterpeneo 1,8-cineol, também conhecido por eucaliptol. Alguns trabalhos já foram realizados com esse composto para avaliar sua atividade inseticida sobre coleopteros *Tribolium castaneum* (TRIPATHI et al., 2001; STAMOPOULOS et al., 2007) e *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Musca domestica* e *Blattella germanica* (LEE et al., 2003). Existem relatos sobre ação contra as bactérias, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus*

aureus (CARSON e RILLEY, 1995; CHA et al., 2007), sobre os fungos *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *Pyrenophora graminea* (TERZI et al., 2007) e larva do nematóide *Anisakis simplex* (NAVARRO et al., 2008).

O óleo essencial de *E. globulus* pode ser uma fonte alternativa para o controle de nematóides gastrintestinais. Entretanto, estudos são necessários para avaliar a sua toxicidade e seus efeitos *in vivo*, bem como isolamento e avaliação de seus componentes ativos.

REFERÊNCIAS

- AROSEMENA, N.A.E.; BEVILAQUA, C.M.L.; MELO, A.C.F.L.; GIRÃO, M.D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. *Revue Médecine Vétérinaire*, v. 150, p. 873-876, 1999.
- ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S.; COSTA, C.T. C.; SOUZA, J.A.L. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p. 43-49, 2003.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 63, p. 631-639, 2004.
- BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; DE-BORTOLI, S.A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da terra*, v. 6, p. 96-103, 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. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 7, p. 97-106, 2005.
- CARMELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses. *Current microbiology*, v. 56, p. 89-92, 2008.
- CARSON, C.F.; RILLEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 78, p. 264-269, 1995.
- CHA, J.D.; JUNG, E.K.; KIL, B.S.; LEE, K.Y. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Artemisia feddei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 2061-2065, 2007.

- 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*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 247-253, 2002.
- CHAGAS, A.; C.S. Ação ovicida de produtos a base de eucalipto sobre helmintos de caprinos. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, 2004, Ouro Preto. *Anais ... Ouro Preto: CBPV*, 2004. p.168.
- COLES, G.C.C.; BAUER, F.H.M.; BORGSTEEDE, S.; GEERTS, T.R.; KLEI, M.A.; TAYLOR 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. *Veterinary Parasitology*, v. 44, p. 35-44, 1992.
- COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; CASTRO, C.M.S.; BRAGA, R.R.; OLIVEIRA, L.M.B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, v. 74, p. 284-287, 2008.
- CRUZ, J.M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Food Chemistry*, v. 90, p. 503-511, 2005.
- DIEHL, M.S.; ATINDEHOU, K.K; TERE, H.; BETSCHART, B. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 277-284, 2004.
- EQUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 428-433, 2007.
- HERD, R. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. T. Padilha, Ed. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, p. 95-111, 1996.
- HUBERT, J; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, v. 151, p. 442-446, 1992.
- 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.
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; COSTA, C. T. C.; CASTRO, C. M. S. Ovicidal and

- larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 140, p. 98-104, 2006.
- MELO, AC.F.L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F.A.M.; MELO, L.M. Nematóides resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n.2, p.339-344, 2003.
- MORSY, T.A.; HALIM, A. S. A. The insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* oil on the development of *Musca domestica* third stage larvae. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 35, p. 631-636, 2005.
- NAVARRO, V.; VILLARREAL, M.L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 53, p.143-147, 1996.
- NAVARRO, M.C.; NOGUERA, M.A.; ROMERO, M.C.; MONTILLA, M.P.; SELGAS, J.M.G; VALERO, A. Anisakis simplex s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, v. 120, p. 295-299, 2008.
- PAPACHRISTOS, D.P.; STAMOPOULOS, D.C. Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 40, p. 517-525, 2004.
- ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 1, p. 99-102, 1950.
- ROCHA, M.E.N.; SANTOS, C.L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus Globulus* Labill- Myrtaceae. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 2, p. 23-24, 2007.
- 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.
- SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 277-283, 2003.

STAMOPOULOS, D.C.; DAMOS, P.; KARAGIANIDOU, G. Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of stored Products Research*, v. 43, p. 571-577, 2007.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 39, p. 60–64, 2004.

TERZI, V.; MORCIA, C.; FACCIOLI, P.; VALE, G.; TACCONI, G.; MALNATI, M. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 613–618, 2007.

TRIPATHI, A.K.; PRAJAPATI, V.; AGGARWAL, K.K.; KUMAR, S. Toxicity, Feeding Deterrence, and Effect of Activity of 1,8-Cineole from *Artemisia annua* on Progeny Production of *Tribolium castanaeum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 94, p. 979-983, 2001.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnologia & Ciências Agropecuárias*, v. 2, p. 49-56, 2008.

YANG, Y.C.; CHOI, H.Y.; CHOI, W.S.; CLARK, J.M.; AHN, Y.J. Ovicidal and Adulticidal Activity of *Eucalyptus globulus* Leaf Oil Terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 2507-2511, 2004.

Capítulo II

ARTIGO

ANTHELMINTIC ACTIVITY OF *Eucalyptus staigeriana* ESSENTIAL OIL AGAINST GOAT GASTROINTESTINAL NEMATODES

(Atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* sobre nematóides gastrintestinais de caprinos)

Artigo submetido ao periodico: Fitoterapia

Iara T. F. Macedo ^a, Claudia M L Bevilaqua ^{a*}, Lorena M. B. de Oliveira ^a, Ana L. F. Camurça-Vasconcelos ^a, Luiz da S. Vieira ^b, Fabrício R. Oliveira ^a, Eudson M. Queiroz-Junior ^a, Adriana da R. Tomé ^a, Nilberto R. F. Nascimento ^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Brazil;

^bEMBRAPA/CNPC, Brazil.

ANTHELMINTIC ACTIVITY OF *Eucalyptus staigeriana* ESSENTIAL OIL AGAINST GOAT GASTROINTESTINAL NEMATODES

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia anti-helmíntica do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* (OEES). Os efeitos *in vitro* do OEES foram determinados através do teste de eclosão de ovos e inibição do desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*. O óleo foi submetido à toxicidade aguda e subaguda. Os efeitos *in vivo* foram determinados através da contagem de nematóides intestinais de camundongos e da redução da contagem de ovos nas fezes em caprinos. 1,35 e 5,4 mg mL⁻¹ de OEES inibiram em 99,27% e 99,20% a eclosão de ovos e o desenvolvimento larvar de *H. contortus*. Na toxicidade subaguda, todos os parâmetros encontrados estavam dentro da variação normal e análise hirtopatológica dos órgãos não apresentou alterações. Na concentração de 500 mg kg⁻¹, o óleo essencial foi efetivo em 86% contra nematóides de camundongos. A eficácia de OEES contra nematóides gastrintestinais de caprinos foi de 59% 15 dias após o tratamento. Óleo essencial de *E. staigeriana* mostrou atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Fitoterapia; Anti-helmíntico; *In vivo*; *In vitro*; Toxicidade.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the anthelmintic efficacy of *Eucalyptus staigeriana* essential oil (EsEO). The *in vitro* effects of EsEO were determined through the egg hatching test and the inhibition of larval development of *Haemonchus contortus*. The oil was subjected to acute and subacute toxicity. The *in vivo* effects were determined through worm count of mice intestinal nematodes and fecal egg reduction count in goats. 1.35 and 5.4 mg mL⁻¹ EsEO inhibited 99.27% and 99.20% *H. contortus* egg hatching and larval development. In subacute toxicity of EsEO, all parameters were found to be in the normal range, and histopathological analysis of organs did not present alterations. At a concentration of 500 mg kg⁻¹, the essential oil was 86% effective against mice nematodes. EsEO efficacy against goat gastrointestinal nematodes was 59% at 15th day after treatment. *E. staigeriana* essential oil showed *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity.

Keywords: Phytotherapy; Anthelmintic; *In vivo*; *In vitro*; Toxicity.

Introduction

Gastrointestinal parasitism is a significant obstacle in the breeding of sheep and goats (Pessoa et al., 2002). Parasitism, especially by helminth species, impairs health by causing lack of appetite, diarrhea, anemia and, in severe cases, death (Athanasiadou and Kyriazakis, 2004). Synthetic anthelmintics have been used throughout the world for decades to minimize the losses caused by helminth infection. However, anthelmintic resistance in nematodes has become a major practical problem in many countries (Varady and Corba, 1999). Parasite resistance increases costs, reduces production efficiency and increases the risk of environmental contamination. Frequent use, increased dosage, and increased application rate all correlate with declining effectiveness (Donald, 1994). These disadvantages have stimulated a search for alternative control methods, such as the use of traditional medicinal plants. Screening and proper evaluation of medicinal plants could reveal bioactive compounds that may be sustainable and environmentally acceptable (Eguale et al., 2007).

Recently, there has been an increasing interest in ethnomedical and ethnoveterinary practices around the world, especially as they pertain to the use of medicinal plants in treating various ailments (Bizimenyera, 2006). For acceptance of medicinal plants into scientific medicine, it is necessary that their effectiveness and safety be evaluated and confirmed through *in vitro* and *in vivo* testing (Rates, 2001).

Eucalyptus (Myrtaceae), a native plant of Australia, is mainly cultivated for the paper, pharmaceutical and cosmetic industries (Hasegawa et al., 2008). Much research has been conducted on the medicinal properties of *Eucalyptus* spp. The leaf extract, or essential oil from the leaves of *Eucalyptus* spp. has been reported to possess antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, mosquito repellent, and anthelmintic properties (Bennet-Jenkins and Bryant, 1996; Ramezani et al., 2002; Silva et al., 2003; Erler et al., 2006; Salari et al., 2006). *E. staigeriana* is the species most commonly used in Brazil for extraction of essential oil, and the main chemical component is citral (Vitti & Brito, 2003). Studies have shown that the essential oil exhibits antibacterial biological activity (Dupont et al., 2006). Furthermore, fumigation using essential oil has been shown to be effective in the control of insects such as *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Brito et al., 2006). Chagas et al. (2002) detected acaricide activity of the oil toward the tick *Boophilus microplus*.

The objective of the current study was therefore to assess the *in vitro* and *in vivo* anthelmintic potential of *E. staigeriana* essential oil toward gastrointestinal nematodes.

Materials and Methods

Obtaining Essential Oil

A commercial preparation of *E. staigeriana* essential oil (EsEO) furnished by *Dierberguer óleos essenciais Ltda* was used in the experiments described here. To increase the solubility in aqueous medium, the essential oil was diluted in 3% Tween 80.

Chemical analysis

The chemical composition of EsEO used in this study was determined by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). The oil was analyzed on a Velocity XPT using the following experimental conditions: DB 5ms fused silica capillary column; carrier gas: hydrogen; injector temperature 250°C; detector temperature 250°C; column temperature 50°C (6 min), 500-200°C, at 3°C/min. Samples were analyzed by GC-MS on QP2010, with impact electronic in 70 and V. The identification of the constituents was performed by a computer-based library search, as well as retention indices and visual interpretation of the mass spectra.

Egg hatch test

The egg hatching test was performed based on the methodology described by Coles et al. (1992). Sheep experimentally infected with *H. contortus* were used as a source of fresh eggs of this parasite. *H. contortus* eggs were recovered according to Hubert and Kerboeuf (1992). Briefly, 10 g of feces collected directly from the rectum were mixed with distilled water and filtered through 590, 149, 101 and 30 µm aperture sieves. 250 µL of egg suspension, containing approximately 100 fresh eggs, and 250 µL EsEO at concentrations of 0.08, 0.16, 0.33, 0.67 and 1.35 mg mL⁻¹ were incubated for 48 h at room temperature. After incubation, drops of Lugol were added. The eggs and L1 were counted under a microscope. A negative control containing the diluent (3% Tween 80) and a positive control with 0.025 mg mL⁻¹ thiabendazole were performed in parallel. Three repetitions with five replicates for each *E. staigeriana* essential oil concentration and for each control were performed.

Larval development test

An aliquot of egg suspension obtained according to Hubert and Kerboeuf (1992), was incubated for 24 h at 37°C to obtain first-stage larvae (L1). The larval development test (LDT) was performed using 1 mL of larval suspension, containing approximately 250 L1, and 1 mL of EsEO at concentrations of 0.33, 0.67, 1.35, 2.7 and 5.4 mg mL⁻¹ incubated with 2 g of feces from a nematode-free sheep for 6 days at room temperature. Then, the third-stage larvae (L3) were recovered according to Roberts and O'Sullivan (1950) and counted under a microscope. A negative control with 3% Tween 80 and a positive control with 0.008 mg mL⁻¹ ivermectin were also performed. Three repetitions with five replicates for each oil concentration and for each control were conducted.

Toxicity tests

The care and handling of animals were in accordance with the internationally accepted standard guidelines for use of animals, and the protocol was approved by the Ethical Committee of Ceará State University (number: 08332518-2).

Acute toxicity in mice

Swiss albino mice (n=96) of both sexes, with average weight of 27.5g, were kept in polypropylene boxes and fed with commercial feed and water *ad libitum*. The mice were randomly divided into 12 groups (n = 8): G1 through G5 received 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 mg kg⁻¹ EsEO by oral administration. G6 received 3% Tween 80 by the same route. G7 through G11 received 200, 300, 400, 500, and 600 mg kg⁻¹ EsEO by intraperitoneal administration. G12 received 3% Tween 80 by intraperitoneal administration. The animals were observed for general behavioral changes, signs of toxicity and mortality for 6 h after treatment. After 24 h, the total number of dead animals was verified and the lethal doses were calculated (LD10 and LD50).

Subacute toxicity in rats

Female Wistar albino rats weighing 190-260 g were housed in polypropylene cages and fed with commercial feed and water *ad libitum*. The animals were randomly divided into two groups (n=10). Group I received the dose corresponding to EsEO LD10 that had been obtained in the acute toxicity study. As a control, group II received only vehicle (3%

Tween 80). The treatments were administered daily by gavage for 30 days. Toxic manifestations and mortality were monitored daily. At the end of the 30-days period, body weights were recorded. Blood samples were obtained by retro-orbital puncture under diethyl ether anesthesia for hematological and biochemical analysis. This was performed at day zero, and again at the end of the experiment. The hematological parameters analyzed were red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (Plt), white blood cell count (WBC) and white blood cell differential count (segmented neutrophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes).

Serum creatinine, urea, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined enzymatically using specific kits by measurement of the optical density of the reaction products at the corresponding wavelength with a spectrophotometer (BioSystems BTS-310 photometer). After 30 days the animals were sacrificed and the organs (kidneys, heart, liver, spleen and lungs) were collected. The selected organs were removed, macroscopically analyzed, fixed and preserved in 10% formalin for histopathological analysis. The tissues were soaked in paraffin, and prepared and stained with haematoxylin and eosin for microscopic examination.

Efficacy test on mice intestinal nematodes

Twenty-four albino Swiss mice with natural intestinal nematode infections were allocated in standard polypropylene cages (40 cm x 34 cm x 17 cm). Every week, feces were collected from cages to determine the infection level of *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* according to the method of Willis (1927).

The mice were randomly distributed into three groups (n = 8) and treated by gavage over a period of five days with the following preparations: G1 – water (negative control); G2 – 0.56 mg kg⁻¹ fenbendazole; G3 – 500 mg kg⁻¹ EsEO. Seven days after the first-day treatment, mice were sacrificed and submitted to necropsy for parasite recovery. The large intestine of each animal was opened into a Petri dish and examined under a stereoscopic microscope in order to collect the parasites. Nematodes recovered were placed into glass

containers and fixed in AFA solution (alcohol + formol + acetic acid). They were then counted and identified under a microscope.

Fecal egg count reduction test (FECRT)

Thirty goats from both sexes, aged from 12 to 16 months and 30 kg average weight, were obtained from the EMBRAPA farm in the Sobral municipality. This is a semi-arid region of northeastern Brazil. Goats were kept in paddocks and fed with fresh grass, mineral salt and water *ad libitum*, from May to September 2008.

Individual fecal samples were collected to determine the level of gastrointestinal nematode infection using a modified McMaster technique (Ueno and Gonçalves, 1998). The animals with egg counts per gram of feces (epg) less than 1000 were inoculated with a single dose of 1500 *H. contortus* L3. After 21 days, another egg analysis was carried out and goats were divided into three homogeneous groups (mean epg of the group 6000) (n = 10). Each group was administered the following treatments: G1- untreated animals; G2 – 0.2 mg kg⁻¹ ivermectin; G3 – 500 mg kg⁻¹ EsEO. Fecal samples from each animal were collected on treatment day 0 and on days 8, 15 and 22 post-treatment to determine epg. Coprocultures were performed with feces using the method of Roberts and O’Sullivan (1950).

Statistical analysis

The results of the *in vitro* tests are expressed as mean efficacy percentage of egg hatching or larval development inhibition \pm standard error. The analysis was performed using ANOVA and compared by Tukey’s test ($P < 0.05$) using the Graph Pad Prism 3.0 program. The effective concentration to inhibit 50% (EC50) egg hatching and larval development were determined by probit method using SPSS 8.0 for Windows.

The lethal doses required to kill 50% (LD50) and 10% (LD10) of mice were calculated for each administration route used in the acute toxicity study by probit method using SPSS 8.0 for Windows.

The results of subacute toxicity were analyzed by ANOVA and compared by Tukey’s test ($P < 0.05$) using the Graph Pad Prism 3.0 program.

Efficacy of EsEO in treatment of intestinal mice nematodes was calculated by the following formula: (worm burden of negative control group – worm burden of treated

group) / worm burden of negative control group X 100. The results were analyzed by ANOVA and compared by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) using the Graph Pad Prism 3.0 program.

FECRT efficacy was calculated according to Coles et al. (1992). Results were analyzed using ANOVA and Kruskal-Wallis test with 5% significance level.

Results

Mean efficacy percentage of egg hatching and larval development tests using EsEO are presented in table 1. The EC50 for egg hatching was 0.324 mg mL^{-1} and the EC50 for larval development was 1.702 mg mL^{-1} . EsEO treatment presented a dose-dependent effect on inhibition of *H. contortus* egg hatching and larval development.

The LD10 and LD50 for orally administered EsEO calculated in the acute toxicity study were 2675.04 (0.20- 3457.78) and 4112.94 (2814.35-38966.74) mg kg^{-1} respectively. The intraperitoneal administration of 600 mg kg^{-1} EsEO killed all mice, and the LD10 and LD50 were 299.04 (199.83-348.84) and $408.95 (351.39-466.87) \text{ mg kg}^{-1}$, respectively.

Table 1. Mean percentage efficacy \pm standard error of *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus* egg hatching (EHT) and larval development (LDT).

Concentrations (mg mL^{-1})	EHT	LDT
5.4	-	$99.26 \pm 1.22\text{A}$
2.7	-	$59.54 \pm 10.7\text{B}$
1.35	$99.27 \pm 1.09\text{A}$	$32.15 \pm 13.5\text{C}$
0.67	$92.64 \pm 4.94\text{A}$	$19.46 \pm 5.4\text{D}$
0.33	$41.54 \pm 9.95\text{B}$	$4.26 \pm 7.29\text{D}$
0.16	$8.24 \pm 3.36\text{C}$	-
0.08	$6.46 \pm 1.76\text{C}$	-
Tween 80 (3%)	$3.44 \pm 0.44\text{C}$	$3.5 \pm 0.57\text{D}$
Positive Control *	$86.69 \pm 2.5\text{A}$	$99.81 \pm 0.1\text{A}$

Letters compare means in the lines. Different letters indicate significantly different values ($P < 0.05$). * Positive control for EHT was 0.025 mg mL^{-1} thiabendazole and for LDT 0.008 mg mL^{-1} ivermectin

The results obtained in the subacute toxicity study starting with hematological analyses of mice treated with *E. staigeriana* essential oil are presented in table 2. The parameters affected by treatment were: CTH, Ht and Hb. The values of these parameters were significantly smaller on the 30th day in mice treated with *E. staigeriana* in relation to the control ($P < 0.05$). Other hematological parameters did not differ statistically among studied groups.

Table 2. Effect of 300 mg kg⁻¹ *Eucalyptus staigeriana* essential oil (mean±SE) on hematological parameters on rats (n=10) treated during 30 days.

Parameters	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
White blood cell ($\times 10^3$ mm ⁻³)	9.38±0.51 ^a	9.16±0.42 ^a	9.12±0.54 ^a	8.94±0.43 ^a
Red blood cell ($\times 10^6$ mm ⁻³)	7.58±0.20 ^{ab}	7.89±0.17 ^a	7.08±0.12 ^{ab}	6.87±0.34 ^b
Hemoglobin concentration (g/dl)	14.30±0.17 ^a	14.53±0.18 ^a	13.78±0.13 ^{ab}	13.07±0.54 ^b
Hematocrit (%)	44.39±0.73 ^{ab}	46.30±0.68 ^a	43.12±0.40 ^{ab}	42.14±1.94 ^b
Platelets ($\times 10^3$ mm ⁻³)	881.20±49.09 ^a	848.40±46.75 ^a	836.40±41.97 ^a	892.4± 55.5 ^a
Segmented leukocyte (%)	14.33±2.04 ^a	21.11±1.23 ^a	16.50± 1.88 ^a	21.90± 4.90 ^a
Lymphocyte (%)	81.89±1.85 ^a	73.78±1.45 ^a	78.00±2.06 ^a	72.30±5.00 ^a
Eosinophilic leukocyte (%)	0.77±0.32 ^a	1.11±0.45 ^a	1.70±0.80 ^a	1.10 ± 0.31 ^a
Monocyte (%)	3.44±0.29 ^a	4.33±0.55 ^a	3.70 ± 0.44 ^a	4.00 ± 0.55 ^a
Mean corpuscular volume (FL)	58.70±0.92 ^a	58.80±0.69 ^a	60.95 ± 0.82 ^a	61.45±0.61 ^a
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	18.93±0.37 ^a	18.46±0.22 ^a	19.47±0.31 ^a	19.1±0.25 ^a
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	32.23±0.24 ^a	31.40±0.19 ^{ab}	31.97±0.29 ^{ab}	31.06±0.31 ^b

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

Table 3 presents the biochemical parameters analyzed for treated animals ($P > 0.05$). We found no significant difference in body weight or organ morphology between treated and control groups.

Table 3. Effect of 300 mg kg⁻¹ *Eucalyptus staigeriana* essential oil (mean ± SE) on biochemical parameters of rats (n=10) treated during 30 days.

Parameters	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
AST (UI/l)	99.11±3.80 ^a	58.8±3.96 ^b	87.00±5.30 ^{ab}	78.70±14.43 ^{ab}
ALT (UI/l)	46.00 ±2.92 ^a	25.22±2.45 ^a	45.90±2.66 ^a	40.00±11.8 ^a
Urea (mg/dL)	59.67±1.53 ^a	44.73±2.07 ^b	60.30±2.61 ^a	53.44±4.94 ^{ab}
Creatinine (mg/dL)	0.63±0.02 ^a	0.41±0.02 ^b	0.66±0.01 ^a	0.43±0.03 ^b

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

Gas chromatography analysis indicated the following constituents of EsEO: α -pinene (3.27%), β -pinene (2.15%), β -myrcene (0.89%), α -phellandrene (1.89%), o-cymene (1.76%), (+)-limonene (28.82%), Eucalyptol (5.39%), γ -terpinene (1.74%), α -terpinolen (9.4%), β -linalool (1.67%), β -citronellal (0.8%), 4-terpineol (1.16%), alpha-terpineol (1.07%), cis-geraniol (1.95%), Z-citral (10.77%), trans-geraniol (4.2%), E-citral (14.16%), methyl geranate (3.66%), nerol acetate (1.4%) and geraniol acetate (3.86%).

The effects of EsEO on nematodes in mice are presented in table 4. The nematode species recovered from the mice were *A. tetraoptera* and *S. obvelata*. Administration of 500 mg kg⁻¹ EsEO resulted in 85% reduction of worm burden, similar to febendazole which has an efficacy of 88.4%.

Table 4. Mean efficacy (\pm SE) of *Eucalyptus staigeriana* essential oil and febendazole based in worm burden reduction of mice intestinal nematodes

Treatment	% Efficacy \pm SE
<i>E. staigeriana</i> (500 mg kg ⁻¹)	86.31 \pm 6.19A
Tween 80 (3%)	18.45 \pm 7.28B
Febendazole (0.56 mg kg ⁻¹)	88.14 \pm 6.78A

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

Fecal egg count reduction after treatment with EsEO varied from 33.33% to 59.6% at 8 and 15 days post-treatment. Ivermectin varied from 53.5% to 0% in the same period (table 5). *Trichostrongylus* spp was the main genus identified in coprocultures from all tested groups.

Table 5. Mean efficacy and epg (\pm SE) of *Eucalyptus staigeriana* essential oil and ivermectin based in fecal egg count reduction test in goats.

Treatment	Day 0	Day 8	Day 15	Day 22
<i>E. staigeriana</i> (500 mg kg ⁻¹)				
Mean epg	6100 \pm 475.9A ^a	1580 \pm 274.1A ^b	2020 \pm 247.1A ^b	1410 \pm 325.4A ^b
Efficacy (%)	-	33.33	59.60	54.51
Ivermectin (0.2 mg kg ⁻¹)				
Mean epg	5280 \pm 1343A ^a	1100 \pm 187.4A ^b	5230 \pm 1147B ^a	1640 \pm 415.9A ^b
Efficacy (%)	-	53.50	00.00	47.09
Water				
Mean epg	3550 \pm 732.2A ^a	2370 \pm 478A ^a	5000 \pm 647.4B ^a	3100 \pm 734.8A ^a

Capital letters compare mean in the lines and small letters compare mean in the columns. Different letters indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Discussion

Medicinal plants have been used in the treatment of various ailments throughout human history. It is important to determine the appropriate use of medicinal plants through scientific validation. Testing should be performed on traditional treatments in order to confirm the effectiveness, as well as to determine the safety in live organisms (Matos, 1995).

Eucalyptus essential oil is a complex mixture of a number of volatile organics component (Salgado et al., 2003). In this study, the constituents of the active oil were identified. EsEO is composed by 20 different substances. Our results report the predominance of limonene and citral. Some studies have reported possible activity of citral and limonene on insects (Prates 1998; Lee et al. 2003; Yang et al., 2005). Citral was also shown to have antifungal activity (Yamasaki et al., 2007), antibacterial activity (Fisher et al., 2007), and activity against the phytonematodes *Bursaphelenchus xylophilus*, *Meloidogyne incognita* (Bauske et al., 1994; Choi et al., 2007) and the larvae of *Anisakis simplex* (Hiero et al., 2006).

In this study, the EsEO presented activity against *H. contortus*, and effectively targeted eggs and larval development of the parasite. The results obtained in *in vitro* tests are superior to other plants tested previously. It was shown that 12.5 and 50 mg mL⁻¹ of *Melia azedarachta* leaf ethanol extract inhibited 98.24% egg hatching and 91.64% larval development, respectively (Maciel et al., 2006). *Azadirachta indica* ethanol extract inhibited 97% egg hatching and 87.11% larval development at concentrations of 3.12 e 50 mg mL⁻¹ (Costa et al., 2008). *Cocos nucifera* ethyl acetate extract at concentrations of 5

and 80 mg mL⁻¹ inhibited 100% and 97.7% egg hatching and larval development, respectively (Oliveira et al., 2009).

The promising results obtained *in vitro* tests with EsEO were followed by toxicological studies in order to determine the safety margin and to study the effects of EsEO on live organisms. In the present work, *E. staigeriana* essential oil had high LD50 values when orally administered, and showed low acute toxicity. By convention, any substance having an LD50 value equal to 1000 mg kg⁻¹ when administered by the oral route is regarded as being safe or of low toxicity (Clarke and Clarke, 1977). We did not observe similar results when EsEO was administered by the intraperitoneal route. The difference observed between the LD50 values in oral and intraperitoneal routes of administration may be explained by the fact that oral administration results in lower absorption of the substance through the gastrointestinal tract. Alternatively, the substance may be detoxified during liver passage after oral administration, while intraperitoneal absorption is systemic and toxic effects are seen faster and with more intensity (Loomis and Hayes, 1996). The high LD50 values obtained indicate that EsEO can be safely administered orally.

In the subacute toxicity study, the treated group presented significant reduction of the hematological parameters CTH, Ht and Hb. However these values dropped within the normal limits (Mitruka and Rawnsley, 1977; Feres et al., 2006) and results are considered normal for this animal species. Biochemical evaluation is important because kidney and liver toxicity have been reported following the use of phytotherapeutic products (Hilaly et al., 2004; Isnard et al., 2004; Saad et al., 2006). In the present study, significant alterations of the levels of AST/ALT, urea and creatinine were not observed with EsEO administration. This result indicates that kidney and hepatic functions were preserved.

The accompaniment of increased mouse corporal mass is an important indicator of the toxicity of a substance (Teo et al., 2002). The lack of statistical difference among the weights of mice in the various treatment groups is another parameter that indicates low toxicity of EsEO. Thus, our results suggest that EsEO produced no toxicity during the treatment period.

We performed an anthelmintic test in mice in order to estimate a dose for therapeutic use in the target species. We found that EsEO anthelmintic activity is similar to febendazole, which was used as a positive control. The efficacy of a plant preparation can

be considered biologically significant when a reduction in worm burden is above 70% (Gitriori et al., 2003). Another study using mice naturally infected with *S. obvelata* and *A. tetraptera*, found that 800 mg kg⁻¹ *Lippia sidoides* and *Croton zehntneri* essential oils were respectively 46% and 11% effective at reducing worm burden (Camurça-Vasconcelos et al., 2007). *Mentha longifolia* and *Jasminum fruticans* extracts at a dose of 100 mg kg⁻¹ were over 60% effective (Kozan et al., 2006) and *Punica granatum* and *Syzygium cuminii* extracts at a dose of 240 mg kg⁻¹ were respectively 67% and 78% effective (Michelin et al., 2005). The use of this model of activity evaluation is recommended to obtain trustworthy and reproducible results (Kozan et al., 2006). One disadvantage the target species are nematodes from gastrointestinal tract of small ruminants and mice nematodes have as habitat large intestine. Nonetheless, testing effectiveness against nematodes in mice is useful for dose extrapolation in the target species.

The high efficacy of EsEO toward mice nematodes, as well as its low cost, prompted us to test EsEO on goat gastrointestinal nematodes. FECRT is the recommended method for *in vivo* evaluation of plant anthelmintic activity and some extracts have already yielded encouraging results. *Khaya senegalensis*, *Calotropis procera* and *Hilderbrandtia sepulosa* promoted epg reductions of 71%; 88.4% and 90%, respectively (Ademola et al., 2004; Gathuma et al., 2004; Iqbal et al., 2005). Different efficacies obtained for mice and goat nematodes can be explained by different distribution and biotransformation mechanisms of *E. stangeriana* essential oil in the two animal species.

The high prevalence of *Trichostrongylus* spp in goats can probably be attributed to the use of selective treatment like FAMACHA, which focuses on the management of *H. contortus* infections in sheep and goats, based on the clinical identification of anemia (Jackson and Miller, 2006).

However, in the majority of cases, the anthelmintic activity of plants has been found to be lower than that reported for synthetic anthelmintics. Although this might not necessarily be a problem, criteria should be established in order to evaluate whether the anthelmintic activity is adequate to ensure that animals do not compromise their health and growth as a result of parasitism (Githiori et al., 2006). Plants with moderate anthelmintic activity should still be considered. While they may not be useful as a sole alternative to anthelmintic drugs, they may still be valuable as part of an integrated approach specifically designed to achieve sustainable parasite control in ruminant production systems. The role

of plants in extending the use and increasing efficacy of commercial existing anthelmintics should be explored, particularly in plants that might help in reversing resistance (Githiori et al., 2006).

The low epg reduction obtained with ivermectin indicates the presence of resistant nematodes. This is a common situation in Brazil and elsewhere (Melo et al., 1998; Schnyder et al., 2005; Camurça-Vasconcelos et al., 2008). The use of *E. staigeriana* essential oil would be justified even with effectiveness less than 95%, especially in situations where the synthetic anthelmintic was not recommended, such as on organic farms, in milk-producing animals, or when the cost is not compensatory.

Conclusion

E. staigeriana essential oil was shown *in vitro* and *in vivo* to possess anthelmintic activity at the concentrations and dose levels tested. However, its efficacy does not reach the therapeutically required level of synthetic anthelmintics. Classes of secondary metabolites found in the current experiment are considered sources of chemical components responsible for a wide range of therapeutic activities in several medicinal plants. Further investigation of isolated fractions at different dose levels should be pursued.

Acknowledgements

This work received financial support from CAPES and BNB/ETENE. Dr. Bevilaqua has a grant from CNPq. We would like to thank Felipe Cavalcante Machado and Helena Araújo da Ponte of EMBRAPA/CNPC for their assistance and Bioterium of Ceará State University.

References

Ademola, I.O., Fagbemi, B.O., Idowu, S.O., 2004. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 122, 151-164.

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 631-639.

Bauske, E.M., Rodríguez-Kábana, R., Estaún, V., Kloepper, J.W., Robertson, D.G., Weaver, C.F., King, P.S., 1994. Management of *Meloidogyne incognita* on cotton by use of botanical aromatic compounds, *Nematropica* 24, 2.

Bennet-Jenkins, E., Bryant, C., 1996. Novel Sources of Anthelmintics. *International Journal for Parasitology* 26, 937-947.

Bizimenyera, E.S., Githiori, J.B., Eloff, J.N., Swan, G.E., 2006. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 142, 336–343.

Brito, J.P., Oliveira, J.E.M., De-Bortoli, S.A., 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da terra* 6, 96-103.

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., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology* 148, 288-294.

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. *Veterinary Parasitology* 154, 167-170.

Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H. T.; Leite, R. C.; Furlong, J.; Fortes, I. C. P., 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 39, 247-253.

Choi, I.H., Kim, J., Shin, S.C., Park, I.K., 2007. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Russian journal of Nematology* 14, 35-40.

Clarke, E.G.C., Clarke, M.L., 1977. *Veterinary Toxicology*. Cassel and Collier Macmillan Publishers, London, pp. 268–277.

Coles, G. C. C., Bauer, F. H. M., Borgsteede, S., Geerts, T. R., Klei, M. A., Taylor, Waller, P. J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 44, 35-44.

Costa, C.T.C., Bevilaqua, C.M.L., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Maciel, M.V., Morais, S.M., Castro, C.M.S., Braga, R.R., Oliveira, L.M.B., 2008. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research* 74, 284-287.

Donald, A.D., 1994. Parasites, animal production and sustainable development. *Veterinary Parasitology* 54, 27-47.

Dupont, S., Caffin, N., Bhandari, B., Dykes, G.A., 2006. *In vitro* antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. *Food Control* 17, 929-932.

Equale, T., Tilahun, G., Debelli, A., Feleke, A., Makonnen, E., 2007. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 428-433.

Erler, F., Ulug, I., Yalcinkaya, B., 2006. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia* 77, 491-494.

F'Eres, C.A.O., Madalosso, R.C., Rocha, O.A., Leite, J.P.V., Guimarães, T.M.D.P., Toledo, V.P.P., Tagliati, C.A., 2006. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 450-456.

Fisher, K., Rowe, C., Phillips, C.A., 2007. 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* 44, 495-499.

Gathuma, J.M., Mbaria, J.M., Wanyama, J., Kaburia, H.F.A., Mpoke, L., Mwangi, J.N., Healers, S., Healers, T., 2004. Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 7-12.

Githiori, J.B., Hoglund, J., Waller, P.P., Baker, R.L., 2003. The anthelmintic efficacy of the plant, *Albizia anthelmintica*, against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Veterinary Parasitology* 116, 23-34.

Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 308-320.

Hasegawa, T., Takano, F., Takata, T., Niiyama, M., Ohta, T., 2008. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globules*. *Phytochemistry* 69, 747-753.

Hierro, I., Valero, A., Navarro, M.C., 2006. *In vivo* larvicidal activity of monoterpene derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine* 13, 527-531.

Hilaly, J., El Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 43-50.

- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record* 151, 442-446.
- Iqbal, Z., Lateef, M., Ashraf, M., Jabbar, A., Muhammad, G., Khan, M.N., 2005. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) flowers in sheep. *Journal of ethnopharmacology* 102, 256-261.
- Isnard, B.C., Deray, G., Baumelou, A., Le Quintree, M., Vanherweghem, J.L., 2004. Herbs and the kidney. *American Journal of Kidney Diseases* 44, 1-11.
- Jackson, F., Miller, J., 2006. Alternative approaches to control- Quo vadit? *Veterinary Parasitology* 139, 371-384.
- Kozan, E., Kupeli, E., Yesilada, E., 2006. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their in vivo anthelmintic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 211-216.
- Lee, S., Peterson, C.J., Coats, J.R., 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *Journal of Stored Products Research* 39, 77-85.
- Loomis, T. A., Hayes, A.W., 1996. *Loomis's Essentials of Toxicology*. 4^aed. San Diego. 1996.
- Maciel, M.V., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Costa, C.T.C., Castro, C.M.S., 2006. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 140, 98-104.
- Matos, F.J.A., 1995. A validação de novas drogas e plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmácia* 76, 90-92.
- Melo, A.C.F.L., Bevilaqua, C.M.L., Selaive-Villaroel, A.B., Girão, M.D., 1998. Resistência a anti-helmínticos em nematódeos gastrintestinais de ovinos e caprinos no município de Pentecoste, Estado do Ceará. *Ciência Animal* 8, 7-11.
- Michelin, D.C., Moreschi, P.E., Lima, A.C., Nascimento, G.G.F., Paganelli, M.O., Chaud, M.V., 2005. Avaliação da Atividade Anti-helmíntica de Extratos Vegetais. *Saúde em Revista* 7, 7-10.
- Mitruka, B.M., Rawnsley, H.M., 1977. *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals*. Masson Publishing, New York, 1977.
- 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., 2009. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 159, 55-59.

Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M., Luciano, J.H.S., 2002. Anthelmintic activity essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 109, 59-63.

Prates, H.T., Santos, J.P., Waquil, J.M., Fabris, J.D., Oliveira, A.B., Foster, J.E., 1998. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal Stored Production Research* 34, 243-249.

Ramezani, H., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2002. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia* 73, 261-262.

Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613.

Roberts, F.H.S., O'Sullivan, P.J., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 1, 99-102.

Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, S., 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 3, 433-439.

Salari, M.H., Amine, G., Shirazi, M.H., Hafezi, R., Mohammadypour, M., 2006. Antibacterial effects of Eucalyptus globules leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 178-196.

Salgado, A.P.S., Cardoso, M.G., Souza, P.E., Souza, J.A., Abreu, C.M., Pinto, J.E., 2003. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana* *Ciências Agrotécnicas* 27, 249-254.

Schnyder, M., Torgerson, P.R., Schonmann, M., Kohler, L., Hertzberg, H., 2005. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Veterinary Parasitology* 128, 285-290.

Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 277-283.

Teo, S., Stirling D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of Dmethylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 179, 183-196.

Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. JIICA. Tokyo, Japan. 143p.

Varady, M., Corba, J., 1999. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Veterinary Parasitology* 80, 239-249.

Vitti, A.M.S., Brito, J.O., 2003. Óleo essencial de eucalipto (Documentos florestais). Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo 17.

Willis, H.H., 1927. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medicinal Journal Austric* 8, 375–376.

Yamasaki, Y., Kunoh, H., Yamamoto, H., Akimitsu, K., 2007. Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *Journal Gen Plant Pathology* 73, 168–179.

Yang, P., Ma, Y., Zheng, S., 2005. Adulticidal Activity of Five Essential Oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Journal of Pesticide Science* 30, 84-89.

Capítulo III

ARTIGO

EVALUATION OF *Eucalyptus citriodora* ESSENTIAL OIL ON GOAT GASTROINTESTINAL NEMATODES

**(Avaliação do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre nematóides
gastrintestinais de caprinos)**

Artigo submetido ao periodico: Veterinary Parasitology

Iara T. F. Macedo^a, Claudia M L Bevilaqua^{a*}, Lorena M. B. de Oliveira^a, Ana L. F.
Camurça-Vasconcelos^a, Luiz da S. Vieira^b, Adriana da R. Tomé^a, Michelline V. Maciel^a,
Bruno G. Portela^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Brazil;

^bEMBRAPA/CNPC, Brazil.

EVALUATION OF *Eucalyptus citriodora* ESSENTIAL OIL ON GOAT GASTROINTESTINAL NEMATODES

Resumo

Fitoterapia é uma das estratégias alternativas para o controle de parasitas gastrintestinais. Este estudo avaliou a eficácia anti-helmintica e a toxicidade do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* (OEEC). Os efeitos *in vitro* do OEEC foram determinados através do teste de eclosão de ovos e inibição do desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*. Na toxicidade aguda camundongos receberam diferentes doses de OEEC através das vias oral e intraperitoneal (v.o. e i.p.) para calcular a dose letal para 50% dos camundongos. Na toxicidade subaguda, ratos receberam 400mg kg⁻¹ OEEC v.o. durante 30 dias. Foram administrados 500 e 1000 mg kg⁻¹ OEEC v.o. durante cinco dias para avaliar o efeito sobre nematóides intestinais de camundongos. Foi realizado o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) usando 30 caprinos infectados com nematóides gastrintestinais divididos nos seguintes grupos: Grupo 1- 500mg kg⁻¹ OEEC; Grupo 2- 0,2 mg kg⁻¹ ivermectina e Grupo 3-controle não tratado. Amostras de fezes foram coletadas de cada animal para determinar opg nos dias 8, 15 e 22 pós-tratamento. Os resultados mostraram que 5,3 e 10,6 mg mL⁻¹ OEEC inibiram em 98,8% e 99,71% a eclosão de ovos e o desenvolvimento larvar de *H. contortus*, respectivamente. As DL50 da toxicidade aguda foram 4153 e 622,8 mg kg⁻¹ pela via oral e intraperitoneal, respectivamente. Na toxicidade subaguda, todos os parâmetros bioquímicos e hematológicos encontrados estavam dentro da variação normal. Análise hirtopatologica dos órgãos não apresentou alterações. Na concentração de 1000 mg kg⁻¹, o óleo essencial foi efetivo em 82,74% contra *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*, parasitos de camundongos. No FECRT, a eficácia de OEEC e ivermectina foi de 58% e 0%, respectivamente, em caprinos 15 dias após o tratamento. Óleo essencial de *E. citriodora* mostrou atividade anti-helmintica *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Fitoterapia, anti-helmintico, *Haemonchus contotus*, *Trichostrongylus* spp, toxicidade.

Abstract

Phytotherapy can be an alternative strategy for the control of gastrointestinal parasites. This study evaluated the anthelmintic efficacy and toxicity of *Eucalyptus citriodora* essential oil (EcEO). The *in vitro* effects of EcEO were determined through the egg hatching test and larval development inhibition of *Haemonchus contortus*. In the acute toxicity test, mice received different doses of *E. citriodora* essential oil by oral and intraperitoneal routes (vo and ip) to calculate the lethal dose for 50% of the mice. In the subacute toxicity test, rats received 400mg kg⁻¹ EcEO vo during 30 days. 500 and 1000 mg kg⁻¹ EcEO were administrated orally for five days to evaluate its effect on mice intestinal nematodes. The fecal egg reduction count test (FECRT) was performed using 30 goats infected with gastrointestinal nematodes, divided into groups as follows: Group 1: 500 mg kg⁻¹ EcEO, Group 2: 0.2 mg kg⁻¹ ivermectin, and Group 3: untreated control. Fecal samples were collected from each animal to determine epg at 8, 15 and 22 days after treatment. The results showed that 5.3 and 10.6 mg mL⁻¹ EcEO inhibited 98.8% and 99.71% of *H. contortus* egg hatching and larval development respectively. The LD50 levels for acute toxicity were 4.153 and 622.8 mg kg⁻¹ given orally and intraperitoneally, respectively. In the subacute toxicity test, all biochemical and hematological parameters were found to be in the normal range. Histopathological analysis of organs did not present alterations. At a concentration of 1000 mg kg⁻¹, essential oil was 82.74% effective against the mice parasites *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*. In the FECRT, the efficacy of EcEO and ivermectin was 58% and 0% respectively, on goat gastrointestinal nematodes 15 days after treatment. *E. citriodora* essential oil showed *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity.

Keywords: Phytotherapy, anthelmintic, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus* spp, toxicity.

Introduction

Gastrointestinal nematode infections are a major factor reducing the economic productivity of livestock throughout the world (Vieira, 2008). These parasites are responsible for severe weight loss, diarrhea, anemia and early mortality, all of which cause

production losses, especially in small ruminants (Diehl et al., 2004). Synthetic anthelmintics have been used to minimize the losses caused by helminth infections. However, intensive use has led to the global emergence of multiple resistance to anthelmintic drugs in small ruminant nematodes (Jackson and Miller, 2006). Therefore, the search for new nematocidal substances remains a priority (Geary et al., 1999). Substances produced from plants may represent an alternative to control gastrointestinal nematodes, since they have the advantage of sustainable supply and are ecologically acceptable (Costa et al., 2008). The use of medicinal plants has been reported in treating various ailments, increasing interest in ethnomedical and ethnoveterinary cures (Bizimenyera, 2006).

Eucalyptus citriodora (Myrtaceae) is a plant native to Australia, and is widely cultivated around the world. It is the most common species used in Brazil for extraction of essential oil (Hasegawa et al., 2008). Hot water extracts of dried leaves of *Eucalyptus citriodora* are traditionally used as analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic remedies for the symptoms of respiratory infections, such as colds, flue and sinus congestion (Silva et al., 2003). The essential oil from the leaves is purported to have multiple medicinal applications, including use as anti-fungal and antibacterial agents (Cimanga et al., 2002; Ramezani et al., 2002; Bonaldo et al., 2007). There are also reports demonstrating its activity against the tick *Boophilus microplus* (Chagas et al., 2002), Coleopteros such as *Acanthoscelides obtectus* (Mazzonetto and Vendamim, 2003), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Brito et al., 2006), and against the phytonematode *Meloidogyne incognita* (Pandey et al., 2000).

The aim of this study was to evaluate the potential anthelmintic effect of *E. citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes.

Materials and Methods

Essential oil obtention

Eucalyptus citriodora essential oil (EcEO) was purchased from Dierberger Óleos Essenciais Ltda. To increase the aqueous solubility, the oil was diluted in 3% Tween 80.

Chemical analysis

The chemical composition of the EcEO used in this study was determined by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). The oil was analyzed on a Velocity

XPT using the following experimental conditions: DB 5ms fused silica capillary column - carrier gas – hydrogen; injector temperature – 250°C; detector temperature – 250°C; column temperature – 50°C (6 min), 500-200°C, at 3°C/min. The samples were analyzed by GC–MS in a QP2010, with impact electronic in 70 and V. The identification of the constituents was performed by a computer-based library search, as well as retention indices and visual interpretation of the mass spectra.

Egg hatching test

The egg hatching test was performed based on the methodology described by Coles et al. (1992). Sheep experimentally infected with *H. contortus* were used as a source of fresh eggs of this parasite. *H. contortus* eggs were recovered according to Hubert and Kerboeuf (1992). Briefly, 10 g of feces collected directly from the rectum, were mixed with distilled water and filtered through 590, 149, 101 and 30 µm mesh sieves. 250 µl of egg suspension, containing approximately 100 fresh eggs, and 250 µl of EcEO at concentrations of 0.33, 0.66, 1.32, 2.65 and 5.3 mg ml⁻¹ were incubated for 48 h at room temperature. After this time, drops of Lugol were added. The eggs and first larval stage (L1) were counted under a microscope. This test had two controls: a negative containing the diluent (3% Tween 80) and a positive control, 0.025 mg ml⁻¹ of thiabendazole. Three repetitions with five replicates for each *E. citriodora* essential oil concentration and for each control were performed.

Larval development test

An aliquot of egg suspension obtained according to Hubert and Kerboeuf (1992) was incubated for 24 h at 37°C to obtain the L1. The larval development test (LDT) was performed using 1 ml of larval suspension containing approximately 250 L1, and 1 ml of EcEO at concentrations of 0.66, 1.32, 2.65, 5.3 and 10.6 mg ml⁻¹, incubated with 2 g of feces from a nematode-free sheep for 6 days at room temperature. Then the third-stage larvae (L3) were recovered according to Roberts and O'Sullivan (1950) and counted under a microscope. This test had two controls, a negative with 3% Tween 80 and a positive with 0.008 mg ml⁻¹ ivermectin. Three repetitions with five replicates for each oil concentration and for each control were conducted.

Toxicity tests

The care and handling of the animals were in accordance with the internationally accepted standard guidelines for use of animals, and the protocol was approved by the Ethics Committee of Ceará State University (number: 08332518-2).

Acute toxicity in mice

Swiss albino mice (n=96) of both sexes, with average weight of 27.5g, were kept in polypropylene boxes and fed with commercial feed and water *ad libitum*. The mice were randomly divided into 12 groups (n = 8): G1 to G5 – received 2000, 3000, 4000, 5000 and 6000 mg kg⁻¹ EcEO by oral administration; G6 – 3% Tween 80 by the same route; G7 to G11 – 300, 400, 500, 600, and 700 mg kg⁻¹ EcEO by intraperitoneal administration; and G12 – 3% Tween 80 by intraperitoneal administration. The animals were observed for general behavioral changes, signs of toxicity and mortality for 6 h after treatment. After 24 h, the total number of dead animals was verified and the lethal doses were calculated (LD10 and LD50).

Subacute toxicity in rats

Female Wistar albino rats weighing 190-260g were housed in polypropylene cages and fed with commercial feed and water *ad libitum*. The animals were randomly divided into two groups (n=10). Group I received the dose corresponding to EcEO LD10 obtained in the acute toxicity study and group II, the control, received only the vehicle (3% Tween 80). The treatments were administered daily by gavage for 30 days. Toxic manifestations and mortality were monitored daily. At the end of the 30-day period, the body weights were recorded. Blood samples were obtained by retro-orbital puncture under diethyl ether anesthesia for hematological and biochemical analysis, on day zero and again at the end of the experiment. The hematological parameters analyzed were red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (Plt), white blood cell count (WBC) and white blood cell differential count (segmented neutrophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes).

Serum creatinine, urea, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined enzymatically using specific kits by

measurement of the optical density of the reaction products at the corresponding wavelength with a spectrophotometer (BioSystems BTS-310 photometer). After 30 days the animals were sacrificed and the organs, kidneys, heart, liver, spleen and lungs were collected. The selected organs were removed, macroscopically analyzed, fixed and preserved in 10% formalin for histopathological analysis. The tissues were soaked in paraffin and prepared and stained with haematoxylin and eosin for microscopic examination.

Efficacy test on mouse intestinal nematodes

Thirty -two Swiss albino mice with natural intestinal nematode infections were allocated in standard polypropylene cages (40 cm x 34 cm x 17 cm). Every week, feces were collected from the cages to determine the infection level of *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*, according to the method of Willis (1927).

The mice were randomly distributed into four groups (n = 8) and treated by gavage during five days with the following preparations: G1 – water (negative control); G2 – 0.56 mg kg⁻¹ fenbendazole; G3 – 500 mg kg⁻¹ EcEO; G4 – 1000 mg kg⁻¹ EcEO. Seven days after treatment, the mice were sacrificed and submitted to necropsy for parasite recovery. The large intestine of each animal was opened into a Petri dish and examined under a stereoscopic microscope in order to collect the parasites. The nematodes recovered were placed in glass containers and fixed in AFA solution (alcohol + formol + acetic acid), counted and identified under a microscope.

Fecal egg count reduction test (FECRT)

Thirty goats of both sexes, aged from 12 to 16 months and weighing 30 kg on average, from the Embrapa research farm in Sobral municipality, a semi-arid region of northeastern Brazil, were kept in paddocks and fed with fresh grass, mineral salt and water *ad libitum*, from May to September 2008.

Individual fecal samples were collected to determine the level of gastrointestinal nematode infection using a modified McMaster technique (Ueno and Gonçalves, 1998). The goats were inoculated with a single dose of 1500 *H. contortus* L3 when the egg count per gram of feces (epg) was less than 1000. After 21 days, another epg analysis was carried out and the goats were divided into three homogeneous groups (mean group epg of 6000)

(n = 10). Each group was administered the following treatments: G1 – untreated animals; G2 – 0.2 mg kg⁻¹ ivermectin; and G3 – 500 mg kg⁻¹ EcEO. Fecal samples from each animal were collected on treatment day 0 and on days 8, 15 and 22 post-treatment to determine the epg. Coprocultures were performed according to the method of Roberts and O’Sullivan (1950).

Statistical analysis

The results of the *in vitro* tests were expressed as mean percentage of egg hatching or larval development inhibition ± standard error. The analysis was performed using ANOVA and compared by the Tukey test ($P < 0.05$) using the Graph Pad Prism program. The effective concentrations to inhibit 50% (EC50) of egg hatching and larval development were determined by the probit method using SPSS 8.0 for Windows.

The lethal doses required to kill 50% (DL50) and 10% (DL10) of the mice were calculated for each administration route from the acute toxicity study by the probit method using SPSS 8.0 for Windows.

The subacute toxicity results were analyzed by ANOVA and compared by the Tukey test ($P < 0.05$) using the Graph Pad Prism 3.0 program.

The efficacy of EsEO on mouse intestinal nematodes was calculated by the following formula: (worm burden of negative control group - worm burden of treated group) / worm burden of negative control group X 100. The results were analyzed by ANOVA and compared by the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) using the Graph Pad Prism 3.0 program.

The FECRT efficacy was calculated according to Coles et al. (1992). The results were analyzed using ANOVA and the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Results

Egg hatching and larval development inhibition were dose dependent. Table 1 shows the mean efficacy according to the egg hatching and larval development tests using EcEO. The EC50 for egg hatching and larval development inhibition were 1.14 (0.67 – 2.01) mg ml⁻¹ and 2.71 (2.00 – 3.69) mg ml⁻¹, respectively.

Table 1. Mean percentage efficacy \pm standard error of *Eucalyptus citriodora* essential oil on *Haemonchus contortus* egg hatching (EHT) and larval development (LDT).

Concentrations (mg ml ⁻¹)	EHT	LDT
10.6	-	99.71 \pm 0.11A
5.3	98.8 \pm 0.43A	87.92 \pm 1.90B
2.65	97.78 \pm 0.40AE	46.93 \pm 2.14C
1.32	48.72 \pm 3.26B	7.08 \pm 1.68D
0.66	14.31 \pm 0.99C	3.35 \pm 1.32D
0.33	7.78 \pm 1.08D	-
Tween 80 (3%)	3.12 \pm 0.45D	3.5 \pm 0.57D
Positive Control*	92.7 \pm 1.28E	99.81 \pm 0.1A

Capital letters compare means in the lines. Different letters indicate significantly different values ($P < 0.05$). * Positive control for EHT was 0.025 mg ml⁻¹ thiabendazole and for LDT 0.008 mg ml⁻¹ ivermectin

Table 2 shows the subacute toxicity results obtained from the hematological analyses of mice treated with *E. citriodora* essential oil. The WBC differed statistically in relation to the control ($P < 0.05$) and its values were highest for mice treated with *E. citriodora* on the 30th day.

Table 2. Mean \pm SE of hematological parameters on rats (n=10) treated with 400 mg kg⁻¹ *Eucalyptus citriodora* essential oil over 30 days.

Parameters	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
White blood cell ($\times 10^3$ mm ⁻³)	9.38 \pm 0.51 ^{ab}	9.16 \pm 0.42 ^{ab}	8.44 \pm 0.53 ^a	11.20 \pm 0.61 ^b
Red blood cell ($\times 10^6$ mm ⁻³)	7.58 \pm 0.20 ^a	7.89 \pm 0.17 ^a	7.18 \pm 0.19 ^a	7.59 \pm 0.13 ^a
Hemoglobin concentration (g/dl)	14.30 \pm 0.17 ^a	14.53 \pm 0.18 ^a	13.93 \pm 0.12 ^a	14.33 \pm 0.12 ^a
Hematocrit (%)	44.39 \pm 0.73 ^a	46.30 \pm 0.68 ^a	43.24 \pm 0.56 ^a	44.87 \pm 0.45 ^a
Platelets ($\times 10^3$ mm ⁻³)	881.20 \pm 49.09 ^a	848.40 \pm 46.75 ^a	798.4 \pm 49.76 ^a	849.3 \pm 51.5 ^a
Segmented leukocyte (%)	14.33 \pm 2.04 ^a	21.11 \pm 1.23 ^a	16.90 \pm 1.38 ^a	19.00 \pm 1.63 ^a
Lymphocyte (%)	81.89 \pm 1.85 ^a	73.78 \pm 1.45 ^a	78.60 \pm 1.70 ^a	76.40 \pm 1.42 ^a
Eosinophilic leukocyte (%)	0.77 \pm 0.32 ^a	1.11 \pm 0.45 ^a	0.70 \pm 0.30 ^a	0.20 \pm 0.13 ^a
Monocyte (%)	3.44 \pm 0.29 ^a	4.33 \pm 0.55 ^a	3.60 \pm 0.73 ^a	4.40 \pm 0.52 ^a
Mean corpuscular volume (FL)	58.70 \pm 0.92 ^a	58.80 \pm 0.69 ^a	60.39 \pm 1.02 ^a	59.2 \pm 0.70 ^a
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	18.93 \pm 0.37 ^a	18.46 \pm 0.22 ^a	19.46 \pm 0.37 ^a	18.92 \pm 0.23 ^a
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	32.23 \pm 0.24 ^a	31.40 \pm 0.19 ^a	32.22 \pm 0.16 ^a	31.93 \pm 0.12 ^a

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

In the acute toxicity tests, the LD10 and LD50 calculated for oral administration were 2609 (689.7 – 3466.4) and 4153.2 (2861.8 – 5849.2) mg kg⁻¹, respectively. In the test with intraperitoneal administration, LD10 and LD50 were 478.3 (439.8 – 505) and 622.8 (603.3 – 645.5) mg kg⁻¹, respectively.

The biochemical parameters for subacute toxicity are presented in table 3. All parameters showed no significant alterations between the treated and control groups on 30th day. There was no significant difference between the treated and control groups with respect to the rats' weight. There were no morphologic alterations related to toxicity in the organs analyzed.

Table 3. Effect (mean ± SE) of 400 *Eucalyptus citriodora* essential oil on biochemical parameters of rats (n=10) treated during 30 days.

Parameters	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
AST (UI/l)	99,11±3.80 ^a	58.8±3.96 ^b	101.1±4.18 ^a	67.00±3.54 ^b
ALT (UI/l)	46.00 ±2.92 ^a	25.22±2.45 ^a	45.00±2.35 ^a	25.30±1.68 ^a
Uréia (mg/dL)	59.67±1.53 ^a	44.73±2.07 ^b	61.70±2.40 ^a	48.72±2.28 ^b
Creatinine (mg/dL)	0.63±0.02 ^a	0.41±0.02 ^b	0.68±0.01 ^a	0.48±0.01 ^b

Small letters compare mean in the columns. Different letters indicate significantly different values (P < 0.05).

The effects of EcEO on mouse nematodes are presented in table 4. The efficacy of dose of 500 mg kg⁻¹ EcEO was 69.64% on worm burden reduction and the efficacy of febendazole was 88.09%.

Table 4. Mean efficacy (±SE) of *Eucalyptus citriodora* essential oil and febendazole based on worm burden reduction of mice intestinal nematodes

Treatment	% Efficacy ± SE
<i>E. citriodora</i> (500 mg kg ⁻¹)	69.64± 8.8A
<i>E. citriodora</i> (1000 mg kg ⁻¹)	82.74± 4.75A
Tween 80 (3%)	18.45± 7.27B
Febendazole (0,56 mg kg ⁻¹)	88.09± 5.54A

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

The results obtained by gas chromatography indicated the following main constituents and respective concentrations: beta-pinene (0.8%); beta-citronellol (2.39%); (-)-isopulegol (6.46%); eucalyptol (0.66%); beta-citronellal (57.53%); isopulegol (3.45%); beta-caryophyllene (1.04%); and citronellyl acetate (0.59%).

Table 5 present the results of the FECRT. On day 8 post-treatment, EcEO ($P < 0.05$) and ivermectin ($P < 0.05$) reduced epg significantly. The maximum FECRT observed was 53.5% for ivermectin on day 8 and 58.24% for EcEO on day 15. The larvae identified in coprocultures were *Trichostrongylus* spp and *Haemonchus* spp.

Table 5. Mean efficacy and epg (\pm SE) of 500 mg kg⁻¹ *Eucalyptus citriodora* essential oil and 0.2 mg kg⁻¹ ivermectin based on fecal egg count reduction test in goats.

Tratamentos	Day 0	Day 8	Day 15	Day 22
<i>E. citriodora</i>				
Mean epg	5266 \pm 475.9A ^a	1777 \pm 274.1A ^b	2088 \pm 247.1A ^b	2188 \pm 325.4A ^b
Efficacy (%)	-	25.02	58.24	29.41
Ivermectin				
Mean epg	5280 \pm 1343A ^a	1100 \pm 187.4A ^b	5230 \pm 1147B ^a	1640 \pm 415.9A ^b
Efficacy (%)	-	53.50	00.00	47.09
Water				
Mean epg	3550 \pm 732.2A ^a	2370 \pm 478A ^a	5000 \pm 647.4B ^a	3100 \pm 734.8A ^a

Capital letters compare mean in the lines and small letters compare mean in the columns.

Different letters indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Discussion

We found no previous publications on the anthelmintic activity of the essential oil of *E. citriodora* on parasitic gastrointestinal nematodes. The *in vitro* model reported in this study demonstrated the ovicidal and larvicidal effects of essential oil of *E. citriodora* against *H. contortus*.

The investigation of chemical compounds from natural products is important for the development of new anthelmintic drugs, especially in view of the vast worldwide flora (Assis et al., 2003). In this study, chemical analysis of EcEO identified eight substances that can be responsible for the anthelmintic activity found. In essential oils some components have a higher concentration and are known as major components. Our results

show the predominance of citronellal. This main component showed activity against insects such as the housefly (Lee et al., 2003) and also against females, males and juveniles of the phytonematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Choi et al., 2007).

EcEO inhibited egg hatching and larval development at a low concentration compared to other plants studied previously. Ethyl acetate extract of *Cocos nucifera* at 5 and 80 mg ml⁻¹ concentrations inhibited 100% and 97.7% of egg hatching and larval development (Oliveira et al., 2008). Ethyl acetate extract of *Spigelia anthelmia* inhibited 83.8% of egg hatching and 83.1% of larval development at concentrations of 25 mg ml⁻¹ (Assis et al., 2003). Aqueous extract of *Annona senegalensis* leaves inhibited 11.5% of egg hatching at a concentration of 7.1 mg ml⁻¹ (Alawa et al., 2003).

Since the *in vitro* tests presented good results, the essential oil was submitted to toxicological studies to evaluate its effect and to estimate the dose on live organisms. Substances with LD50 value of 1000 mg kg⁻¹ by the oral route are regarded as being safe or of low toxicity (Clarke and Clarke, 1977). EcEO presented low acute toxicity by the oral route but LD50 by the intraperitoneal route was higher. The difference observed between LD50 values via oral and intraperitoneal administration may be explained by the fact that in oral administration less of the substance is absorbed than from the gastrointestinal tract, or the substance can become detoxified during liver passage, while intraperitoneal absorption is systemic and the toxic effects are produced faster and more intensely (Loomis and Hayes, 1996). The high LD50 values obtained indicate that EcEO can be administered with a high degree of safety.

The subacute toxicity of the treated group presented a significant increase of WBL, however the values dropped within the normal limits (Mitruka and Rawnsley, 1977; Feres et al., 2006). In the present study, no significant alterations were observed with EcEO administration and the hepatic parameters (AST/ALT) and creatinine and urea levels indicate kidney and liver function was preserved. This was also confirmed by the absence of histopathological changes in all the organs analyzed.

Changes in body weights can indicate adverse side effects. Generally, weight loss is a simple and sensitive index of toxicity after exposure to toxic substances (Teo et al., 2002). The absence of statistical differences between mouse weights in this study is another parameter that indicates low toxicity of EcEO. This suggests that EcEO does not produced toxicity in the treatment period.

The anthelmintic activity of EcEO on mouse nematodes was similar to that of febendazole, used as positive control. It is generally considered that the efficacy of a plant preparation is biologically significant when the reduction in worm burden is above 70% (Gitriori et al., 2003). In other studies using mice naturally infected with *S. obvelata* and *A. tetraptera*, the effectiveness of *Tynnanthus fasciculatus* was 57.2% (Amorim et al., 1987), *Chenopodium ambrosioides* was below 20% (Borba and Amorim, 2004) and *Lippia sidoides* and *Croton zehntneri* essential oils was 46% and 11%, respectively (Camurça-Vasconcelos et al., 2007). The use of mice as models to evaluate anthelmintic activity is recommended to obtain reliable and reproducible results (Kozan et al., 2006). Even so, it has the disadvantage that the target nematode species inhabit the gastrointestinal tract of small ruminants and mouse nematodes inhabit the large intestine. However, this test can help researchers extrapolate the dose for the target species.

In the goat coprocultures, there was a high prevalence of *Trichostrongylus* spp. This may be explained by the intensive use of selective treatment of animals by application of FAMACHA system, which is focused on the management of *H. contortus* infections in sheep and goats, based on the clinical identification of anemia in individual animals within a flock (Reis, 2004).

The lack of efficacy detected in the field is similar to the results presented in other works: 1 g kg⁻¹ of powdered raw *Ananas comosus* leaves reduced the epg by 15.3% on 13th day after administration (Hordegen et al., 2003); 3g kg⁻¹ of crude *Zingiber officinale* powder reduced the epg by 25.6% (Iqbal et al., 2006); and 0.90g kg⁻¹ of crude extract of *Coriandrum sativum* reduced the epg by 24.79% (Equale et al., 2007).

Two hypotheses can justify the different efficacy obtained on mouse and goat nematodes. It could be the treatment duration, 5 days in mice and 3 days in goats. Or it could be a difference in the mechanism of distribution and biotransformation of essential oils in monogastric and polygastric animals. This way, the lower efficacy observed by administering oil to goats could also be due to the destruction of active substances by the ruminal flora and/or ruminal pH.

Ivermectin produced a small reduction of FEC, indicating the presence of resistant nematodes, a common fact in northeastern Brazil and elsewhere (Schnyder et al., 2005; Sargison et al., 2007; Kumsa and Abebe, 2008). The use of essential oil would be justified even with effectiveness below 95% in situations where synthetic anthelmintics are not

recommended, such as in organic breeding, dairy production or when the cost is not compensatory. Therefore, the alternative use of plants may be a useful tool associated with other methods to control gastrointestinal nematodes of small ruminants (Camurça-Vasconcelos et al., 2008).

Plants with moderate anthelmintic activity should still be considered, perhaps not as a total alternative to anthelmintic drugs, but as part of an integrated approach specifically designed to achieve sustainable parasite control in ruminant production systems. The role of plants in extending the use and increasing the efficacy of existing anthelmintics thus warrants study (Githiori et al., 2006).

In conclusion, *E. citriodora* essential oil presented promising results, but the efficacy did not reach the therapeutically required level. Further investigation of isolated fractions, at different dose levels, should be pursued.

Acknowledgements

This work received financial support from CAPES and BNB/ETENE. Dr. Bevilaqua has a grant from CNPq. We would like to thank Felipe Cavalcante Machado and Helena Araújo da Ponte of EMBRAPA/CNPC for their assistance and Bioterium of Ceará State University.

References

- Alawa, C.B.I., Adamu, A.M., Gefu, J.O., Ajanusi, O. J., Abdu, P.A., Chiezey, N.P., Alawa, J.N., Bowman, D.D., 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Vet. Parasitol.* 113, 73-81.
- Amorim, A., Borba, H.R., Silva, W.J., 1987. Ação anti-helmíntica de plantas. *Rev. Bras. Farm.* 68, 64-70.
- Assis, L. M., Bevilaqua, C. M. L., Morais, S. M., Vieira, L. S., Costa, C. T. C., Souza, J. A. L., 2003. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 117, 43-49.
- Bizimenyera, E.S., Githiori, J.B., Eloff, J.N., Swan, G.E., 2006. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval

development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 142, 336–343.

Bonaldo, S.M., Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R., Cruzei, M.E.S., Fiori-Tutida, A.C.G., 2007. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathol.* 33, 383-387.

Borba, H.R., Amorim, A., 2004. Ação anti-helmíntica de plantas XIV. Avaliação da atividade de extratos aquosos de *Chenopodium ambrosioides* L. (Erva-de-Santa-Maria) em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13, 133-136.

Brito, J.P., Oliveira, J.E.M., De-Bortoli, S.A., 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Rev. Biol. Cienc. Ter.* 6, 96-103.

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., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet. Parasitol.* 148, 288-294.

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.

Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T., Leite, R. C., Furlong, J., Fortes, I. C. P., 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 39, 247-253.

Choi, I.H., Kim, J., Shin, S.C., Park, I.K., 2007. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Russ. J. Nematol.* 14, 35-40.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79, 213-220.

Clarke, E.G.C., Clarke, M.L., 1977. *Vet. Toxicol.* Cassel and Collier Macmillan Publishers, London, pp. 268–277.

- Coles, G. C. C., Bauer, F. H. M., Borgsteede, S., Geerts, T. R., Klei, M. A., Taylor, Waller, P. J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35-44.
- Costa, C.T.C., Bevilaqua, C.M.L., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Maciel, M.V., Morais, S.M., Castro, C.M.S., Braga, R.R., Oliveira, L.M.B., 2008. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Rumin. Res.* 74, 284-287.
- Diehl, M.S., Atindehou, K.K, Tere, H., Betschart, B., 2004. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *J. Ethnopharmacol.* 95, 277-284.
- Equale, T., Tilahun, G., Debella, A., Feleke, A., Makonnen, E., 2007. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *J. Ethnopharmacol.* 110, 428-433.
- F'Eres, C.A.O., Madalosso, R.C., Rocha, O.A., Leite, J.P.V., Guimarães, T.M.D.P., Toledo, V.P.P., Tagliati, C.A., 2006. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 108, 450-456.
- Geary, T.G., Sangster, N.C., Thompson, D.P., 1999. Frontier in anthelmintic pharmacology. *Vet. Parasitol.* 84, 275-295.
- Githiori, J.B., Hoglund J., Waller, P.P., Baker, R.L., 2003. The anthelmintic efficacy of the plant, *Albizia anthelmintica*, against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Vet. Parasitol.* 116, 23-34.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.* 139, 308-320.
- Hasegawa, T., Takano F., Takata T., Niiyama, M., Ohta, T., 2008. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globules*. *Phytochemistry* 69, 747-753.
- Hordegen, P., Hertzberg, H., Heilmann, J., Langhans, W., Maurer, V., 2003. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. *Vet. Parasitol.* 117, 51-60.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 151, 442-446.

- Iqbal, Z., Lateef, M., Akhtar, M.S., Ghayur, M.N., Gilani, A.H., 2006. *In vivo* anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematode of sheep. *J. Ethnopharmacol.* 106, 285-287.
- Jackson, F., Miller, J., 2006. Alternative approaches to control- Quo vadit? *Vet. Parasitol.* 139, 371-384.
- Kozan, E., Kupeli, E., Yesilada, E., 2006. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their *in vivo* anthelmintic activity. *J. Ethnopharmacol.* 108, 211-216.
- Kumsa, B., Abebe, G., 2008. Multiple anthelmintic resistance on a goat farm in Hawassa (southern Ethiopia). *Trop. Anim. Health Prod.* DOI 10.1007/s11250-008-9237-z, 2008.
- Lee, S., Peterson, C.J., Coats, J.R., 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored. Prod. Res.* 39, 77-85.
- Loomis, T. A., Hayes, A.W., 1996. *Loomis's Essentials of Toxicology*. 4^{ed}. San Diego. 1996.
- Mazonetto, F., Vendramim, J.D., 2003. Efeito de Pós de Origem Vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em Feijão Armazenado. *Neotrop. Entomol.* 32, 145-149.
- Mitruka, B.M., Rawnsley, H.M., 1977. *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals*. Masson Publishing, New York, 1977.
- 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., 2009. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 159, 55-59.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H. N., Kumar, S., 2000. Essential oils as potent sources of nematicidal compounds *J. Phytopathol.* 37, 490-491.
- Ramezani, H., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2002. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia* 73, 261-262.
- Reis, I.F., 2004. Controle de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes: método estratégico *versus* FAMACHA. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, Brasil, 80pp.
- 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.

- Sargison, N.D., Jackson, F., Bartley, D.J., Wilson, D.J., Stenhouse, L.J., Penny, C.D., 2007. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Vet. Parasitol.* 145, 65-76.
- Schnyder, M., Torgerson, P.R., Schönmann, M., Kohler, L., Hertzberg, H., 2005. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 128, 285-290.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* 89, 277-283.
- Teo, S., Stirling D., Thomas, S., Hoberman A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of Dmethylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology* 179, 183–196.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. JIICA. Tokyo, Japan. 143p.
- Vieira, L. S., 2008. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnol. Ciênc. Agropec.* 2, 49-56.
- Willis, H.H., 1927. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medicin. J. Austric.* 8, 375–376.

9. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *E. staigeriana* e *E. globulus* apresentaram eficácia *in vitro*, tanto ovicida como larvicida sobre *H. contortus*.

Com relação aos testes *in vivo*, os óleos *E. staigeriana* e *E. citriodora* apresentaram baixa eficácia anti-helmíntica, sendo semelhantes ao grupo controle tratado com anti-helmíntico sintético em se tratando de populações resistentes.

10. PERSPECTIVAS

A partir desse trabalho surgem novas perspectivas para a utilização dos óleos essenciais de *Eucalyptus*, sendo necessários novos estudos para encontrar doses, formulações e vias de administração que possibilitem potencializar a sua atividade anti-helmíntica *in vivo*.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology* v. 122, p. 151-164, 2004.

ADEMOLA, O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of extract against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, v.101, p.63-69, 2007.

ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J.; ABDU, P.A.; CHIEZEY, N.P.; ALAWA, J.N.; BOWMAN, D.D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology*, v.113, p. 73-81, 2003.

AMORIM, A.; BORBA, H.R.; SILVA, W.J. Ação anti-helmíntica de plantas. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 68, p. 64-70, 1987.

AROSEMENA, N.A.E.; BEVILAQUA, C.M.L.; MELO, A.C.F.L.; GIRÃO, M.D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. *Revue Médecine Vétérinaire*, v. 150, p. 873-876, 1999.

ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S.; COSTA, C. T. C.; SOUZA, J. A. L. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p. 43-49, 2003.

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

ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal*, v. 1, p. 1392-1400, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.446-475, 2008.

BARBOZA, R.R.D; SOUTO, W.M.S.; MOURÃO, J.S. The use of zoonotherapeutics in folk veterinary medicine in the district of Cubati, Paraíba State, Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v.3, p. 1-14, 2007.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2ª ed. São Paulo, Atheneu Editora, p. 57-67, 2003.

BAUSKE, E.M.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; ESTAÚN, V.; KLOEPPER, J.W.; ROBERTSON, D.G.; WEAVER, C.F.; KING, P.S. Management of Meloidogyne incógnita on cotton by use of botanical aromatic compounds. *Nematropica*, v.24, 1994.

BENNET-JENKINS, E.; BRYANT, C. Novel Sources of Anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, v.26, p. 937-947, 1996.

BIZIMENYERA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. 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, p. 336-343, 2006.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZI, M.E.S.; FIORI-TUTIDA, A.C.G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathology*, v. 33, p. 383-387, 2007.

BORBA, H.R.; AMORIM, A. Ação anti-helmíntica de plantas XIV. Avaliação da atividade de extratos aquosos de *Chenopodium ambrosioides* L. (Erva-de-Santa-Maria) em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, p. 133-136, 2004.

BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; DE-BORTOLI, S.A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da terra*, v. 6, 2006.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILÁQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 7, p. 97-106, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

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. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, v.148, p. 288-294, 2007.

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.

CARMELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses. *Current Microbiology*, v.56, p. 89-92, 2008.

CARSON, C.F.; RILLEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.78, p.264-269, 1995.

CHA, J.D.; JUNG, E.K.; KIL, B.S.; LEE, K.Y. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Artemisia feddei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 2061-2065, 2007.

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*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, p.247-253, 2002.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, p. 156-160, 2004a.

CHAGAS, A.C.S. Ação ovicida de produtos a base de eucalipto sobre helmintos de caprinos. *Anais do XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses*. p.168, 2004b.

CHOI, I.H.; KIM, J.; SHIN, S.C.; PARK, I.K. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Russian journal of Nematology*, v.14, p. 35-40, 2007.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 79, p. 213-220, 2002.

CLARKE, E.G.C.; CLARKE, M.L. *Veterinary Toxicology*. Cassel and Collier Macmillan Publishers, London, p. 268-277, 1977.

COLES, G.C.C.; BAUER, F.H.M.; BORGSTEEDE, S.; GEERTS, T.R.; KLEI, M.A.; TAYLOR 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. *Veterinary Parasitology*, v.44, p. 35-44, 1992.

COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; CASTRO, C.M.S.; BRAGA, R.R.; OLIVEIRA, L.M.B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, v.74, p. 284-287, 2008.

CRUZ, J.M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Food Chemistry*, v.90, p. 503-511, 2005.

DIEHL, M.S.; ATINDEHOU, K.K; TERE, H.; BETSCHART, B. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, p.277-284, 2004.

DONALD, A.D. Parasites, animal production and sustainable development. *Veterinary Parasitology*. v. 54, p.27-47, 1994.

DUPONT, S.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B.; DYKES, G.A. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. *Food Control*, v.17, p.929-932, 2006.

EQUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p. 428-433, 2007.

ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*, v.77, p. 491-494, 2006.

ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.S.; PENA, A.P.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Composição química e atividade bacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de eucalyptus cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.11, p.95-100, 2001.

FERES, C.A.O.; MADALOSSO, R.C.; ROCHA, O.A.; LEITE, J.P.V.; GUIMARÃES, T.M.D.P.; TOLEDO, V.P.P.; TAGLIATI, C.A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v.108, p. 450-456, 2006.

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.

FRANCO, J. Prospecção fitoquímica e análise e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v. Muell. Ex.Benth./Myrtaceae (Tese de doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GASBARRE, L.C.; STOUT, W.L.; LEIGHTON, E.A. Gastrointestinal nematodes of cattle in the northeastern US: results of a producer survey. *Veterinary Parasitology*, v.101, p.29-44, 2001.

GATHUMA, J.M.; MBARIA, J.M.; WANYAMA, J.; KABURIA, H.F.A.; MPOKE, L.; MWANGI, J.N.; SAMBURU AND TURKANA HEALERS, Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, v.91, p. 7-12, 2004.

GEARY, T.G.; SANGSTER, N.C.; THOMPSON, D.P. Frontier in anthelmintic pharmacology. *Veterinary Parasitology*, v.84, p.275-295, 1999.

GITHIGIA, S. M.; THAMSBORG, S.M.; MUNYUA, W. K.; MAINGI, N. Impact of gastrointestinal helminths on production in goats in Kenya. *Small Ruminant Research*, v.42, p.21-29, 2001.

GITHIORI, J.B.; HÖGLUND, J.; WALLER, P.J.; BAKER, R.L. The anthelmintic efficacy of the plant *Albizia anthelmintica* against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Veterinary Parasitology*, v.116, p. 23-34, 2003.

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.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary Research Communication*, v.21, p.213-28, 1997.

HASEGAWA, T.; TAKANO, F.; TAKATA, T.; NIYAMA, M.; OHTA, T. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globules*. *Phytochemistry*, v.69, p.747-753, 2008.

HERD, R. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. T. Padilha, Ed. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, p. 95-111, 1996.

HIERRO, I.; VALERO, A.; NAVARRO, M.C. In vivo larvicidal activity of monoterpene derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine*, v.13, p.527-531, 2006.

HILALY, J.; EL ISRAILI, Z.H.; LYOUSSEI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v.91, p.43-50, 2004.

HORDEGEN, P.; HERTZBERG, H.; HEILMANN, J.; LANGHANS, W.; MAURER, V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. *Veterinary Parasitology*, v.117, p.51-60, 2003.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, v. 151, p. 442-446, 1992.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; ASHRAF, M.; JABBAR, A.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.N. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) flowers in sheep. *Journal of ethnopharmacology*, v.102, p. 256-261, 2005.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; AKHTAR, M. S.; GHAYUR, M. N.; GILANI, A. H. *In vivo* anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematode of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, p.285-287, 2006.

ISNARD, B.C.; DERAY, G.; BAUMELOU, A.; LE QUINTREE, M.; VANHERWEGHEM, J.L. Herbs and the kidney. *American Journal of Kidney Diseases*, v.44, p.1-11, 2004.

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

KETZIS, J.K.; TAYLOR, A.; BOWMAN, D.D.; BROW, D.L.; WARNICK, L.D.; ERB, H.N. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. *Small Ruminant Research*, v.44, p.193-200, 2002.

KOZAN, E.; KUPELI, E.; YESILADA, E. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their in vivo anthelmintic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 108, p.211-216, 2006.

KUMSA, B.; ABEBE, G. Multiple anthelmintic resistance on a goat farm in Hawassa (southern Ethiopia). *Tropical animal health and production*, in press, DOI 10.1007/s11250-008-9237-z, 2008.

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.

LEE, B-Ho; ANNIS, P.C.; TUMAALII, F.; CHOI, W.S. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, v. 40, p.553-564, 2004.

LOOMIS, T. A.; HAYES, A.W. *Loomis's Essentials of Toxicology*. 4^aed. San Diego. 1996.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97, p.199-206, 2005.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C.; CASTRO, C.M.S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 140, p. 98-104, 2006.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, v. 1, p. 1371-1391, 2007.

MATOS, F.J.A. A validação de novas drogas e plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmácia*, 76: 90-92, 1995.

MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 41-182, 2007.

MAZZONETTO, F.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de Pós de Origem Vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em Feijão Armazenado. *Neotropical Entomology*, v.32, p.145-149, 2003.

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., BEVILAQUA, C.M.L., SELAIVE-VILLAROEL, A.B., GIRÃO, M.D. Resistência a anti-helmínticos em nematódeos gastrintestinais de ovinos e caprinos no município de Pentecoste, Estado do Ceará. *Ciência Animal*, v. 8, p.7-11, 1998.

MELO, A.C.F.L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F. A.M.; MELO, L.M. Nematóides resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.2, p.339-344, 2003.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos vegetais. *Saúde em Revista*, v.7, p.7-10, 2005.

MITRUKA, B.M.; RAWNSLEY, H.M. *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals*. Masson Publishing, New York, 1977.

MORSY, T.A.; HALIM, A.S.A. The insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* oil on the development of *Musca domestica* third stage larvae. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v.35, p.631-636, 2005.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M.L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 53, p.143-147, 1996.

NAVARRO, M.C.; NOGUERA, M.A.; ROMERO, M.C.; MONTILLA, M.P.; SELGAS, J.M.G.; VALERO, A. Anisakis simplex s.l.: Larvicidal activity of various monoterpene derivatives of natural origin against L3 larvae *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology*, v. 120, p. 295-299, 2008.

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.

OMENA, M. C; NAVARRO, D. M. A. F.; PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

PANDEY, R.; KALRA, A.; TANDON, S.; MEHROTRA, N.; SINGH, H. N.; KUMAR, S. Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. *Journal Phytopathology*, v.37, p. 490-491, 2000.

PAPACHRISTOS, D.P.; STAMOPOULOS, D.C. Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 40, p. 517–525, 2004.

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.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 109, p. 59-63, 2002.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P.; WAQUIL, J.M.; FABRIS, J.D.; OLIVEIRA, A.B.; FOSTER, J.E. Insecticidal Activity of Monoterpenes Against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal Stored Production Research*, v.34, p.243-249, 1998.

RAMEZANI, H.; SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia*. v.73, p.261-262, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, p. 603-613, 2001.

REIS, I.F., 2004. Controle de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes: método estratégico versus FAMACHA. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, Brasil, 80pp.

RICE, P.J.; COATS, J.R. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 87, p. 1172-1179, 1994.

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

ROCHA, M.E.N.; SANTOS, C.L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus Globulus* Labill- Myrtaceae. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 2, p.23-24, 2007.

RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 4, p. 162-166, 2007.

SAAD, B.; AZAIZEH, H.; ABU-HIJLEH, G.; SAID, S. Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v.3, p.433–439, 2006.

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.

SALGADO, A.P.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.; PINTO, J.E. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciências Agrotécnicas*, Lavras. v. 27, p.249-254, 2003.

SANDI, J.T.T.; BLANCO, R.F. Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (MYRTACEAE), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, (Coleoptera: Curculionidae). *Revista de Biologia e Saúde*, v.1, p.93-100, 2007.

SARGISON, N.D.; JACKSON, F. ; BARTLEY, D.J. ; WILSON, D.J. ; STENHOUSE, L.J. ; PENNY, C.D. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Veterinary Parasitology* v.145, p.65-76, 2007.

SCHNYDER, M.; TORGERSON, P.R.; SCHONMANN, M.; KOHLER, L.; HERTZBERG, H. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Veterinary Parasitology*. v. 128, p.285-290, 2005.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 277-283, 2003.

SILVA, A.Z.; CÁRCAMANO, M.C.; MENEZES, A.M.D.; RIBEIRO, P.B. Influência de citral e citronelal, em diferentes concentrações, sobre larvas de musca domestica (diptera: muscidae). In XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS, Pelotas, 2007.

STAMOPOULOS, D.C.; DAMOS, P.; KARAGIANIDOU, G. Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of stored Products Research*, v. 43, p. 571-577, 2007.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied Microbiology*, v.39, p.60-64, 2004.

TEMPLETON, W. An introduction of the chemistry of terpenoids and steroids. In: DUNKEL, F.V. & SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Ssp. *vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. *Journal of Stored Products Research*, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of Dmethylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, v.179, p.183-196, 2002.

TERZI, V.; MORCIA, C.; FACCIOLI, P.; VALE, G.; TACCONI, G.; MALNATI, M. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p.613–618, 2007.

THOMPSON, D. P.; KLEIN, R. D.; GEARY, T. G. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. *Parasitology*, v.113, p. 217-238, 1996.

TRIPATHI, A.K.; PRAJAPATI, V.; AGGARWAL, K.K.; KUMAR, S. Toxicity, Feeding Deterrence, and Effect of Activity of 1,8-Cineole from *Artemisia annua* on Progeny Production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 94, p. 979-983, 2001.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4° ed., JIICA. Tokyo, Japan. 143p., 1998.

VARADY, M.; CORBA, J. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Veterinary Parasitology*. v.80, p.239-249, 1999.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnologia & Ciências Agropecuárias*, 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.

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.

WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medicinal Journal Austric*, v.8, p.375–376, 1927.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; STROUMTSOS, L.Y.; FERTIG, M.N. The Merck Index. In: DUNKEL, F.V.; SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. *Ssp. vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. *Journal of Stored Products Research*, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

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.; VERCRUYSSSE, 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.

YAMASAKI, Y.; KUNOH, H.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *Journal Gen Plant Pathology*, v.73, p.168–179, 2007.

YANG, Y.C.; CHOI, H.Y.; CHOI, W.S.; CLARK, J.M.; AHN, Y.J. Ovicidal and Adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.2507-2511, 2004.

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.

M313a Macedo, Iara Tersia Freitas

Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp sobre nematóides gastrintestinais/ Iara Tersia Freitas Macedo.

__Fortaleza, 2008.

88p. . il.

Orientadora: Prof^a Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Fitoterapia 2. *In vivo* 3. *In vitro* 4. Toxicidade 5. *Haemonchus contortus*

I.Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 615.32