



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PALOMA MATHIAS DO NASCIMENTO

**INFLUÊNCIA DE FITOATIVOS NO CICLO DE VIDA DE *Caenorhabditis elegans* e
Haemonchus contortus: UMA ESTRATÉGIA NA PROCURA DE NOVOS ANTI-
HELMÍNTICOS**

SEROPÉDICA
2026





PALOMA MATHIAS DO NASCIMENTO

INFLUÊNCIA DE FITOATIVOS NO CICLO DE VIDA DE *Caenorhabditis elegans* e
Haemonchus contortus: UMA ESTRATÉGIA NA PROCURA DE NOVOS ANTI-
HELMÍNTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador(a): Dr. Fábio Barbour Scott

Coorientador(a): Dr. Viviane de Souza Magalhães

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N431i NASCIMENTO, Paloma Mathias do, 1996-
Influência de fitoativos no ciclo de vida de
Caenorhabditis elegans e Haemonchus contortus: uma
estratégia na procura de novos anti-helmínticos /
Paloma Mathias do NASCIMENTO. - Seropédica, 2026.
138 f.

Orientador: Fábio Barbour Scott.
Coorientador: Viviane de Souza Magalhães.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, 2026.

1. antiparasitário. 2. óleos essenciais. 3.
sinergia. 4. nematoides. I. Scott, Fábio Barbour,
1966-, orient. II. Magalhães, Viviane de Souza, 1982
, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 1140/2026 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.015670/2026-09

Seropédica-RJ, 06 de abril de 2026.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PALOMA MATHIAS DO NASCIMENTO

**DEFESA INFLUÊNCIA DE FITOATIVOS NO CICLO DE VIDA DE *Caenorhabditis elegans* E
Haemonchus contortus: UMA ESTRATÉGIA NA PROCURA DE NOVOS ANTI-HELMÍNTICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências Veterinárias.

Tese aprovada em 02 de março de 2026.

BANCA EXAMINADORA:

(Assinado digitalmente em 09/04/2026 09:49)

BIANCA FERNANDES GLAUSER

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CoordCGF (12.28.01.00.00.00.39)
Matrícula: ###562#4

(Assinado digitalmente em 07/04/2026 11:12)

DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matrícula: ###050#5

(Assinado digitalmente em 06/04/2026 19:33)

VIVIANE DE SOUZA MAGALHAES

FARMACEUTICO-HABILITACAO
FE (11.39.00.52)
Matrícula: ###463#5

(Assinado digitalmente em 10/04/2026 14:00)

JULIANA CAMACHO PEREIRA

ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.797-##

(Assinado digitalmente em 10/04/2026 13:59)

CAIO MOTA MACHADO

ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.737-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 1140, ano: 2026, tipo: ATA, data de emissão: 06/04/2026 e o código de verificação: dcf96c00a6

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Gregório e Ione, pelo amor, dedicação e pelos inúmeros esforços para me oferecer uma educação de qualidade. Tudo o que sou e construí até aqui tem raízes no apoio incondicional de vocês.

Aos docentes do curso de Doutorado, agradeço a partilha de conhecimentos ao longo desses quatro anos, que contribuíram de forma decisiva para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao meu orientador, Dr. Fábio Barbour Scott, agradeço a oportunidade, orientação e confiança durante esta trajetória. Registro um agradecimento especial à minha coorientadora, Dra. Viviane de Souza Magalhães, presente desde a graduação, cuja dedicação e disponibilidade marcaram profundamente meu percurso acadêmico e pessoal.

Um agradecimento especial à, agora farmacêutica e colega de profissão, Ana Beatriz, pelo apoio constante ao longo de todo o mestrado e doutorado, sempre com parceria, comprometimento e generosidade.

Aos meus amigos do Rio de Janeiro, Ana Paula, Natália, Taynara, Giovanna e Luana, agradeço a amizade que resiste ao tempo e à distância. Levo comigo o carinho e as memórias que nos unem.

Aos amigos que a vida adulta me presenteou, minha sincera gratidão por me sustentarem, fortalecerem e caminharem ao meu lado. Beatriz, Yasmin, Isabella Petrucci, Mirella, Mayara, Karen, Cibele, Karine, Vinicius, Francieli, Lúcia, Sandra, Adrylene e Isabella Lopes, vocês me mostraram que existe amor em SP.

Por fim, agradeço a Deus pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha trajetória.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“À minha mãe, Ione Mathias da Cruz que, por
ter gostado muito de mim, me deu confiança
pra viver, me deu segurança pra me exhibir.
Não tive medo de ser ridículo, não tenho medo
de morrer. Porque fui amado.”*

(Texto inspirado e parafraseado a partir da
obra *Cartas da Mãe*, de Henfil, 1981)

RESUMO

Nascimento, Paloma Mathias. **Influência de fitoativos no ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* e *Haemonchus contortus*: Uma estratégia na procura de novos anti-helmínticos.** 2026. 138 folhas. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias - Instituto de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2026, Tese.

A resistência crescente de helmintos a anti-helmínticos convencionais representa um desafio crítico para a saúde animal e a sustentabilidade da produção pecuária. Esta tese teve como objetivo avaliar a atividade de óleos essenciais (OEs) de *Origanum vulgare* (orégano) e *Cinnamomum cassia* (canela), bem como de seus principais componentes, carvacrol e cinamaldeído, como alternativas no controle de helmintos. Para isso, utilizou-se *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental para triagem inicial, examinando a atividade dos OEs e das substâncias isoladas em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito. Os objetivos incluíram: (i) determinar a atividade letal adúltica e inibitória ovicida; (ii) avaliar a eficácia frente a cepas resistentes às principais classes de anti-helmínticos; (iii) investigar sinergia entre carvacrol e cinamaldeído; (iv) desenvolver formulações; e (v) comparar os efeitos em *Haemonchus contortus*, importante nematoide gastrointestinal de ruminantes. Os resultados demonstraram atividade anti-helmíntica significativa para ambos os OEs. O OE de orégano apresentou elevada potência adúltica contra a cepa selvagem de *C. elegans* ($CL_{50} = 1,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$), superior ao carvacrol isolado ($CL_{50} = 6,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sugerindo sinergia entre os constituintes do óleo. Para ovos, o carvacrol foi o principal responsável pela atividade ovicida. O OE de canela mostrou atividade adúltica semelhante ao cinamaldeído isolado ($CL_{50} \approx 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), mas o cinamaldeído destacou-se como potente ovicida ($CL_{50} = 3,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Ambos os OEs induziram alterações morfológicas severas nos nematoides. Em cepas resistentes de *C. elegans*, a eficácia adúltica do OE de orégano foi reduzida, enquanto o OE de *C. cassia* manteve sua atividade, sugerindo mecanismos distintos e potencial para uso frente a parasitas resistentes. A análise de sinergia indicou efeito predominantemente aditivo ou moderado em adultos e aditivo a ligeiramente antagonista em ovos, não configurando sinergia abrangente. Formulações tipo *beads*, desenvolvidas por gelificação iônica e com sulfato de cálcio, mostraram boa incorporação das substâncias ativas. Testes em *Haemonchus contortus* confirmaram a atividade dos OEs, com destaque para o efeito ovicida do OE de *C. cassia*. Em conclusão, os OEs de *O. vulgare* e *C. cassia*, assim como carvacrol e cinamaldeído, demonstraram perfis complementares e promissores como candidatos a novos agentes anti-helmínticos. O OE de *O. vulgare* tem maior atividade em adultos, possivelmente devido à sinergia interna, enquanto o cinamaldeído apresenta forte ação ovicida, inclusive em cepas resistentes. Estes resultados

fornece base para estudos *in vivo*, otimização de formulações e desenvolvimento de estratégias combinatórias com anti-helmínticos convencionais.

Palavras-chave: antiparasitário; óleos essenciais; sinergia; nematoides.

ABSTRACT

Nascimento, Paloma Mathias. **Influence of phytoactives on the life cycle of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*: A strategy in the search for new anthelmintics**. 2026. 138 p. Thesis (Doctorate in Veterinary Sciences) – Institute of Veterinary Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2026. Thesis.

The growing resistance of helminths to conventional anthelmintics represents a critical challenge for animal health and the sustainability of livestock production. This thesis aimed to evaluate the activity of essential oils (EOs) from *Origanum vulgare* (oregano) and *Cinnamomum cassia* (cinnamon), as well as their main components, carvacrol and cinnamaldehyde, as alternative agents for helminth control. For this purpose, *Caenorhabditis elegans* was used as an experimental model for initial screening, examining the activity of the EOs and isolated compounds at different stages of the parasite life cycle. The objectives included: (i) determining adulticidal lethal activity and ovicidal inhibitory activity; (ii) assessing efficacy against strains resistant to the main classes of anthelmintics; (iii) investigating synergy between carvacrol and cinnamaldehyde; (iv) developing formulations; and (v) comparing the effects in *Haemonchus contortus*, an important gastrointestinal nematode of ruminants. The results demonstrated significant anthelmintic activity for both EOs. *O. vulgare* EO showed high adulticidal potency against the wild-type strain of *C. elegans* ($LC_{50} = 1.03 \mu\text{g.mL}^{-1}$), greater than that of isolated carvacrol ($LC_{50} = 6.81 \mu\text{g.mL}^{-1}$), suggesting synergy among the oil constituents. For eggs, carvacrol was primarily responsible for ovicidal activity. *C. cassia* EO showed adulticidal activity similar to isolated cinnamaldehyde ($LC_{50} \approx 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), while cinnamaldehyde stood out as a potent ovicidal agent ($LC_{50} = 3.08 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Both EOs induced severe morphological alterations in the nematodes. In resistant *C. elegans* strains, the adulticidal efficacy of *O. vulgare* EO was reduced, whereas *C. cassia* EO maintained its activity, suggesting distinct mechanisms and potential use against resistant parasites. Synergy analysis indicated predominantly additive or moderate effects in adults and additive to slightly antagonistic effects in eggs, not constituting broad synergy. *Bead*-type formulations developed by ionic gelation with calcium sulfate showed good incorporation of active compounds. Tests in *Haemonchus contortus* confirmed EOs activity, with emphasis on the ovicidal effect of *C. cassia* EO. In conclusion, *O. vulgare* and *C. cassia* essential oils, as well as carvacrol and cinnamaldehyde, demonstrated complementary and promising profiles as candidates for new anthelmintic agents. *O. vulgare* EO is more potent against adults, possibly due to internal synergy, while cinnamaldehyde shows strong ovicidal action, including against resistant strains.

These results provide a basis for in vivo studies, formulation optimization, and the development of combinatory strategies with conventional anthelmintics.

Keywords: antiparasitic; essential oils; synergy; nematodes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> a 20 °C	34
Figura 2. Desenho esquemático do teste <i>in vivo</i> de letalidade de indivíduos adultos	41
Figura 3. Desenho esquemático do teste <i>in vivo</i> de eclodibilidade de ovos.....	42
Figura 4. Desenho esquemático do teste <i>in vivo</i> de postura de ovos.....	43
Figura 5. Preparo de beads por gelificação iônica.....	47
Figura 6. Preparo de beads carregadas com sulfato de cálcio	48
Figura 7. Curvas de concentração–mortalidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 horas de exposição ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano) e ao carvacrol.	60
Figura 8. Curvas de concentração–mortalidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 horas de exposição ao óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i> (canela) e ao cinamaldeído. ...	61
Figura 9. Comparação dos valores de CL ₅₀ (Log ₁₀) no ensaio de letalidade em adultos de diferentes tratamentos em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 horas de exposição.	61
Figura 10. Curvas de concentração–inibição de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 horas de exposição ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano) e ao carvacrol.....	65
Figura 11. Curvas de concentração–inibição de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 horas de exposição ao óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i> (canela) e ao cinamaldeído.	65
Figura 12. Comparação dos valores de CL ₅₀ (Log ₁₀) no ensaio de eclodibilidade de ovos de diferentes tratamentos em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 horas de exposição.	66
Figura 13. Gráfico de barras da inibição (%) da postura de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 4 dias de exposição aos diferentes tratamentos	67
Figura 14. Observação morfológica de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no grupo controle do ensaio de letalidade em adultos.....	68
Figura 15. Observação morfológica de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no grupo exposto ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> no ensaio de letalidade em adultos.	68
Figura 16. Observação morfológica de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no grupo exposto ao óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i> no ensaio de letalidade em adultos.....	69
Figura 17. Matriz dose–resposta da combinação de carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 h de exposição.	70
Figura 18. Curvas de concentração–mortalidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 horas de exposição ao carvacrol, ao cinamaldeído e à combinação de ambos os tratamentos.	70
Figura 19. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo ZIP da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 h de exposição	72

Figura 20. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo <i>Loewe</i> da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 h de exposição.	73
Figura 21. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo <i>HSA</i> da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 h de exposição	73
Figura 22. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo <i>Bliss</i> da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 h de exposição.	74
Figura 23. Matriz dose–resposta da combinação de carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 h de exposição.	75
Figura 24. Curvas concentração–inibição da eclodibilidade de ovos <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 horas de exposição ao carvacrol, ao cinamaldeído e à combinação de ambos os tratamentos.	75
Figura 25. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo <i>ZIP</i> da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 h de exposição.	77
Figura 26. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo <i>Loewe</i> da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 h de exposição	78
Figura 27. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo <i>HSA</i> da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 h de exposição.	78
Figura 28. Mapa de sinergia heatmap pelo modelo <i>Bliss</i> da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 h de exposição.	79
Figura 29. Curva concentração–inibição da eclodibilidade de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> após exposição ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano).	80
Figura 30. Curva concentração–inibição da eclodibilidade de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> após exposição ao óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i> (canela).	81
Figura 31. Curva concentração–inibição da motilidade das larvas L3 de <i>Haemonchus contortus</i> após exposição ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano).	82
Figura 32. Curva concentração–inibição da motilidade das larvas L3 de <i>Haemonchus contortus</i> após exposição ao óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i> (canela).	82
Figura 33. Formulações desenvolvidas à base de carvacrol e cinamaldeído.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz experimental da avaliação de sinergia.	44
Tabela 2. Perfil químico do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	55
Tabela 3. Perfil químico do óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i>	57
Tabela 4. Ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) expostos a diferentes tratamentos por 48 horas.....	59
Tabela 5. Ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepas resistentes) expostos ao óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> e análise do fator de resistência.....	62
Tabela 6. Ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepas resistentes) expostos ao óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i> e análise do fator de resistência.....	63
Tabela 7. Ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) expostos a diferentes tratamentos por 24 horas.....	64
Tabela 8. Ensaio de postura de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) expostos a diferentes tratamentos por 4 dias.....	67
Tabela 9. <i>Scores</i> de sinergia da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 48 h de exposição, segundo diferentes modelos estatísticos.	71
Tabela 10. <i>Scores</i> de sinergia da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> (cepa N2) após 24 h de exposição, segundo diferentes modelos estatísticos.	76
Tabela 11. Ensaio de eclodibilidade de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> expostos aos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Cinnamomum cassia</i>	79
Tabela 12. Ensaio de migração larval de <i>Haemonchus contortus</i> expostos aos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Cinnamomum cassia</i>	82
Tabela 13. Validação de carvacrol e cinamaldeído.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CE ₉₀	Concentração Efetiva 90%
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CI ₉₀	Concentração Inibitória 90%
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
CL ₉₀	Concentração Letal 90%
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
DL ₁₀	Dose Letal 10%
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
FR	Fator de Resistência
GRISIUS	Centro de Pesquisa Clínica e Inovação Tecnológica em Medicina Veterinária – Laerte Grisi
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSA	<i>Highest Single Agent</i>
IC	Intervalo de Confiança
LB	<i>Luria Bertani</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
OE	Óleo Essencial
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQR	Substância Química de Referência
TEO	Teste de Eclodibilidade de Ovos
TIML	Teste de Inibição da Migração Larval
ZIP	<i>Zero Interaction Potency</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Panorama Geral dos Anti-helmínticos Veterinários.....	17
2.2 Resistência Anti-helmíntica.....	20
2.3 Prejuízos do Parasitismo.....	21
2.4 Potencial Uso de Fitoinsumos	23
2.4.1 Óleos Essenciais (OEs) e seu Potencial Anti-helmíntico	25
2.5 Desenvolvimento, Desafios e Custos de Novos Produtos.....	28
2.6 Sinergia como Abordagem Estratégica	29
2.6.1. Modelos Matemáticos para Avaliação de Sinergia	31
2.7 Uso do <i>Caenorhabditis elegans</i> na Pesquisa de Novos Anti-helmínticos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Local do Experimento	37
3.2 Materiais e Reagentes Químicos	37
3.3 Aquisição de Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> e <i>Escherichia coli</i>	37
3.4 Manutenção de Cepas.....	38
3.5 Meios de Cultura e Soluções	38
3.6 Sincronização de <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
3.7 Caracterização Química dos Óleos Essenciais	40
3.8 Testes <i>in vivo</i> em <i>Caenorhabditis elegans</i>	40
3.8.1 Letalidade em Indivíduos Adultos.....	40
3.8.2 Eclodibilidade de Ovos.....	42
3.8.3 Postura de Ovos	43
3.8.4 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
3.8.5 Avaliação da Sinergia.....	44
3.9 Testes <i>in vitro</i> em <i>Haemonchus contortus</i>	45
3.9.1 Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO).....	45
3.9.2 Teste de Inibição da Migração Larval (TIML).....	45
3.10 Desenvolvimento das Formulações	46
3.10.1 <i>Beads</i> por Gelificação Iônica.....	46
3.10.2 <i>Beads</i> Carregadas com Sulfato de Cálcio.....	47

3.11 Método Analítico.....	48
3.11.1 Condições Cromatográficas.....	49
3.11.2 Preparo de Amostras.....	49
3.11.3 Ensaios.....	50
3.12 Análise Estatística	51
4 RESULTADOS	55
4.1 Composição Química dos Óleos Essenciais.....	55
4.2 Testes <i>in vivo</i>	58
4.2.1 Letalidade em Adultos.....	58
4.2.2 Eclodibilidade de Ovos.....	63
4.2.3 Postura de Ovos	66
4.2.4 Observações por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	67
4.2.5 Sinergia em Adultos	69
4.2.5 Sinergia em Ovos	74
4.3 <i>Haemonchus contortus</i>	79
4.3.1 Eclodibilidade de Ovos.....	79
4.3.2 Migração Larval	81
4.4 Desenvolvimento de Formulações	83
4.5 Validação de Metodologia Analítica	83
5 DISCUSSÃO.....	86
5.1 Atividade do OE de <i>Origanum vulgare</i> e Carvacrol	86
5.1.1 Composição Química do OE de <i>Origanum vulgare</i>	86
5.1.2 Atividade em Adultos.....	87
5.1.3 Atividade em Cepas Resistentes.....	91
5.1.4 Atividade Ovicida.....	93
5.1.4 Inferência de Mecanismo de Ação	94
5.2 Atividade do OE de <i>Cinnamomum cassia</i> e Cinamaldeído.....	96
5.2.1 Composição Química do OE de <i>Cinnamomum cassia</i>	96
5.2.2 Atividade em Adultos.....	98
5.2.3 Atividade Ovicida.....	103
5.2.4 Inferência de Mecanismo de Ação	105
5.3 Avaliação da Sinergia.....	106
5.3.1 Sinergia em Adultos	107

5.3.2 Sinergia em Ovos	108
5.3.3 Análise Comparativa com Estudos da Literatura	109
5.4 Desenvolvimento das Formulações e Validação Analítica	111
6 CONCLUSÃO.....	114
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	115
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
9. APÊNDICES	127

1 INTRODUÇÃO

O controle de helmintos representa um dos maiores desafios para a medicina veterinária, com impactos significativos na saúde animal e na economia pecuária. O uso de anti-helmínticos é a principal estratégia para combater essas infestações, porém a crescente resistência a esses medicamentos tem tornado essa abordagem cada vez mais ineficaz. A resistência anti-helmíntica resulta do uso excessivo e inadequado de fármacos, promovendo a seleção de parasitos mais resistentes, comprometendo a eficácia do tratamento e aumentando os custos de manejo. Além disso, o parasitismo pode causar prejuízos consideráveis à produção animal, afetando o crescimento, a fertilidade e a qualidade do leite e da carne, tornando a busca por alternativas mais eficientes uma necessidade urgente.

Neste contexto, os fitoinsumos, substâncias naturais derivadas de plantas, surgem como uma alternativa promissora no controle de helmintos, oferecendo soluções sustentáveis diante da crescente resistência a anti-helmínticos convencionais. No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos enfrenta desafios significativos, incluindo a necessidade de comprovação de segurança, eficácia e seletividade entre parasitos e hospedeiros. Além disso, os altos custos e as rigorosas exigências regulatórias tornam o processo complexo e dispendioso, com elevada taxa de falhas. Nesse sentido, a pesquisa de novas substâncias e estratégias como a sinergia entre diferentes classes de fármacos, visando aumentar a eficácia e retardar a resistência, têm demonstrado grande potencial.

Modelos experimentais, como o nematoide *Caenorhabditis elegans*, têm se mostrado valiosos na triagem de novos anti-helmínticos. Sua facilidade de cultivo e manipulação genética, além de seu ciclo de vida curto, permitem uma triagem mais rápida e econômica de substâncias, facilitando a identificação de novos agentes terapêuticos. Tais avanços na pesquisa, junto com o uso de alternativas naturais como óleos essenciais (OEs), estão abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de medicamentos veterinários mais eficazes e ecologicamente sustentáveis. Assim, enquanto os desafios continuam, as inovações no desenvolvimento de anti-helmínticos oferecem novas esperanças para o controle de parasitos e a melhoria da saúde animal.

Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de fitoativos no ciclo de vida de *C. elegans*. Para isso, foram avaliadas a influência dos OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* em diferentes estágios do ciclo de vida do *C. elegans*; seus componentes majoritários; e sua ação frente a cepas resistentes aos principais anti-helmínticos; e a combinação entre os componentes majoritários. Além disso, este projeto visa desenvolver formulações à base dos OEs citados e comparar os efeitos dessas substâncias em *Haemonchus contortus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama Geral dos Anti-helmínticos Veterinários

Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal, a classe com maior participação no mercado desde 2015 é a de antiparasitários, sendo responsável por 29% do faturamento líquido na indústria veterinária em 2024, o que equivale a R\$ 3,5 bilhões. Os ruminantes ocupam o primeiro lugar no mercado destes produtos, 47%, seguidos de cães e gatos (27%) (SINDAN, 2025).

Um desafio particular para as empresas engajadas na pesquisa de anti-helmínticos e nematocidas é que a relação custo-benefício constitui uma preocupação primordial. Além disso, existem restrições adicionais quanto aos níveis de toxicidade tolerados pelo hospedeiro (Holden-Dye & Walker, 2014). Nesse contexto, um antiparasitário de uso veterinário bem-sucedido deve apresentar as seguintes características: ampla margem terapêutica e disponibilidade de antídoto em casos de sobredosagem; efeito potente e de ação rápida; efeito residual claramente definido e, preferencialmente, prolongado, permitindo a redução da frequência de administração; segurança para o animal tratado, sem comprometer a inocuidade dos produtos de origem animal destinados à alimentação humana; relação custo-benefício favorável; amplo espectro de ação contra parasitos de importância comercial; e facilidade de administração (Lopez & Camberos, 2006). Os produtos disponíveis no mercado diferenciam-se em função dessas características.

Compreender o mecanismo de ação dos anti-helmínticos existentes pode fornecer muitas informações sobre os aspectos da fisiologia e do metabolismo dos helmintos que diferem do hospedeiro e são alvos para o desenvolvimento de novas famílias químicas com atividade anti-helmíntica. Desta forma, é possível indicar maneiras pelas quais a eficácia anti-helmíntica pode ser melhorada ou a toxicidade do hospedeiro reduzida, e pode ser instrutivo quanto ao mecanismo de resistência anti-helmíntica e como essa resistência pode ser superada. Além disso, o conhecimento do metabolismo e da fisiologia dos parasitos pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas (Prichard, 1997).

Os benzimidazóis são comercialmente encontrados como f mebendazol, o xibendazol, al bendazol, tiabendazol, entre outros. Possuem um amplo espectro de atividade, sendo

altamente eficazes contra ovos, adultos, estádios larvais de nematoides, cestódeos e trematódeos (Bogan & Armour, 1987). O mecanismo de ação dos benzimidazóis ocorre quando a droga age no parasita ao ligar-se aos sítios de ligação na proteína β -tubulina, que ocasiona uma despolimerização, prejudicando a função celular, além de alterar a divisão mitótica e o transporte de nutrientes, que causa o esgotamento das reservas energéticas devido à diminuição no metabolismo da glicose, e, por fim, ocasiona a morte do parasita (Bullen et al., 2016).

As avermectinas e as milbemicinas têm em sua estrutura lactonas macrocíclicas com ação nematicida, inseticida e acaricida, sendo, portanto, endectocidas (Shoop et al., 1995). As avermectinas aumentam a atividade e a capacidade de neurotransmissores como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico de estimular um influxo de íons cloreto nas células nervosas, resultando na perda da função celular. Esse efeito interrompe os impulsos nervosos, resultando em paralisia e morte na maioria dos invertebrados afetados (Shoop & Soll, 2002).

As salicilanilidas agem desacoplando a fosforilação oxidativa, interferindo na produção de energia, o que leva à morte por paralisia espástica pelo aumento de íons de cálcio nas células musculares. É eficaz contra trematódeos, cestódeos e nematoides (Fairweather & Boray, 1999).

O levamisol e o tetramisol pertencem à classe dos imidazóis, agindo em nematoides gastrointestinais e pulmonares (Viana, 2000). Esses fármacos possuem ação semelhante à nicotina, estimulando e, subsequentemente, bloqueando as junções neuromusculares, sendo os nematoides paralisados eliminados nas fezes (Rang et al., 2003).

Os compostos organofosforados tiveram suas origens como inseticidas e somente posteriormente foram utilizados como anti-helmínticos de espectro limitado. Entre os organofosforados usados como anti-helmínticos em animais estão diclorvós, triclorfon, haloxon, coumafós, naftalofós e crufomato (Lanusse et al., 2009). Esses fármacos atuam por inibição irreversível das acetilcolinesterases, determinando interferência na transmissão neuromuscular com consequente morte do parasito. Sua toxicidade fez com que deixassem de ser usados na maioria dos casos (Viana, 2000).

Os anti-helmínticos pirantel, morantel e oxantel pertencem à classe das tetraidropirimidinas, eles atuam seletivamente como agonistas dos receptores nicotínicos de

acetilcolina nas células musculares dos nematoides, causando contração e paralisia espástica (Lanusse et al., 2009).

Os compostos heterocíclicos, como a piperazina, são utilizados no tratamento de infecções por áscaris e por oxiúros. Essa classe inibe reversivelmente a transmissão neuromuscular no nematoide ao atuar como o GABA, neurotransmissor inibitório dos canais de cloreto regulados por GABA no músculo do nematoide (Rang et al., 2003).

Avanços na pesquisa de anti-helmínticos na medicina veterinária resultaram na disponibilidade comercial de três classes: depsipeptídeos cíclicos, derivadas amino-acetonitrilo e espiroindóis. Esses compostos atuam sobre a transmissão neuromuscular por mecanismos distintos dos anti-helmínticos clássicos. Nesse contexto, os depsipeptídeos cíclicos, representados pelo emodepside, atuam principalmente sobre canais de potássio do tipo SLO-1 em neurônios e células musculares dos nematódeos, promovendo o efluxo de íons K^+ , a hiperpolarização da membrana e a consequente inibição da excitabilidade neuromuscular, além de modularem a liberação de neurotransmissores por interação com receptores latrofilicos. Por sua vez, as derivadas amino-acetonitrilo, como o monepantel, ativam seletivamente subtipos específicos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), especialmente da subfamília DEG-3, levando à despolarização sustentada da musculatura, contração espástica e posterior paralisia do helminto. Já os espiroindóis, representados pelo derquantel, atuam como antagonistas competitivos dos receptores nicotínicos de acetilcolina, bloqueando a transmissão neuromuscular excitatória e resultando em paralisia flácida do parasita, o que contribui para sua eficácia, inclusive frente a cepas resistentes a outros anti-helmínticos (Epe & Kaminsky, 2013).

A limitada disponibilidade de recursos financeiros nas regiões mais afetadas por doenças tropicais tem dificultado o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias. Consequentemente, muitos dos agentes atualmente utilizados no tratamento humano foram originalmente desenvolvidos para uso veterinário. O número de agentes quimioterápicos disponíveis permanece restrito, e essa limitação foi em parte acentuada pelo prolongado sucesso da ivermectina nas últimas três décadas, que reduziu o incentivo para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas e para programas de descoberta de novos anti-helmínticos (Geary, 2005; Geary et al., 1999).

2.2 Resistência Anti-helmíntica

Cinquenta anos após o primeiro relato de resistência anti-helmíntica em parasitos de bovinos, a prevalência da resistência aumentou globalmente e tornou-se um problema crescente na indústria animal. A resistência se desenvolve quando parasitos sobrevivem ao tratamento e transmitem genes associados à resistência a seus descendentes. Com a seleção e reprodução contínuas, esses genes tornam-se mais frequentes na população. Além disso, a resistência tende a surgir de forma independente para cada classe química de anti-helmínticos, geralmente afetando uma classe por vez. Para que a resistência se estabeleça em uma espécie, os parasitos com genes de resistência devem sobreviver ao tratamento, continuar a se reproduzir e ser transmitidos ao próximo hospedeiro. Uma vez estabelecida, a resistência é difícil de reverter; portanto, a estratégia mais eficaz é prevenir seu surgimento. (Sangster et al., 2018).

A espécie *H. contortus* é o nematoide tricostrongilídeo mais extensamente estudado no que diz respeito à resistência anti-helmíntica. Em parte, isso se deve ao fato de ter demonstrado grande capacidade de desenvolver resistência a todas as principais classes de medicamentos; portanto, as resistências apresentadas por esta espécie tiveram um impacto econômico significativo em escala mundial. No entanto, além do impacto econômico de suas resistências, esta espécie também tem sido mais extensivamente estudada do que outras devido aos aspectos de sua biologia e fisiologia que a tornam um bom modelo experimental (Gillerad, 2006, 2013).

A resistência aos benzimidazóis em *H. contortus* está diretamente associada a mutações pontuais bem conservadas na β -tubulina, especificamente Phe200Tyr, Phe167Tyr e Glu198Ala nos isotipos 1 e 2 da proteína. Essas mutações alteram o padrão de isoformas da β -tubulina e podem levar à perda de receptores de alta afinidade, reduzindo significativamente a ligação do albendazol ao seu alvo (Lubega & Prichard, 1991; Kwa et al., 1994; Prichard, 2001; Velan & Hoda, 2020).

A resistência ao levamisol é produzida por alterações nas propriedades das populações de receptores nicotínicos (Robertson et al., 1999) e por uma alteração da ligação do fármaco aos receptores nicotínicos nas células musculares dos nematoides.

A resistência às lactonas macrocíclicas em *H. contortus* envolve múltiplos mecanismos genéticos e transcriptômicos. Tratamentos subterapêuticos com ivermectina ou moxidectina

aceleram a seleção de haplótipos de resistência no *locus* do cromossomo V, incluindo o fator de transcrição HCON_00155390 (*cky-1*). Análises de RNA-seq mostram desregulação localizada de genes nesse *locus* em linhas selecionadas, enquanto não há evidência de resistência cruzada via P-glicoproteínas (Doyle et al., 2022; Laing et al., 2022). Além disso, subunidades dos canais de cloreto dependentes de glutamato e GABA, P-glicoproteínas e β -tubulina também estão associadas à resistência (Eng & Prichard, 2005).

Também já foi relatada resistência ao monepantel, fármaco recentemente introduzido da classe das aminoacetonitrilas. No entanto, o mecanismo responsável ainda não foi descrito (Mederos et al., 2014; Van Den Brom et al., 2015). A existência de populações de campo mostrando resistência a todas as três principais classes de drogas e o aparecimento precoce de resistência ao monepantel ameaçam a sustentabilidade dos sistemas de produção de ovinos e caprinos em todo o mundo (Kotze & Prichard, 2016).

2.3 Prejuízos do Parasitismo

Existem muitos desafios para a produção lucrativa de carne bovina, sendo o parasitismo um dos mais significativos. Diversas são as doenças que afetam a produção e reduzem o rendimento e a lucratividade dos produtores. Boa parte dessas doenças, principalmente as provocadas por vírus e bactérias, pode ser evitada ou controlada pelo uso de vacinas e outras medidas preventivas. No caso dos parasitos, é difícil a imunização do rebanho e estes acabam sendo o problema sanitário de maior importância para a produção de gado de corte em todo o mundo, em especial nos trópicos (Cançado et al., 2012). Parasitos e doenças transmitidas por parasitos afetam negativamente o gado e influenciam o marketing e o comércio (nacional ou internacional) de animais e produtos alimentícios (FAO, 2004).

Os prejuízos do parasitismo gastrointestinal podem ser observados em danos à mucosa do abomaso e intestinos e perda de peso causada pelo hematofagismo, competição com o hospedeiro por minerais e outros nutrientes e diminuição do apetite (Abidu-Figueiredo et al., 2005). Esses efeitos comprometem a saúde e o desempenho dos animais, refletindo diretamente na produção de alimentos ao reduzir tanto a quantidade quanto a qualidade de carne, leite e fibra. Patógenos endêmicos ou emergentes, incluindo nematoides, trematódeos, protozoários e ectoparasitas, podem causar mortalidade e morbidade, além de representar riscos à segurança alimentar para o consumo humano. A situação se agrava em regiões com infraestrutura limitada

de vigilância e controle sanitário, onde a prevenção e o manejo inadequado das infecções animais impactam diretamente a saúde pública e a segurança alimentar global (Fitzpatrick, 2013).

O parasitismo também pode impactar a sustentabilidade da produção global de carne. Gado e ovelhas infectados por nematoides gastrointestinais e fasciola hepática apresentam maiores emissões de gases de efeito estufa em comparação a animais saudáveis (Kenyon et al., 2013; Fox et al., 2018). Diante de metas governamentais de redução de emissões, o controle de parasitos pode se tornar uma estratégia necessária para auxiliar os produtores de gado a atender à crescente pressão política e social por diminuição da pegada de carbono (UNEP, 2023).

As perdas econômicas causadas pelos nematoides gastrointestinais são significativas em vários países produtores de carne bovina. No Brasil, as perdas alcançam impressionantes US\$ 7,11 bilhões (Grisi et al., 2014). Nos Estados Unidos, as perdas chegam a US\$ 8,5 bilhões (Lawrence & Ibarburu, 2007). Já no México, o impacto financeiro é de US\$ 0,45 bilhões (Rodríguez-Vivas et al., 2017). Esses números ressaltam a importância de estratégias eficazes de controle helmíntico para minimizar as perdas econômicas e garantir a lucratividade do setor de carne bovina.

Dentro do grupo de helmintos gastrointestinais prevalentes na criação de bovinos, caprinos e ovinos, pode-se observar os gêneros: *Cooperia*; *Haemonchus*; *Oesophagostomum*; *Ostertagia*; e *Trichostrongylus* parasitando o trato gastrointestinal destes ruminantes (Viveiros, 2009). A variabilidade nos impactos do parasitismo sobre a produção animal está relacionada a fatores como o nível de infecção, o estágio de desenvolvimento do parasita, características genéticas do animal que influenciam sua resistência ou tolerância à infecção, manejo nutricional e outros elementos ainda pouco compreendidos. Esses fatores determinam a resposta de cada animal à infecção, afetando a gravidade da doença e a produtividade, mesmo em rebanhos expostos a condições semelhantes (Vercruysse & Claerebout, 2001). Compreender esses determinantes é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle eficazes e para reduzir o risco de surgimento de resistência anti-helmíntica (Fortes, 2004).

No segmento pet, a preocupação com zoonoses supera a importância econômica. As zoonoses parasitárias, doenças transmissíveis do animal para o homem e vice-versa, constituem algumas das infecções mais importantes e comuns que ameaçam as populações humanas

(Baneth et al., 2015). O convívio desses animais com humanos é indiscutivelmente benéfico, porém cães e gatos podem abrigar muitos endoparasitos potencialmente transmissíveis ao homem, o que pode representar um risco à saúde, principalmente de crianças, idosos e imunocomprometidos (Irwin, 2002).

O impacto de algumas dessas doenças é desproporcionalmente mais alto em países em desenvolvimento como o Brasil, porque as condições de vida das populações geralmente favorecem a exposição a certos parasitos, cuja transmissão pode estar associada a más condições sanitárias e de habitação, bem como com iniquidades no acesso à educação e serviços de atenção primária à saúde. Os gêneros *Toxocara*, *Ancylostoma*, *Strongyloides*, *Trichuris* são parasitos comuns de cães e gatos que podem afetar seres humanos em diferentes países do mundo (Dantas-Torres & Otranto, 2014).

Daí surge a necessidade de uma abordagem de *One Health* (Saúde Única/Uma Só Saúde) para gestão e controle mais eficientes desses parasitos. O conceito proposto já na década de 90 remete a estratégias interdisciplinares e integrativas de promoção à saúde, em que a saúde humana e a saúde animal são interdependentes e vinculadas à saúde dos ecossistemas (Lerner & Berg, 2015). Uma abordagem de Saúde Única/Uma Só Saúde para a produção de leite, saúde do rebanho, segurança alimentar e prevenção de doenças zoonóticas pode levar a avanços significativos na segurança alimentar, nutrição, higiene alimentar, bem como no avanço da saúde global. Esta abordagem integrativa para resolver problemas complexos que afetam a saúde e a conservação, onde animais, humanos e o ecossistema são imperativos nos países em desenvolvimento (Garcia et al., 2019).

2.4 Potencial Uso de Fitoinsumos

As plantas medicinais sempre foram e ainda são uma valiosa fonte de agentes terapêuticos. Existem várias terapêuticas eficazes de fontes naturais amplamente utilizadas hoje. Historicamente, a descoberta de medicamentos dependia exclusivamente de produtos naturais como a principal fonte, o que influenciou significativamente os avanços na biologia e inspirou a descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Drogas naturais ou drogas de origem natural são aquelas que contêm seus ativos derivados de fontes biológicas ou minerais e destinadas ao uso no diagnóstico, cura, mitigação e prevenção de doenças (Alamgir, 2017).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que, até hoje, muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (Viegas Jr. et al., 2006). Tradicionalmente, os medicamentos naturais eram amplamente usados como misturas ou extratos de plantas concentrados sem isolamento de substâncias ativas, mas os avanços nos procedimentos experimentais no século XIX possibilitaram o isolamento e purificação dos princípios ativos dessas plantas (Thomford et al., 2018).

As diversidades estruturais e abundância de produtos naturais servem como uma base importante para a geração de novos projetos de bibliotecas de substâncias (Davison & Brimble, 2019). Apesar do potencial dos produtos naturais na descoberta de fármacos, até 2015 observou-se uma redução significativa, por parte das indústrias farmacêuticas, nos programas de pesquisa e desenvolvimento voltados à prospecção de compostos de origem natural. Essa tendência está associada aos avanços na síntese combinatória e nas técnicas de triagem de alto rendimento, que possibilitaram a geração de extensas bibliotecas de pequenas moléculas sintéticas (Shen, 2015). No entanto, essa diminuição nos programas de descoberta de fármacos baseados em produtos naturais não se refletiu proporcionalmente no número de aprovações regulatórias, uma vez que se estima que aproximadamente metade dos medicamentos recentemente aprovados tenha origem direta ou indireta em produtos naturais (Stratton et al., 2015).

O uso de plantas medicinais tem uma importância histórica significativa no país, especialmente na área farmacêutica, o que pode ser explicado pela origem de nossa indústria farmacêutica, inicialmente voltada para o uso de insumos vegetais. Essa realidade persiste atualmente, com grande parte da indústria nacional ainda utilizando plantas como matéria-prima básica. No Brasil, Furtado (2006) realizou um levantamento que identificou 106 espécies de plantas com ação anti-helmíntica, das quais menos de 17% apresentam eficácia comprovada. Dentre essas espécies, 17,9% foram indicadas para o tratamento de nematoides em ruminantes,

o que demonstra que, apesar do grande número de plantas descritas com potencial antiparasitário, poucas foram cientificamente avaliadas.

No entanto, o impacto econômico desse setor ainda é limitado, o que contrasta com o elevado potencial da biodiversidade brasileira, favorecida por suas condições climáticas, edáficas e hídricas, que permitem a adaptação de inúmeras espécies vegetais (Zuanazzi & Mayorga, 2010). Nesse contexto, muitas grandes indústrias farmacêuticas têm progressivamente excluído produtos naturais de seus programas de descoberta de fármacos. Essa decisão está relacionada a desvantagens percebidas, como: (1) dificuldades de acesso e fornecimento de matéria-prima, (2) complexidade estrutural e química dos compostos naturais, (3) desafios associados aos direitos de propriedade intelectual e (4) maior expectativa de sucesso com coleções de substâncias obtidas por métodos de química combinatória (Lam, 2007).

O Centro de Pesquisa Clínica e Inovação Tecnológica em Medicina Veterinária – Laerte Grisi (GRISIUS) tem se dedicado ao estudo da atividade antiparasitária de fitoinsumos, com diversas pesquisas que demonstram a eficácia de substâncias naturais contra diferentes parasitos. Estudos com OEs de plantas como *Syzygium aromaticum* (Lambert et al., 2021), *Ocimum gratissimum* (Oliveira et al., 2022), *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* (Medeiros et al., 2023) mostraram atividade acaricida e pulicida promissora contra ectoparasitos como *Rhipicephalus sanguineus* e *Ctenocephalides felis*. Além disso, investigações com substâncias como eugenol, carvacrol e trans-anetol, em combinações sinérgicas ou antagônicas, demonstraram eficácia contra *Cochliomyia hominivorax* e *Rhipicephalus sanguineus* (Miranda et al., 2023; Medeiros et al., 2025). Esses estudos indicam que os fitoinsumos têm um grande potencial para o desenvolvimento de alternativas naturais no controle de parasitos, principalmente em um contexto de crescente resistência aos antiparasitários sintéticos.

2.4.1 Óleos Essenciais (OEs) e seu Potencial Anti-helmíntico

Os OEs são substâncias secundárias que, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam frequência inferior a 1% do carbono total, são compostos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, que lhes conferem características organolépticas (Simões et al., 2007). Sua eficácia é frequentemente atribuída aos principais componentes, tendo sua ação de forma individual ou sinérgica (Ellse; Wall, 2014).

Desempenham um papel importante na adaptação ambiental da planta, atuando como reguladores químicos e mensageiros na bioquímica vegetal, tendo papel fundamental na fertilização, polinização e adaptação ambiental da planta (Fumagali et al., 2008). A biossíntese dos OEs é controlada geneticamente, associada à fisiologia da planta e dependente do seu estado metabólico, mas fortemente influenciada por fatores ambientais, na colheita e pós-colheita (Sangwan et al., 2001).

Devido ao grande número de constituintes, os OEs parecem não ter alvos celulares específicos. Como são lipofílicos típicos, eles atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, rompem a estrutura de suas diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios e os permeabilizam. A citotoxicidade parece incluir tais danos à membrana. Para fins biológicos, é mais informativo estudar um OE inteiro, em vez de alguns de seus componentes, porque o conceito de sinergismo parece ser mais significativo (Bakkali et al., 2008).

Entre 2000 e 2019, 40 patentes foram emitidas para nematocidas à base de produtos naturais, abrangendo sete classes estruturais, embora nenhum deles esteja disponível comercialmente (Garcia-Bustos, 2019). Na base de dados *Espacenet*, foram encontradas diversas patentes que abordam o uso de OEs e seus componentes para o controle de nematoides e outros helmintos, representando alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos produtos. Exemplos como a patente CN107372644B (Xiaohui, et al., 2019), que propõe uma combinação de abamectina B2 e OE de canela, destacam as propriedades repelentes e mortais do OE, sendo eficaz na redução dos danos causados por nematoides nas raízes das culturas. A patente CN117918388A (Zhang et al., 2024), por sua vez, foca no uso do OE de *Artemisia scoparia* como uma preparação biológica eficaz para o controle de uma variedade de pragas, incluindo nematoides, com a vantagem de ser segura, não tóxica e ecologicamente correta.

Além dessas patentes, outras pesquisas relatam o uso terapêutico de OEs como o de *Kunzea ambigua* contra parasitos intestinais, patenteado na UE e na Austrália, AU2008241370B2 e EP2192912B1 (Hood, 2014; Hood, 2016), embora a eficácia anti-helmíntica não tenha sido comprovada. O geraniol, patenteado para uso agrícola na Coreia do Sul, KR101862202B1, (Bon & Chul, 2018), demonstrou atividade anti-helmíntica contra *C. elegans in vivo*. Também se destacam os OEs de *Trachyspermum ammi*, timol e carvacrol, que

já demonstraram atividade anti-helmíntica em várias pesquisas, como descrito na patente KR100960871B1 (Park, et al., 2010).

O uso de OEs em sistemas de solventes também tem sido explorado, como exemplificado nas patentes EP2331068B1 (Albright, et al., 2017) e US9283176B (Albright, et al., 2016). Esses OEs, como o de *tea tree* e seus componentes como 1,8-cineol, eugenol e limoneno, foram patenteados como aditivos para anti-helmínticos benzimidazóis, indicando um novo caminho para a formulação de tratamentos anti-helmínticos mais eficazes e com menor impacto ambiental.

Essas inovações no uso de OEs destacam o potencial de produtos naturais como alternativas viáveis para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos, alinhando-se com as necessidades de segurança, eficácia e sustentabilidade exigidas no setor veterinário.

Apesar de suas vantagens, a aplicação de OEs apresenta diversos desafios, como sabores e aromas intensos que podem alterar propriedades sensoriais, baixa solubilidade em água devido à sua natureza hidrofóbica, alta volatilidade e sensibilidade a fatores ambientais, como luz, temperatura, pH e pressão. Sua exposição ao ar, luz ultravioleta, oxigênio e calor pode causar evaporação rápida, degradação fotoquímica e oxidação, levando a alterações na composição, cor, aroma e eficácia, além de reduzir a vida útil do OE (Ren et al., 2022; Falleh, 2025). Além disso, as substâncias bioativas presentes nos OEs podem modular a atividade das enzimas do citocromo P450 (CYP450) no fígado e no intestino, responsáveis pelo metabolismo de aproximadamente 75% dos medicamentos. Essa interação pode resultar na indução ou inibição dessas enzimas, alterando a eficácia ou a toxicidade de fármacos administrados simultaneamente. A exposição a esses constituintes pode ocorrer por vias cutânea, oral ou inalatória, sendo que o uso concomitante com medicamentos ou a aplicação excessiva de OEs pode gerar efeitos adversos inesperados, demandando atenção quanto à segurança e ao potencial de interações medicamentosas (Zehetner et al., 2019). Esses fatores limitam a uniformidade, a estabilidade e a eficácia dos óleos essenciais, restringindo seu uso direto em alimentos, cosméticos, formulações farmacêuticas e outros produtos.

2.5 Desenvolvimento, Desafios e Custos de Novos Produtos

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é dividido em duas grandes fases: a primeira, de descoberta (pré-clínica), e a segunda, de desenvolvimento (ou clínica). Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas geralmente se concentram na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar novas entidades químicas com potencial de desenvolvimento clínico. A validação do alvo molecular selecionado é fundamental por uma série de razões, desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças (Guido et al., 2010).

Os anti-helmínticos representam desafios únicos em todas essas áreas. A segurança é uma prioridade em qualquer programa de descoberta de medicamentos, e qualquer composto pode ser prejudicial a um paciente devido a efeitos tanto em alvos desejados quanto não desejados. Como eucariotos, os parasitos compartilham uma homologia significativa com seus hospedeiros, tornando a seletividade e a segurança mais difíceis de alcançar do que para os antibióticos contra bactérias (Gao et al., 2017; Dey et al., 2018). Além disso, a diversidade de espécies e raças, a variedade de tamanhos corporais, diferenças no metabolismo e biologia, variações sazonais, estados de doença, economia e outros fatores complicam as estratégias de design e desempenho de formas farmacêuticas veterinárias (Ahmed & Kasraian, 2002).

Além dos desafios clínicos e de segurança, um novo medicamento anti-helmíntico bem-sucedido também deve superar obstáculos regulatórios em termos de segurança, eficácia e fabricação. Em contraste com outras áreas de indicação, a eficácia dos anti-helmínticos deve ser de até 90%, com base nas diretrizes do Comitê Internacional de Harmonização Veterinária. Para garantir a segurança do consumidor, o órgão regulador calcula os níveis máximos de resíduos, determinando um período de carência que deve ser seguido pelos produtores (Delatour et al., 2018). Um exemplo disso é a ivermectina, que possui alta lipofilicidade e exige um longo período de carência para o gado leiteiro, tornando-a indesejável. Por outro lado, a eprinomectina, com propriedades farmacocinéticas diferenciadas, apresenta um período de carência de 0 dias para vacas lactantes.

Outro obstáculo regulatório importante é a segurança ambiental. Devido aos impactos potenciais dos resíduos farmacêuticos nos ecossistemas aquáticos e terrestres, as autoridades

exigem uma avaliação de risco ambiental de todos os produtos farmacêuticos antes da autorização de comercialização (Lee & Choi, 2019). Para o gado em pastagens, o risco ambiental é considerado ainda maior devido à combinação de ecotoxicidade e persistência no solo/sedimentos (Liebig et al., 2010; Lumaret et al., 2012), o que representa um desafio adicional para os anti-helmínticos de gado.

A legislação brasileira sobre anti-helmínticos veterinários é regida por normas que visam assegurar a eficácia, segurança e controle ambiental dos medicamentos utilizados no combate a parasitos internos e externos em animais. A Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997, estabelece o Regulamento Técnico elaborado pelo Departamento de Defesa Animal, que regula a produção, controle e emprego de antiparasitários de uso veterinário. Este regulamento exige que todos os anti-helmínticos sejam devidamente registrados, passando por rigorosas avaliações de composição, segurança e eficácia, antes de sua comercialização (BRASIL, 1997).

Na indústria de saúde animal, estima-se que os custos de descoberta de medicamentos antiparasitários sejam de US\$ 25 milhões por ano, com uma média de apenas uma nova classe de anti-helmínticos sendo comercializada a cada década. O processo é repetitivo e tem uma taxa de falha muito alta; estima-se que mais de 90% dos programas de descoberta falhem (Booth & Zemmel, 2004).

2.6 Sinergia como Abordagem Estratégica

A sinergia ocorre quando dois ou mais fármacos que, individualmente, produzem efeitos visivelmente semelhantes, podendo ter seus efeitos intensificados quando administrados em combinação. Quando o efeito combinado é maior do que o previsto pelas atividades individuais, a combinação é considerada sinérgica. Uma interação sinérgica permite o uso de doses mais baixas dos constituintes da combinação, uma situação que pode reduzir as reações adversas. Combinações de fármacos são bastante comuns no tratamento de cânceres, infecções, dor e muitas outras doenças e situações (Tallarida, 2011). Outro benefício, embora pouco explorado, é a ação indireta da sinergia como estratégia para diminuir a contaminação ambiental. Oliveira (2015) enfatiza que as práticas como a implantação de mecanismos que reduzam a geração de resíduos e/ou o seu tratamento adequado podem diminuir o impacto que os fármacos têm como poluentes emergentes ao meio ambiente. Além disso, análises farmacoeconômicas apontam que

a sinergia de fármacos pode reduzir significativamente os custos sem comprometer a qualidade do tratamento (da Costa, 2013).

O uso de formulações que contêm duas ou mais classes de anti-helmínticos com espectros de atividade semelhantes tem dois objetivos principais (Leathwick et al., 2009): (1) manter o controle de nematoides na presença de resistência a anti-helmínticos, às vezes envolvendo mais de uma espécie de parasito e/ou mais de uma classe de anti-helmíntico e simultaneamente, (2) retardar o desenvolvimento de resistência a anti-helmíntica para as classes químicas componentes nas espécies em que a resistência ainda não é evidente. Sem o uso de combinações, algumas classes de anti-helmínticos não poderiam mais ser usadas em muitas fazendas, apesar de ainda serem altamente eficazes contra uma grande proporção das espécies de parasitos nessas fazendas.

A pesquisa sobre sinergia em fitofármacos tem se consolidado como uma atividade-chave nos últimos anos. Um dos principais objetivos desses estudos é encontrar uma justificativa científica para a superioridade terapêutica de muitos extratos vegetais usados na medicina tradicional, em comparação com seus componentes isolados. A eficácia desses extratos vegetais, utilizados há séculos, foi verificada em muitos casos por meio de estudos clínicos. Os efeitos sinérgicos da mistura de constituintes bioativos e seus subprodutos presentes nos extratos vegetais são apontados como responsáveis pela eficácia aprimorada de muitos desses extratos (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Os mecanismos mais comuns de sinergia são:

- 1) Efeitos sinérgicos de múltiplos alvos: referem-se ao fenômeno em que os constituintes individuais de um monoextrato ou de uma combinação de multi-extratos não afetam apenas um único alvo, mas sim vários alvos, cooperando de forma agonística e sinérgica. Esses efeitos podem resultar em uma eficácia maior do que a soma dos efeitos individuais de cada componente (Imming et al., 2006).
- 2) Efeitos farmacocinéticos baseados em melhora da solubilidade, taxa de absorção e aumento da biodisponibilidade: certas substâncias acompanhantes presentes em um extrato, como polifenóis ou saponinas, que muitas vezes não possuem efeitos farmacológicos específicos por si mesmos, podem aumentar a solubilidade e/ou a taxa de absorção dos principais constituintes do extrato, promovendo um efeito

farmacocinético. Isso pode resultar em uma biodisponibilidade aprimorada e, simultaneamente, em uma maior eficácia do extrato em comparação com um constituinte isolado (Butterweck et al., 2003).

Além da sinergia, a combinação de substâncias vegetais com fármacos pode resultar em antagonismo, quando os bioativos interferem na ação do medicamento, reduzindo sua eficácia ou aumentando a toxicidade (Dehelean et al., 2021). Esse efeito pode ocorrer por alterações no metabolismo, principalmente via enzimas do citocromo P450 (CYP), essenciais na eliminação de diversos fármacos (Bhattacharyya et al., 2015). Por exemplo, a erva-de-são-jão (*Hypericum perforatum*) induz a CYP3A4, acelerando o metabolismo de anticoncepcionais orais e imunossupressores, o que pode levar a concentrações subterapêuticas e perda de efeito. Além disso, polifenóis presentes em chás ou extratos vegetais podem formar complexos insolúveis com fármacos, limitando sua absorção e biodisponibilidade. Adversamente, efeitos antagonistas também podem surgir em nível farmacodinâmico, como quando *ginseng* contrabalança fármacos sedativos ou antioxidantes em altas doses durante quimioterapia, reduzindo a morte de células cancerígenas induzida por radicais livres (Kraithong et al., 2022, Akhlada et al., 2024).

Por outro lado, interações aditivas podem ocorrer quando substâncias vegetais e fármacos atuam de forma independente, mas complementar, promovendo maior benefício terapêutico sem alterar significativamente a segurança (Martin et al., 2021). Nesse contexto, bioativos como flavonoides, polifenóis e alcaloides podem atingir alvos diferentes daqueles dos fármacos, ampliando o efeito do tratamento. Por exemplo, a curcumina pode modular vias celulares em conjunto com medicamentos anticâncer, enquanto a quercetina age com anti-inflamatórios não esteroides, bloqueando simultaneamente moléculas que desencadeiam inflamação. Esses efeitos permitem reduzir doses de fármacos, minimizar efeitos adversos e aumentar a eficácia geral do tratamento, embora exijam monitoramento cuidadoso para evitar interferências indesejadas (Biharee et al., 2020; Almatroodi et al. 2021; Stossi et al., 2023).

2.6.1. Modelos Matemáticos para Avaliação de Sinergia

A avaliação de combinações de fármacos tem se tornado cada vez mais relevante para a descoberta de interações sinérgicas, principalmente em estudos de triagem combinatória de alto rendimento. Para facilitar a análise desses dados, diversas ferramentas de software de acesso

livre foram desenvolvidas (Ianevski et al., 2022). Entre elas, o pacote *R SynergyFinder* se destaca por implementar algoritmos que permitem calcular pontuações de sinergia a partir de matrizes de dose-resposta, possibilitando uma análise quantitativa das interações entre substâncias.

Atualmente, quatro modelos matemáticos de referência são amplamente utilizados para avaliar sinergia entre fármacos: *Loewe Additivity* (Loewe), *Bliss Independence* (Bliss), *Highest Single Agent* (HSA) e *Zero Interaction Potency* (ZIP). Esses modelos fornecem pontuações de sinergia que descrevem o desvio da resposta observada em relação à resposta esperada. Cada modelo baseia-se em premissas distintas e apresenta vantagens e limitações específicas, sendo apropriado para diferentes contextos experimentais (Vlot et al., 2019).

O modelo *Loewe* (Frei, 1913; Loewe, 1926, 1927, 1953, 1959) fundamenta-se na premissa de que nenhum fármaco pode interagir consigo mesmo e que as substâncias de uma combinação são permutáveis. Matematicamente, o modelo é expresso pelo princípio da equivalência de dose e pelo princípio da experiência simulada. Segundo o princípio da equivalência de dose, para um efeito específico provocado pelo fármaco A, existe uma dose equivalente de B que produz efeito similar, assumindo que as curvas de resposta possuem a mesma amplitude e são paralelas. O princípio da experiência simulada postula que a dose equivalente de B produz um efeito aditivo esperado quando combinada com A (Vlot et al., 2019). Entre as limitações desse modelo, destaca-se a necessidade de estimativa precisa das curvas dose-resposta, tornando o modelo inviável quando os dados são escassos ou difíceis de modelar (Foucquier & Guedj, 2015).

O modelo de *Bliss* (Bliss, 1939; Berenbaum, 1989; Greco et al., 1995; Geary, 2013) é amplamente utilizado para avaliar efeitos combinados de fármacos. Ele parte do pressuposto de que os efeitos dos fármacos são probabilísticos e independentes, ou seja, cada composto atua sem interferir no mecanismo do outro, contribuindo para um efeito combinado. Esse modelo é especialmente útil quando os fármacos possuem locais de ação distintos. Entretanto, apresenta limitações quando as substâncias possuem múltiplos mecanismos de ação complexos ou desconhecidos, e aplica-se preferencialmente a efeitos expressos como probabilidades variando entre 0 e 1, com curvas dose-resposta do tipo exponencial (Foucquier & Guedj, 2015).

O modelo *HSA* compara o efeito resultante da combinação de dois fármacos (EAB) com os efeitos de cada composto isoladamente (EA e EB). Um efeito combinado positivo é considerado quando a combinação supera o efeito de ambos os agentes isolados (Lehár et al., 2007). Embora simples de aplicar, a abordagem *HSA* não fornece uma avaliação detalhada da sinergia além do efeito aditivo, limitando a interpretação dos resultados (Foucquier & Guedj, 2015).

O modelo *ZIP* (Yadav et al., 2015) é um modelo híbrido que combina conceitos dos modelos *Loewe* e *Bliss*. Ele avalia alterações na potência e na forma da curva dose-resposta de uma combinação em relação às substâncias individuais, assumindo que a ausência de interação implica a manutenção inalterada da curva. A principal limitação do *ZIP* é a dependência de um ajuste preciso das curvas de dose-resposta a modelos log-logísticos, o que pode ser desafiador em processos complexos ou quando os dados possuem baixa qualidade (Vlot et al., 2019).

O *SynergyFinder* (Ianevski et al., 2017, 2022) é uma plataforma *web* gratuita que permite a análise e visualização de dados de combinações de fármacos, incluindo matrizes de duas ou mais substâncias. A ferramenta possibilita calcular e comparar pontuações de sinergia de acordo com os diferentes modelos matemáticos descritos, oferecendo suporte à interpretação de interações complexas e à identificação de combinações promissoras para estudos pré-clínicos e clínicos.

2.7 Uso do *Caenorhabditis elegans* na Pesquisa de Novos Anti-helmínticos

Caenorhabditis elegans é um pequeno nematoide de vida livre e não parasitário. Na natureza, *C. elegans* e outras espécies de *Caenorhabditis* são encontradas na maioria dos continentes e em muitos territórios isolados. Mais de 25 espécies do gênero *Caenorhabditis* foram caracterizadas até o momento. Embora as espécies tenham muitas semelhanças morfológicas, elas são divergentes no nível genético. A divergência genética reflete a especialização ecológica e a distribuição territorial de diferentes espécies (Hodgkin, 2001).

Como organismo modelo, *C. elegans* é muito importante para pesquisa biológica em muitos campos, incluindo genômica, biologia celular, neurociência e envelhecimento. Entre suas muitas vantagens para o estudo estão seu curto ciclo de vida, genoma compacto, desenvolvimento estereotipado, facilidade de propagação e tamanho pequeno (o adulto chega a

um milímetro de comprimento). O plano do corpo adulto é anatomicamente simples, com cerca de 1000 células somáticas. É passível de cruzamentos genéticos e produz muitas progênes por adulto. Reproduz-se com um ciclo de vida de cerca de 3 dias em condições ideais. Pode ser mantido em laboratório, onde é cultivado em placas de ágar NGM (*Nematode Growth Medium*) ou culturas líquidas com *Escherichia coli* como fonte de alimento. A descrição morfológica deste nematoide foi concluída em nível de microscopia eletrônica e sua linhagem celular completa, que é invariável entre os animais, foi estabelecida (Brenner, 1974; Byerly et al., 1976; Sulston et al., 1983; Lewis & Fleming, 1995).

Existem dois sexos de *C. elegans*: hermafrodita autofertilizante (XX) e masculino (XO), porém os machos surgem com pouca frequência (0,1%). O ciclo de vida do *C. elegans* é composto pelo estágio embrionário, quatro estágios larvais (L1-L4) e adultos. Também pode suportar condições ambientais adversas, mudando para um estágio facultativo de diapausa chamado larva *dauer*, isto acontece no final do estágio L2 (Altun & Hall, 2009).

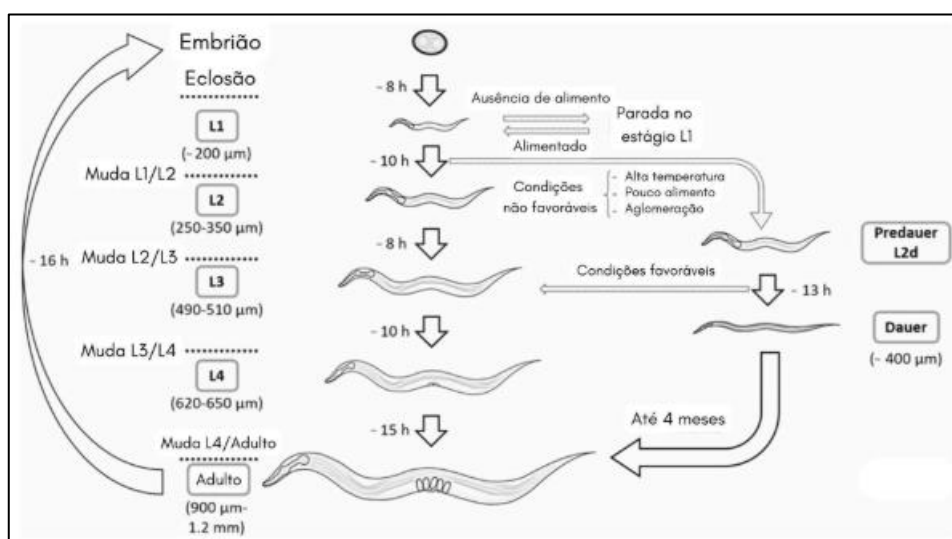


Figura 1. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* a 20 °C. Fonte: Adaptado de Sepúlveda-Crespo et al., 2020.

No ramo da pesquisa de novos anti-helmínticos, *C. elegans* têm se mostrado um modelo de organismo promissor para pré-triagem de moléculas, o que pode aumentar o rendimento de futuras descobertas, pois as moléculas podem ser rastreadas com certa facilidade e velocidade. Basicamente, *C. elegans* pode ser usado para avaliar centenas de milhares de moléculas em múltiplas concentrações a uma fração de custo e tempo que seriam necessários na maioria dos modelos de nematoides parasitos. Há ainda a possibilidade de gerar em laboratórios cepas

resistentes aos efeitos de benzimidazóis, imidazóis e outras classes tradicionais, sendo favorável para a descoberta de novas moléculas (Burns et al., 2015).

A triagem baseada em *C. elegans* reduz custos, promove grandes bibliotecas químicas em base líquida nos formatos de 96, 384 ou 1536 poços e expande o número de medicamentos que podem ser identificados. Todos esses avanços podem contribuir para o desenvolvimento de fármacos contra helmintos e na compreensão dos mecanismos de resistência (O'Reilly et al., 2013).

Além da triagem de substâncias individuais, *C. elegans* tem se consolidado como modelo para avaliação de combinações de fármacos, permitindo a detecção de interações sinérgicas, aditivas ou antagonistas. Nesse tipo de ensaio, nematoides são expostos a diferentes concentrações e proporções de substâncias, e alterações no comportamento, locomoção e sobrevivência são monitoradas. Curvas concentração-resposta são geradas para cada fármaco individual e para as combinações, permitindo determinar se a interação aumenta a eficácia terapêutica ou reduz efeitos adversos. Essa abordagem amplia o potencial de descoberta de fármacos, não apenas para novas moléculas individuais, mas também para combinações, possibilitando a identificação de formulações mais eficazes e estratégias para retardar o surgimento de resistência (Hernando & Bouzat, 2025).

Em suma, um composto que tem um efeito anti-helmíntico em *C. elegans* também pode ter um efeito em uma ampla gama de nematoides parasitos, como foi demonstrado com a maioria dos anti-helmínticos disponíveis comercialmente. Além disso, o modo de ação das drogas pode ser facilmente estudado com este modelo através do comportamento dos nematoides, locomoção, reprodução e morte (Sepúlveda-Crespo et al., 2020). Ensaio com *C. elegans* devem ser considerados como uma ferramenta útil adicional no estágio de triagem. Resultados primários devem ser identificados por meio de ensaios de sobrevivência de *C. elegans* como um filtro inicial, seguido por ensaios de eficácia *in vivo* com parasitos adultos, ensaios de eficácia *in vivo* com animais infectados experimentalmente e devem em seguida, avaliar a toxicidade do hospedeiro de novos anti-helmínticos usando linhas de células de mamíferos ou modelos de vertebrados (Keiser et al., 2016).

Entretanto, nenhum organismo modelo pode ser utilizado para responder a todas as questões de pesquisa, e *C. elegans* apresenta limitações importantes nesse contexto. Entre as

principais restrições na pesquisa de anti-helmínticos, destacam-se as diferenças fisiológicas e biológicas, uma vez que *C. elegans* é um nematódeo de vida livre, habitante do solo e bacteriófago, diferindo substancialmente dos nematoides parasitos que vivem em ambientes específicos do hospedeiro (como trato gastrointestinal, tecidos ou corrente sanguínea) e apresentam ciclos de vida especializados. Além disso, diferenças na permeabilidade da cutícula (barreira externa) e nas vias metabólicas podem influenciar a absorção, metabolização e eliminação de fármacos, resultando em perfis distintos de sensibilidade a anti-helmínticos. Outro aspecto relevante é a ausência do ambiente do hospedeiro, de modo que estudos com *C. elegans* não consideram a influência do sistema imune, da microbiota intestinal ou do metabolismo do hospedeiro, fatores essenciais para a avaliação da eficácia *in vivo*. Ademais, há controvérsias quanto à extrapolação dos resultados, visto que *C. elegans* nem sempre responde de forma semelhante aos anti-helmínticos comerciais quando comparado a parasitas de importância econômica em animais de produção. Por fim, embora seja amplamente utilizado como modelo para triagem inicial, compostos promissores frequentemente não demonstram a mesma eficácia em modelos parasitários, sendo necessária validação adicional em organismos mais representativos (Arroyo-Lopez, 2020; Hahnel et al., 2020; Alberich et al., 2025; Shanley et al., 2025; Sun et al., 2025)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

Os ensaios biológicos foram realizados no período de abril de 2022 a janeiro de 2026 no setor de Diagnóstico de Helmintos e Artrópodes do GRISIUS no Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ.

3.2 Materiais e Reagentes Químicos

Os OEs comerciais utilizados foram *Cinnamomum cassia*¹ (Ferquima, Brasil) e *Origanum vulgare*² (Quinari, Brasil).

Outros reagentes químicos utilizados foram: carvacrol, cinamaldeído, albendazol (Sigma-Aldrich, EUA), ivermectina (Champion Farmoquímico, Brasil) e dimetilsulfóxido (Labsynth, Brasil). Todos os produtos químicos foram diluídos primeiramente em DMSO e posteriormente em H₂O Mili-Q.

Para o desenvolvimento das formulações foram utilizados: alginato de sódio (Farmácia Alquimia, Brasil); cloreto de cálcio (ACS Científica, Brasil); tween 80 – polissorbato com EHL = 15 (Synth, Brasil); sulfato de cálcio (ACS Científica, Brasil); e óleo mineral (Recanto das Essências, Brasil).

Metanol, grau HPLC (Bio Scie, Brasil), foi utilizado para a análise cromatográfica.

3.3 Aquisição de Cepas de *Caenorhabditis elegans* e *Escherichia coli*

Os organismos e microorganismos utilizados foram fornecidos pelo *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), Massachusetts, EUA. Foram utilizadas as seguintes cepas de *C. elegans*: selvagem N2, DA1316 (resistente à ivermectina), CB3474 (resistente ao albendazol),

¹ Lote 226

² Lote LUA

CB211 (resistente ao levamisol) e DH404 (resistente a organofosforados). Para sua alimentação, foi utilizada *Escherichia coli* OP50.

3.4 Manutenção de Cepas

As cepas de *C. elegans* foram cultivadas e mantidas em placas de *Nematode Growth Medium* (NGM), meio capaz de proporcionar um ambiente adequado ao desenvolvimento dos organismos ao longo dos experimentos. As placas de NGM foram incubadas a uma temperatura constante de 21 °C. Como fonte de alimento, foi utilizada a bactéria *E. coli* OP50, uma cepa mutante que serve como dieta padrão para os nematoides, garantindo seu desenvolvimento controlado.

Para a transferência e manutenção das cepas, foi utilizado o método conhecido como *chunking*, em que um pequeno pedaço da placa original de NGM, contendo os nematoides, foi retirado com o auxílio de uma alça descartável estéril e transferido para uma nova placa de Petri contendo meio fresco. Esse processo de transferência foi realizado a cada 14 dias, garantindo que as colônias de *C. elegans* fossem mantidas de forma saudável e ativa ao longo dos experimentos, evitando a superpopulação e a contaminação das placas. Esse método também permitiu a contínua manutenção do ciclo de vida dos nematoides, assegurando sua viabilidade para os testes.

A colônia de *E. coli* OP50 utilizada como alimento para *C. elegans* foi mantida em placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB). Para os experimentos que necessitavam de cultura líquida de *E. coli*, uma única colônia da placa de Petri foi inoculada em caldo de LB. Após a inoculação, os tubos contendo o caldo e as bactérias foram deixados a 37 °C por um período de 8 horas. Após esse período, as culturas líquidas de *E. coli* OP50 foram armazenadas sob refrigeração.

3.5 Meios de Cultura e Soluções

Seguindo os protocolos de Brenner (1974) e Byerly (1976), foram preparados os seguintes meios de cultura: NGM, LB e tampão S em cabine de segurança biológica (Modelo Pa40, Pachane, Brasil).

3.6 Sincronização de *Caenorhabditis elegans*

Para a obtenção de muitos indivíduos em placa de Petri e a realização de testes *in vivo*, foi realizado o método de sincronização descrito por Lewis & Fleming, 1995. Ao fim deste processo, apenas os ovos protegidos por cápsula estavam viáveis, permitindo o acompanhamento do crescimento e seleção dos nematoides.

Três dias antes do processo de sincronização, aproximadamente 20 hermafroditas jovens adultas foram transferidas para uma placa grande de NGM. As placas foram mantidas em uma incubadora a uma temperatura controlada de 20 °C por 3 dias.

No fluxo laminar, preparou-se um tubo estéril contendo 2 mL de hipoclorito de sódio a 5% e 5 mL de solução de NaOH 1M, utilizada como solução de lise. A placa selecionada para a sincronização foi cuidadosamente lavada com água Mili-Q, evitando qualquer esforço que pudesse danificar os nematoides. Em seguida, o tubo foi centrifugado por aproximadamente 1 minuto a 1200 x g, permitindo que os nematoides se sedimentassem no fundo.

O sobrenadante foi aspirado até restar apenas 1 mL de volume no tubo. Em seguida, a solução de lise foi adicionada e homogeneizada vigorosamente. Após isso, a centrifugação foi repetida nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente aspirado até que restasse apenas 1 mL de volume no tubo, e então completou-se o volume até 10 mL com água. Este procedimento foi seguido por mais duas vezes, totalizando três lavagens.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi aspirado até restar 1 mL de volume no tubo. A seguir, adicionou-se 5 mL de meio líquido de NGM e o tubo foi centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi aspirado até que restasse apenas 1 mL, e o restante da solução foi transferido para uma nova placa de NGM que não continha *E. coli*, mantendo-a em incubação por 8 horas a 20 °C.

Todo procedimento foi realizado em um tempo máximo de dez minutos para evitar a morte dos nematoides.

No dia seguinte, a placa recebeu alimentação com 50 μL de *E. coli* OP50 líquida, fornecendo a nutrição necessária para os ovos, que agora estavam sincronizados e prontos para os experimentos subsequentes.

3.7 Caracterização Química dos Óleos Essenciais

A análise cromatográfica dos OEs foi realizada em um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM, GC-17A/QP2010 Plus, Shimadzu/USA), com coluna capilar HP-5MS, a 60 °C por 1 minuto. Em seguida, foi aquecido a 290 °C (10 °C.min⁻¹) e mantido nessa temperatura por 10 minutos. A temperatura do injetor foi de 220 °C, com interface de 310 °C, fonte de íons de 250 °C e a energia de impacto de 70 eV. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com taxa de fluxo de um mL.min⁻¹, razão de divisão 1:30, e 1,0 μL de óleo bioativo injetado com diclorometano. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de varredura de 40-500 μm . Os componentes dos OEs foram identificados por comparação com o banco de dados da biblioteca (Nist08).

3.8 Testes *in vivo* em *Caenorhabditis elegans*

3.8.1 Letalidade em Indivíduos Adultos

Para este teste, foram utilizadas as cepas N2 (selvagem), DA1316 (resistente à ivermectina), CB211 (resistente ao levamisol) e CB3474 (resistente ao albendazol). O procedimento experimental foi adaptado de Chaweeborisuit et al. (2016). Indivíduos adultos de *C. elegans* foram cuidadosamente selecionados a partir de placas de cultura, com base em tamanho e desenvolvimento, garantindo a inclusão apenas de nematoides adultos para padronizar a resposta ao tratamento. Os nematoides foram lavados com tampão S, garantindo a remoção de qualquer resíduo de meio ou contaminantes que poderiam interferir nas observações subsequentes. Uma solução contendo aproximadamente 20 indivíduos adultos em 20 μL de tampão S foi transferida para placas de 96 poços. Juntamente a 20 μL de solução teste e 160 μL de tampão S, sendo assim, o volume final em cada poço foi estabelecido em 200 μL .

Todos os ativos foram solubilizados previamente em DMSO, de modo que a concentração final nos poços durante o contato com os nematoides fosse de 0,1%, e prepararam-se dez concentrações equidistantes para o ensaio.

Para assegurar a validade dos resultados obtidos, foram incluídos como controle negativo DMSO 0,1% e como controle positivo foi utilizada ivermectina 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as cepas N2, CB3473 e CB211, e albendazol 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a cepa DA1316. O ensaio foi considerado válido quando o percentual de resposta no controle negativo apresentou até 10% de mortalidade e o controle positivo atingiu no mínimo 90%.

Após a preparação das placas, estas foram incubadas em temperatura controlada a 20 °C por um período de 48 horas, permitindo a avaliação do efeito dos tratamentos sobre a sobrevivência dos indivíduos.

Durante o experimento, as observações foram realizadas em dois tempos: no início (0 horas) e após a incubação de 48 horas. Utilizando um estereomicroscópio, os indivíduos foram examinados e classificados em vivos ou mortos. Os nematoides foram considerados vivos quando apresentavam movimento livre e ativo, enquanto aqueles sem qualquer movimento foram classificados como mortos. O procedimento experimental completo está detalhado na Figura 2.

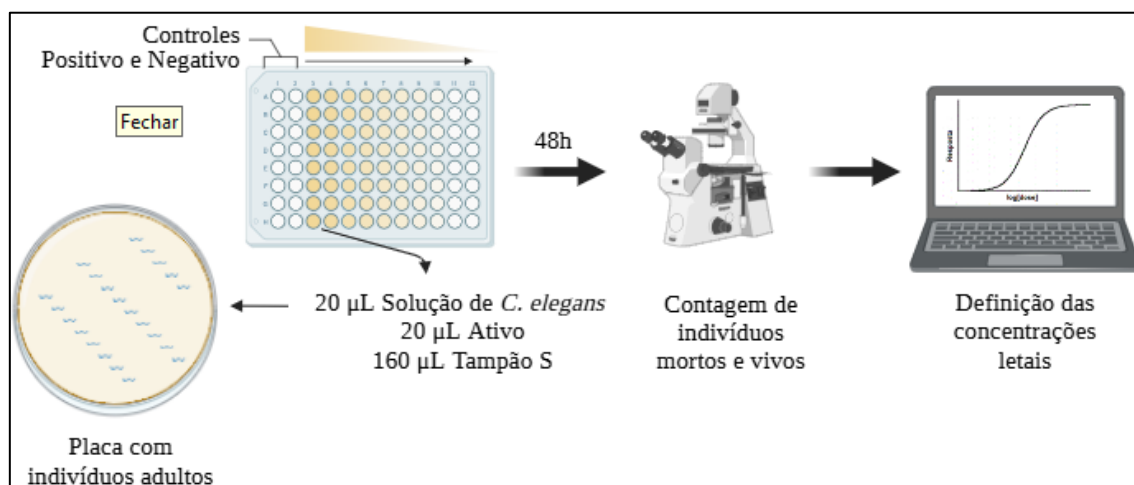


Figura 2. Desenho esquemático do teste in vivo de letalidade de indivíduos adultos. Fonte: autor.

O teste de letalidade em adultos foi conduzido utilizando os OEs isolados, além de seus componentes majoritários, identificados posteriormente por CG-EM. Esses testes foram realizados em quintuplicata, em dois dias distintos, para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

3.8.2 Eclodibilidade de Ovos

O procedimento experimental foi adaptado de Bizimenyera et al. (2006) com modificações. A solução contendo os ovos, após a sincronização, foi utilizada diretamente na realização do teste de eclodibilidade.

Aproximadamente 20 μL de uma solução contendo cerca de 20 ovos de *C. elegans* N2 foram transferidos para placas de 96 poços que continham 20 μL da solução teste. O volume total na placa foi ajustado para 200 μL , completando com tampão S. Para garantir a consistência dos resultados, utilizou-se 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de albendazol como controle positivo e DMSO a 0,1% como controle negativo. O ensaio seguiu os mesmos parâmetros de validade utilizados no ensaio anterior.

As placas foram incubadas a uma temperatura controlada de 23 °C por um período de 24 horas, permitindo a observação do desenvolvimento, sendo contados os ovos não eclodidos e os indivíduos em primeiro estágio larval (L1).

Durante esse tempo, os ovos não eclodidos e as larvas L1 foram cuidadosamente observados e contados sob um estereomicroscópio. Os detalhes do procedimento podem ser visualizados na Figura 3.

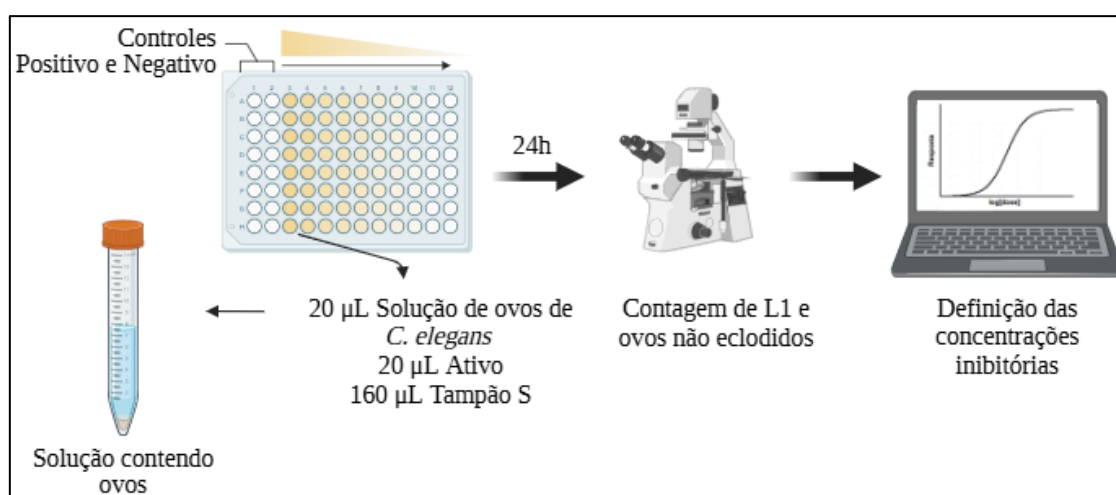


Figura 3. Desenho esquemático do teste *in vivo* de eclodibilidade de ovos. Fonte: autor.

O teste de eclodibilidade de ovos foi realizado de maneira semelhante ao teste de letalidade, abrangendo tanto os OEs quanto seus componentes majoritários. Este experimento foi conduzido em quintuplicata e em dois dias distintos.

3.8.3 Postura de Ovos

O procedimento experimental foi adaptado de Lee e Kang (2017). Aproximadamente 10 indivíduos adultos grávidos de *C. elegans* N2 foram cuidadosamente transferidos para placas de Petri contendo meio NGM e os diferentes OEs individualmente na concentração equivalente a CL₁₀. As placas foram incubadas a uma temperatura constante de 20 °C. Para monitorar a produção de ovos, os indivíduos foram transferidos para novas placas a cada 24 horas, ao longo de um período de 5 dias. Durante este tempo, os ovos foram observados e contados diariamente, permitindo a avaliação da taxa de eclodibilidade dos ovos em resposta aos tratamentos aplicados. Este procedimento é detalhado na Figura 4.

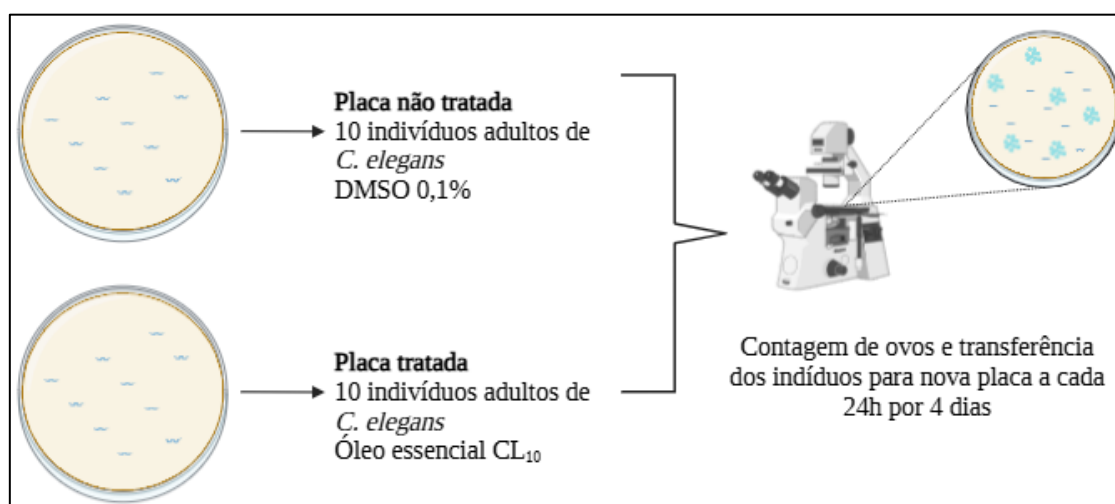


Figura 4. Desenho esquemático do teste *in vivo* de postura de ovos. Fonte: autor.

Assim como nos testes anteriores, tanto de letalidade quanto de eclodibilidade, este teste também foi realizado com os OEs e seus componentes majoritários. O teste foi conduzido em duplicata e em dois dias diferentes.

3.8.4 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O exame morfológico por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizado com o objetivo de avaliar alterações estruturais em *C. elegans* após exposição aos OEs. Para esta análise, foram utilizados nematoides adultos da cepa N2 provenientes do ensaio de letalidade, incluindo indivíduos expostos aos OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* na concentração correspondente à CL₉₀, bem como indivíduos controle correspondentes do mesmo ensaio.

O preparo das amostras foi realizado na Unidade de Microscopia Padrón-Lins (UniMicro) do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG).

Inicialmente, as lâminas ou lamínulas de vidro foram tratadas com Poli-L-lisina por 5 minutos, sendo o excesso removido com papel filtro, e as amostras depositadas sobre a superfície por 5 minutos para adesão. Em seguida, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora, e lavadas três vezes por 15 minutos cada em tampão cacodilato 0,1 M. A pós-fixação foi realizada em solução de 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (1:1) por 1 hora, seguida de lavagem conforme descrito anteriormente. A desidratação foi conduzida em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), com 15 minutos em cada concentração, incluindo três trocas na concentração final para garantir a remoção completa da água. Caso fosse necessário interromper o processamento, as amostras eram mantidas em 70% de etanol sob refrigeração. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem por ponto crítico com gás carbônico e montadas em *stubs* com fita dupla-face de carbono. A metalização foi realizada por *sputtering* com ouro, seguindo o procedimento operacional padrão do equipamento.

A análise microscópica foi realizada no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO), utilizando um microscópio Zeiss EVO 10 operando a 5 kV, permitindo a observação detalhada da morfologia dos nematoides tratados e não tratados.

3.8.5 Avaliação da Sinergia

Para a realização do teste de sinergia, foi utilizada uma matriz de avaliação com uma escala de 0 a 100, conforme Tabela 1. A metodologia aplicada seguiu os mesmos parâmetros utilizados no teste de letalidade em adultos, assegurando a consistência na abordagem experimental. As substâncias majoritárias dos OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* foram identificados através da análise cromatográfica. Todos os testes foram realizados em duplicata, em dois dias distintos.

Tabela 1. Matriz experimental da avaliação de sinergia.

Carvacrol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cinamaldeído ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
	0	1	5	25	50	75	100
0	0:0	0:1	0:5	0:25	0:50	0:75	0:100
1	1:0	1:1	1:5	1:25	1:50	1:75	1:100
5	5:0	5:1	5:5	5:25	5:50	5:75	5:100
25	25:0	25:1	25:5	25:25	25:50	25:75	25:100
50	50:0	50:1	50:5	50:25	50:50	50:75	50:100
75	75:0	75:1	75:5	75:25	75:50	75:75	75:100
100	100:0	100:1	100:5	100:25	100:50	100:75	100:100

3.9 Testes *in vitro* em *Haemonchus contortus*

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

3.9.1 Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO)

O ensaio foi conduzido conforme o método descrito por Coles et al. (1992). Para o teste, os OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* foram preparados de forma idêntica aos testes anteriores. Aproximadamente 100 a 150 ovos foram transferidos para cada poço de uma placa de 96 poços, sendo adicionadas diferentes diluições da solução de trabalho em triplicata no mesmo dia. O conteúdo final de cada poço consistiu em 940 µL de água destilada, 10 µL de suspensão de ovos e 50 µL da solução de trabalho. As placas foram incubadas a 27 °C, com umidade relativa superior a 80%, por 48 horas, após o que ovos e larvas foram contados utilizando um microscópio invertido. O ensaio foi realizado em triplicata no mesmo dia.

3.9.2 Teste de Inibição da Migração Larval (TIML)

Previamente aos testes, foi realizada a seleção das L3 viáveis com capacidade de migração, mediante o método de Baermann-Moraes (Moraes, 1948), com tela de nylon de 25 µm de abertura, por período de 6 horas. Após a seleção, apenas as L3 viáveis foram utilizadas no Teste de Inibição da Migração Larval (TIML) adaptado por Demeler et al. (2010), com modificações. Foram utilizadas placas de cultivo celular com 24 poços, nos quais foram adicionados 1690 µL de Tween 80 a 1,065%, 90 µL das OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* em DMSO a 10% e 20 µL de suspensão larval em SF, contendo de 90 a 100 L3, perfazendo o volume final de 1800 µL. As placas foram incubadas a 27°C, em estufa BOD, por 24 horas.

Todos os testes foram realizados em conjunto com o controle negativo (DMSO a 0,5% + Tween 80 a 1%) e positivo (L3 aquecidas a 60°C durante 10 minutos), sendo utilizados os dados de testes com pelo menos 90% de migração no controle positivo e 0% de migração no controle negativo. Os princípios ativos foram diluídos em DMSO e mantidos em forma de solução estoque, congelados a -5°C na concentração de 10-1 molar (M), sendo utilizados em até 30 dias após o preparo. Nos poços, as concentrações finais de DMSO e Tween 80 foram de 0,5% e 1%, respectivamente.

3.10 Desenvolvimento das Formulações

No processo de formulação, carvacrol e cinamaldeído foram selecionados como princípios ativos e incorporados em óleo mineral para alcançar as concentrações determinadas em estudos anteriores. Para o desenvolvimento das formulações inovadoras, essas substâncias majoritárias dos OEs foram preparados de maneira a maximizar sua estabilidade, manipulação e biodisponibilidade. As preparações foram concebidas para proteger os princípios ativos contra degradação, permitir a liberação controlada das substâncias e garantir concentrações eficazes nos sistemas-alvo.

3.10.1 *Beads* por Gelificação Iônica

O método de gelificação iônica é uma técnica para a síntese de micropartículas ou nanopartículas, baseada na interação eletrostática entre cargas opostas e envolvendo pelo menos um polímero sob agitação mecânica. Essa abordagem tem sido aplicada em diversas áreas, incluindo agricultura, farmacologia e biotecnologia, para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e formulações funcionais (Hoang et al., 2022).

Para a produção das *beads*, a técnica de gelificação iônica foi adaptada conforme o protocolo de Calero et al. (2008). Primeiramente, foi preparada uma solução gelificante de alginato de sódio a 2% utilizando água Milli-Q. Para garantir uma homogeneização eficaz, a solução foi solubilizada com um dispersor Ultra-Turrax (T10 basic, IKA®, Brasil) na velocidade máxima. Em seguida, foi adicionado Tween 80 a 1%, como emulsificante, melhorando a estabilidade da solução e favorecendo a incorporação dos princípios ativos. O enriquecimento das *beads* foi realizado com cinamaldeído e carvacrol, cada um na concentração de 5%. O volume total da solução gelificante preparada foi de 40 mL, permitindo uma produção adequada de *beads* para as avaliações posteriores.

Uma solução de cloreto de cálcio a 2% também foi preparada utilizando água Milli-Q e mantida sob agitação em um agitador magnético (Modelo 752A, Fisatom, Brasil). O processo de gotejamento da solução gelificante na solução de cloreto de cálcio foi realizado com uma seringa e agulha (seringas de insulina acopladas às agulhas 13 mm x 0,45 mm), a uma altura de aproximadamente 20 cm, garantindo a formação de *beads* esféricas sob agitação constante.

Após o gotejamento, as *beads* foram deixadas em contato com a solução de cloreto de cálcio por mais 30 minutos, permitindo a gelificação completa das esferas.

Para evitar aglomeração e remover o excesso de cloreto de cálcio, as esferas foram lavadas a vácuo com água destilada, utilizando papel de filtro HV Durapore de 47 mm de diâmetro e 0,45 μm . A secagem das *beads* foi realizada em uma bandeja, dentro da cabine de segurança biológica, durante 8 horas. No dia seguinte, as esferas secas foram pesadas e armazenadas em um local apropriado, protegido de luz e umidade. Todo o processo foi conduzido à temperatura ambiente, aproximadamente 20 °C, assegurando a integridade e a qualidade das *beads* produzidas (Figura 5).

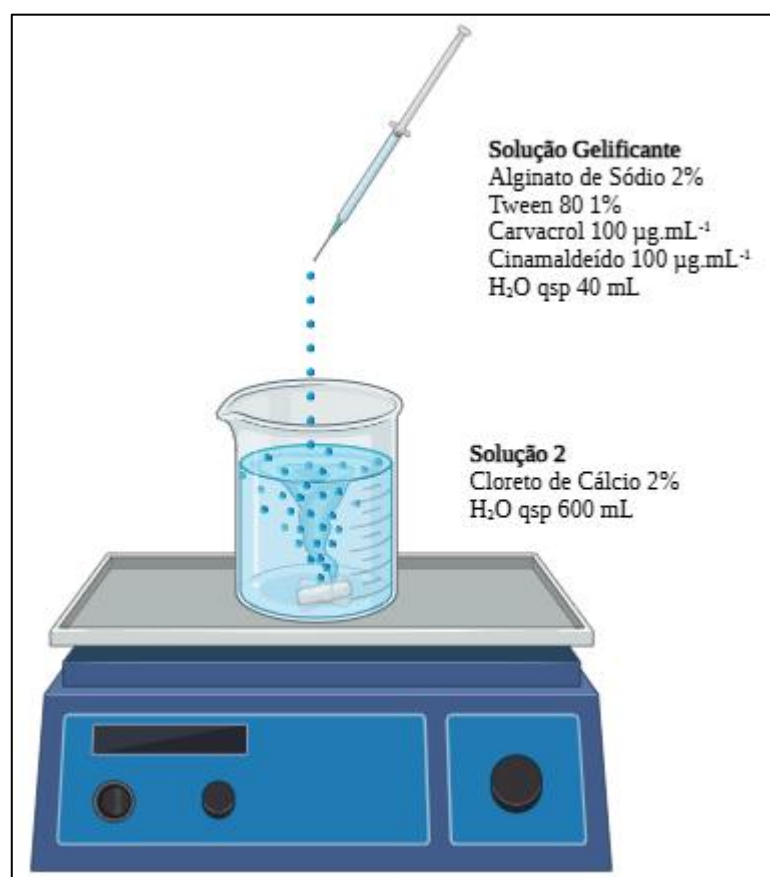


Figura 5. Preparo de *beads* por gelificação iônica. Fonte: autor.

3.10.2 *Beads* Carregadas com Sulfato de Cálcio

Beads carregadas com sulfato de cálcio são materiais versáteis, geralmente biocompatíveis e reabsorvíveis, que funcionam como veículo para a liberação local e controlada de agentes ativos. Esses sistemas permitem a manutenção de concentrações efetivas das substâncias no local desejado, aumentando a eficácia da ação, efeitos terapêuticos ou

funcionais. Além disso, *beads* de sulfato de cálcio apresentam aplicações em diferentes áreas, como medicina, farmacologia e agricultura, evidenciando sua versatilidade em múltiplos contextos (Alkayali, et al., 2024).

A produção de *beads* carregadas com sulfato de cálcio foi realizada conforme o protocolo de Shi et al. (2022), com algumas adaptações. Em um almofariz, foram adicionados 15 g de sulfato de cálcio e 6,42 mL da solução contendo 10% de cada princípio ativo. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada para garantir uma distribuição uniforme do óleo mineral e do princípio ativo.

Em seguida, a mistura foi colocada em um molde de silicone com auxílio de uma espátula. Após o processo de moldagem, o material foi seco em uma cabine de segurança microbiológica por aproximadamente 3 horas. Uma vez secas, as *beads* foram cuidadosamente retiradas do molde para evitar danos. O material produzido foi armazenado em um ambiente apropriado. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente (Figura 6).

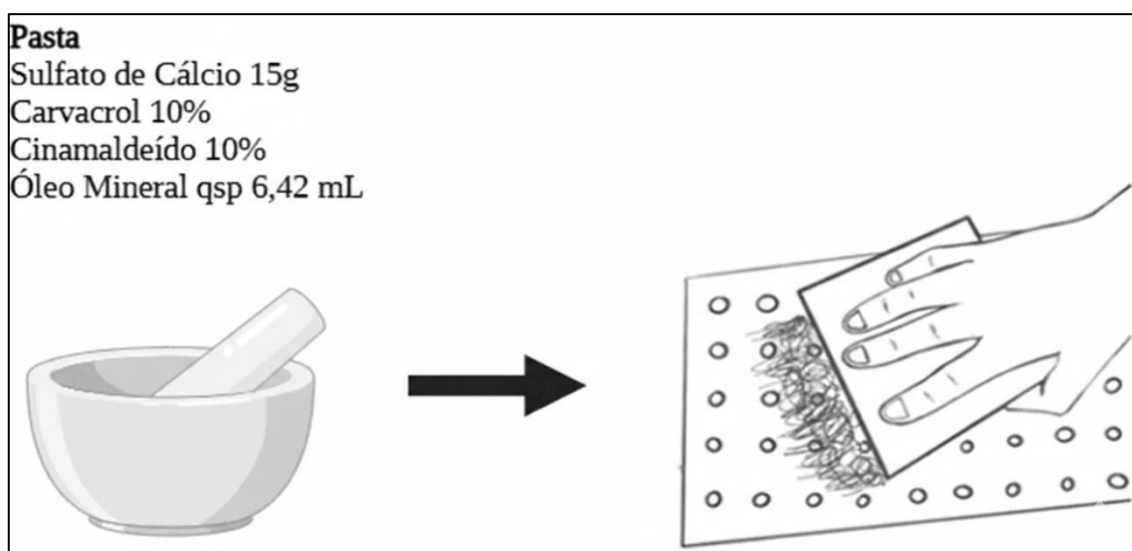


Figura 6. Preparo de *beads* carregadas com sulfato de cálcio. Fonte: autor.

3.11 Método Analítico

O método desenvolvido teve como base as seguintes normas:

- Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da Anvisa,
- Guia nº 10, versão 1, de 30 de agosto de 2017, da Anvisa e

- *Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F*, p. 9 da AOAC.

O método foi desenvolvido e validado para a determinação de carvacrol e cinamaldeído nas formulações desenvolvidas, utilizando condições específicas que atendem aos critérios de qualidade analítica exigidos por essas regulamentações.

3.11.1 Condições Cromatográficas

Para a validação analítica, o carvacrol, o cinamaldeído e as formulações contendo esses ativos foram analisados por HPLC, com o objetivo de desenvolver e validar um método preciso, reprodutível e específico para a identificação e quantificação dessas substâncias nas formulações.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Ultimate 3000 Dionex, equipado com uma bomba quaternária Ultimate 3000 Dionex, forno para coluna Ultimate 3000 Dionex e detector de fluorescência RF2000 Dionex. Os dados cromatográficos foram obtidos e tratados utilizando o software Chromeleon versão 6.80 (Dionex). Foi utilizada uma coluna cromatográfica Nucleosil C18, 100Å, 3,5 µm, 100 x 4,6 mm (Kromasil). A fase móvel foi composta por acetonitrila e água (70:30), filtrada em membrana filtrante HV Durapore de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm (Millipore), com um fluxo de 1 mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL, com comprimento de onda ajustado para 278 nm para carvacrol e 292 nm para cinamaldeído. O tempo de corrida foi de 7 minutos e a temperatura do forno foi mantida a 40 °C.

3.11.2 Preparo de Amostras

Para o preparo das amostras, foi inicialmente preparada uma solução estoque na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Para isso, pesaram-se 25 mg de cada OE ou formulações, os quais foram dissolvidos em 250 µL de DMSO e o volume final foi ajustado para 25 mL com água ultrapura em balão volumétrico. As soluções de trabalho foram obtidas a partir dessa solução estoque, mediante a transferência de alíquotas de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,2 mL para balões volumétricos de 10 mL, sendo o volume completado com a fase móvel.

3.11.3 Ensaios

A linearidade foi verificada analisando-se amostras de carvacrol e cinamaldeído nas concentrações de 5; 10; 50; 100 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os critérios de aceitação para a avaliação da linearidade incluíram a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, acompanhada por um gráfico de dispersão dos resíduos e sua respectiva avaliação estatística. A equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados, foi apresentada, assim como a avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação ($r > 0,990$) e de determinação (r^2). Além disso, a significância do coeficiente angular foi significativamente diferente de zero. A homocedasticidade dos dados foi investigada para garantir a utilização do modelo estatístico mais adequado. Nos testes estatísticos, o nível de significância adotado foi 5% ($p \leq 0,05$).

O efeito matriz foi avaliado em formulações contendo cinamaldeído e carvacrol nas mesmas concentrações utilizadas na avaliação da linearidade. Para isso, foram utilizadas duas matrizes distintas: *beads* obtidas por gelificação iônica e *beads* de sulfato de cálcio. A avaliação foi realizada comparando os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a Substância Química de Referência (SQR) dos analitos em solvente e nas amostras fortificadas com a SQR dos analitos. As curvas de calibração foram preparadas seguindo os mesmos critérios adotados para a linearidade, utilizando cinco níveis de concentração diferentes, cada um analisado em triplicata. A ausência de interferência dos constituintes das matrizes foi determinada por meio da avaliação do paralelismo das curvas de calibração, utilizando teste de hipóteses com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). O paralelismo foi considerado indicativo da ausência de efeito matriz nas formulações analisadas.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados com base nos parâmetros da curva analítica, utilizando fórmulas específicas que relacionam a resposta do equipamento à concentração dos analitos. O cálculo foi realizado a partir da equação abaixo:

$$LD: \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \text{ e } LQ: \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

Onde σ representa o desvio-padrão da resposta e IC é a inclinação da curva de calibração. Esses parâmetros foram obtidos a partir da análise estatística dos dados

cromatográficos gerados durante a construção da curva analítica. O LD foi definido como a menor concentração detectável com confiança estatística, enquanto o LQ foi definido como a menor concentração quantificável com precisão e exatidão adequadas.

As precisões intra-dia e inter-dia foram avaliadas nas concentrações de 10; 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentrações baixa, média e alta, respectivamente) em triplicata de amostras. O resultado foi expresso em função de CV%. As amostras foram consideradas precisas quando os desvios foram inferiores a 15% para as concentrações maiores do que o LQ e 20% para as concentrações do LQ (concentração baixa).

A exatidão foi avaliada utilizando-se as mesmas amostras da precisão, comparando-se a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Esta é utilizada como 100%. Foram desejáveis valores de exatidão entre 80 e 120%.

A faixa de trabalho foi derivada do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. Deve atender simultaneamente aos critérios de aceitação da exatidão, precisão e linearidade.

3.12 Análise Estatística

Para a análise estatística dos testes *in vivo* de letalidade em adultos e eclodibilidade de ovos, foram realizadas duas etapas. Inicialmente, aplicou-se o teste de Bartlett a todos os dados obtidos nos bioensaios, permitindo a confecção de gráficos de boxplot. Esses gráficos foram essenciais para identificar dados discrepantes ou aberrantes, evidenciando valores amostrais não típicos em comparação com os demais resultados. Os dados considerados atípicos foram excluídos antes de prosseguir para a segunda etapa da análise, onde foi realizada a análise de Probit. Para essa etapa, utilizou-se o software RStudio® versão 4.3.3, com o pacote de ecotoxicologia e o teste de Bartlett, para determinar os valores de CL_{50} (concentração letal 50%) e CL_{90} (concentração letal 90%) ou CI_{50} (concentração inibitória 50%) e CI_{90} (concentração inibitória 90%).

Em cepas resistentes, foi avaliado o fator de resistência (FR), ou seja, a razão entre a CL_{50} da cepa resistente e a CL_{50} de uma cepa selvagem ao mesmo tratamento. Essa medida é

amplamente utilizada para quantificar a magnitude da resistência de organismos, como insetos, ácaros ou microrganismos, a pesticidas ou medicamentos (Castro-Janer et al., 2009). Para a interpretação dos resultados sobre o diagnóstico de resistência anti-helmíntica em *C. elegans*, foram utilizadas três categorias estabelecidas por Castro-Janer et al. (2009), onde:

- a) Suscetível (S): quando $FR \leq 1$
- b) Resistência insipiente (RI): quando $1 < FR < 2$
- c) Resistente (R): $FR \geq 2$

Para o ensaio de postura de ovos, os resultados foram expressos em médias e desvios padrão, com a análise estatística realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de um fator, utilizando o software Excel®. Essa abordagem permitiu a comparação das diferentes condições experimentais e a avaliação da significância das diferenças observadas entre os grupos. O teste ANOVA foi complementado pelo teste de comparação múltipla de *Tukey*, adotando um nível de significância de 95%, garantindo a robustez dos resultados obtidos.

A análise estatística para sinergia foi conduzida utilizando o *SynergyFinder*® 3.0, um software que emprega diferentes modelos estatísticos para avaliar as interações entre as substâncias. Essa ferramenta permite a modelagem de curvas dose-resposta, possibilitando a identificação de sinergia, aditividade ou antagonismo nas interações observadas. Os modelos utilizados incluem o modelo de *Bliss*, o modelo de *Loewe* e o modelo de *HSA*. Os resultados por modelos de interação são expressos através de um mapa de pontuação de sinergia (*Synergy Score*, $\pm 95\%$ IC), no qual a pontuação varia de -30 a 30. As áreas sinérgicas são representadas no mapa na cor vermelha, correspondendo a um *score* positivo, ou seja, de 10 a 30. As áreas antagônicas são representadas no mapa na cor verde, correspondendo a um *score* negativo, ou seja, de -10 a -30. Áreas onde há ausência de interação não são utilizadas cores correspondendo a um *score* de -10 a 10. Os eixos X e Y do gráfico representam as concentrações testadas de cinamaldeído e carvacrol, respectivamente. O valor médio da pontuação de sinergia (SS) de toda a matriz também é determinado, e foi interpretado como: antagônica (pontuações menores que -10), aditiva (pontuações entre -10 e 10) e sinérgica (pontuações maiores que 10) (Ianevski et al., 2022).

A taxa de atividade para a comparação das CL₅₀ e seus intervalos de confiança foi gerada utilizando como base a fórmula descrita por Robertson et al. (2007) para o FR, sendo representada abaixo. A significância de cada comparação foi determinada quando o RR IC95% calculado foi > 1,0.

$$Taxa\ de\ atividade = \frac{CL50\ componenente\ majortitário\ x\ Teor\ do\ ativo}{CL50\ óleo\ essencial\ x\ Teor\ do\ ativo}$$

Por fim, nos testes realizados com *H. contortus*, para ambos os ensaios, TEO e TIML, os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por regressão não linear. No TEO, a taxa de eclodibilidade foi expressa em percentual, conforme Coles et al. (1992):

$$Taxa\ de\ eclodibilidade\ (\%) = \frac{número\ de\ larvas}{número\ de\ ovos + número\ de\ larvas} \times 100$$

No LMIT, a porcentagem de inibição da migração larval foi calculada pela fórmula:

$$\% \ de \ inibição = \frac{número\ de\ larvas\ não-imigrantes}{número\ de\ larvas\ não-imigrantes + número\ de\ larvas\ imigrantes} \times 100$$

Curvas dose-resposta sigmóides foram construídas para cada composto ativo utilizando regressão não linear de inclinação variável, após transformação logarítmica das concentrações ($X = \log X$) e normalização da resposta em escala de 0 a 100%. A concentração efetiva média necessária para inativar 50% da população (CE₅₀) foi calculada pelas equações:

$$Y = 100 / (1 + 10^{(LogCE50 - X) \times HillSlope})$$

$$\log CE50 = \log CE90 - \frac{1}{HillSlope} \times \log \frac{90}{100 - 90}$$

$$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(log CE50 - X) \cdot HillSlope}}$$

Onde:

Y= percentual de eficácia ou inibição;

X= logaritmo da concentração;

Bottome Top= valores mínimo e máximo da curva;

HillSlope= inclinação da curva dose-resposta.

No TIML, o coeficiente de determinação (r^2) foi calculado para avaliar a qualidade do ajuste do modelo. Após a determinação da CE_{50} de cada composto contra os diferentes isolados, foi calculado o fator de resistência:

$$Fator\ de\ resistência = \frac{CE50\ isolado\ resistente}{CE50\ isolado\ sensível}$$

A significância das CE_{50} e dos *HillSlopes* entre diferentes substâncias foi avaliada pela análise de sobreposição dos intervalos de confiança. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Composição Química dos Óleos Essenciais

A análise cromatográfica do OE de *O. vulgare* revelou predominância de monoterpenos oxigenados, que representaram a principal fração química do perfil analisado. O composto majoritário foi o carvacrol (58,92%), seguido por outros monoterpenos oxigenados relevantes, como timol (3,76%), linalol (5,21%), cânfora (1,56%), borneol (1,83%), terpinen-4-ol (1,28%), α -terpineol (1,48%) e 1,8-cineol (2,35%). Entre os monoterpenos hidrocarbonados identificados, destacam-se o p-cimeno (7,25%), γ -terpineno (6,53%), α -terpineno (1,11%) e limoneno (1,17%), os quais contribuem para a complexidade do perfil volátil do óleo. Também foram identificados sesquiterpenos hidrocarbonados, como (E)-cariofileno (5,26%) e α -humuleno (0,76%), em menores proporções. O perfil químico foi complementado por uma fração de compostos não identificados (1,52%), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Perfil químico do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

Pico	TR (min)	% área	IRL calculado	IRL literatura	Substância	Classe química
1	8,246	1,52	879	n/i	Não identificado	n/i
2	9,657	1,11	918	1014	α -Terpineno	Hidrocarboneto monoterpênico
3	9,989	7,25	926	1022	p-Cimeno	Hidrocarboneto monoterpênico
4	10,149	1,17	930	1024	Limoneno	Hidrocarboneto monoterpênico
5	10,288	2,35	933	1026	1,8-Cineol (Eucaliptol)	Monoterpeno oxigenado
6	11,335	6,53	959	1054	γ -Terpineno	Hidrocarboneto monoterpênico
7	13,100	5,21	1002	1095	Linalol	Monoterpeno oxigenado
8	15,263	1,56	1050	1141	Cânfora	Monoterpeno oxigenado
9	16,367	1,83	1075	1165	Borneol	Monoterpeno oxigenado
10	16,715	1,28	1083	1174	Terpinen-4-ol	Monoterpeno oxigenado
11	17,393	1,48	1098	1186	α -Terpineol	Monoterpeno oxigenado
12	21,721	3,76	1195	1289	Timol	Monoterpeno oxigenado
13	22,288	58,92	1208	1298	Carvacrol	Monoterpeno oxigenado
14	27,079	5,26	1320	1417	(E)-Cariofileno	Hidrocarboneto sesquiterpênico
15	28,561	0,76	1356	1452	α -Humuleno	Hidrocarboneto sesquiterpênico
Compostos terpênicos identificados						% área
Hidrocarbonetos monoterpênicos						16,06
Monoterpenos oxigenados						76,39
Monoterpenos totais						92,45
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos						6,02
Sesquiterpenos oxigenados						-
Sesquiterpenos totais						6,02
Total identificado						98,47

IRL – Índice Retenção Linear.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *C. cassia* revelou um perfil químico amplamente dominado por fenilpropanoides, com destaque para o (E)-cinamaldeído, que foi

identificado como composto majoritário, representando 80,68% da composição total. Entre os demais fenilpropanoides detectados, destacam-se o (E)-o-metoxicinamaldeído (9,68%), o (E)-acetato de cinamila (3,62%) e o (Z)-cinamaldeído (0,31%), os quais contribuem para o perfil aromático característico do óleo essencial. Além desses, também foram identificados compostos aromáticos de outras classes, incluindo o benzaldeído (0,88%) e o o-anisaldeído (0,75%), ambos classificados como aldeídos aromáticos, bem como o álcool feniletílico (0,35%) e o hexanol (0,27%). A cumarina (2,02%), pertencente à classe das cumarinas, também foi detectada em proporção relevante. Em menor abundância, foi identificado o sesquiterpeno hidrocarbonado α -cubebeno (0,29%), enquanto outros compostos minoritários não identificados corresponderam a pequenas frações da composição total. O perfil químico detalhado está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil químico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia*.

Pico	TR (min)	% área	IRL calculado	IRL literatura	Substância	Classe química
1	3,181	0,27	750	796	Hexanol	Álcool alifático
2	3,322	0,19	755	n/i	Não identificado	-
3	6,481	0,88	872	952	Benzaldeído	Aldeído aromático
4	8,338	0,16	930	1024	Limoneno	Hidrocarboneto monoterpênico
5	11,874	0,35	1024	1107	Álcool feniletílico	Álcool aromático
6	13,921	0,53	1073	1146/1166	Fenol 2-(1Z)-propenil- / Coahuilensol	Fenol
7	16,388	0,31	1132	1217	(Z)-Cinamaldeído	Fenilpropanóide
8	17,331	0,75	1154	1239	o-Anisaldeído	Aldeído aromático
9	19,016	80,68	1193	1270	(E)-Cinamaldeído	Fenilpropanóide
10	22,49	0,29	1276	1348	α -Cubebeno	Hidrocarboneto sesquiterpênico
11	22,733	0,21	1281	n/i	Não identificado	-
12	25,717	2,02	1355	1432	Cumarina	Cumarinas
13	25,851	3,62	1358	1443	(E)-Acetato de cinamila	Fenilpropanóide
14	28,668	0,06	1429	n/i	Não identificado	-
15	29,41	9,68	1449	1527	(E)-o-Metoxicinamaldeído	Fenilpropanóide
Compostos terpênicos identificados						% área
Hidrocarbonetos monoterpênicos						0,16
Monoterpenos oxigenados						-
Monoterpenos totais						0,16
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos						0,29
Sesquiterpenos oxigenados						-
Sesquiterpenos totais						0,29
Total identificado						0,45

IRL – Índice Retenção Linear.

4.2 Testes *in vivo*

4.2.1 Letalidade em Adultos

Os resultados dos testes de mortalidade de nematoides em cepa N2 com diferentes concentrações de OEs e seus respectivos componentes majoritários mostraram variação significativa nos efeitos de cada substância.

Para o *O. vulgare*, foi avaliada a faixa de 0,06 a 542,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste teste, a mortalidade dos nematoides aumentou conforme a concentração do OE, atingindo 100% de mortalidade a partir de 454,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O coeficiente de variação indicou consistência nos resultados. No caso do carvacrol, seu componente majoritário, observou-se que a mortalidade aumentou gradualmente com a concentração, alcançando 100% a partir de 454,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para *C. cassia*, com faixa avaliada de 4,6 a 517,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi observado o mesmo efeito linear na letalidade x concentração, atingindo 100% de mortalidade a partir de 306,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com uma média de 98,5% a 181,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O cinamaldeído, seu componente majoritário, demonstrou um aumento na letalidade até a concentração de 518,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com 100% de mortalidade nas concentrações mais altas. Os dados brutos estão apresentados no Apêndice A.

Após análise estatística, observou-se que OE de *O. vulgare* apresentou uma CL_{50} de 1,03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma CL_{90} de 46,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O carvacrol apresentou um valor de CL_{50} de 6,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma CL_{90} de 677,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O OE de *C. cassia* teve uma CL_{50} de 53,09 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma CL_{90} de 356,47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto o cinamaldeído demonstrou uma CL_{50} de 47,87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma CL_{90} de 185,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Quando comparadas as inclinações das curvas dos 4 ativos, o cinamaldeído apresentou a maior inclinação (2,1747), sugerindo que a mortalidade aumenta mais rapidamente com o aumento da concentração para este composto.

A ivermectina, um fármaco amplamente estudado e utilizado no tratamento de helmintoses, apresentou uma CL_{50} de 0,14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando sua eficácia no modelo experimental empregado. Em comparação, os resultados obtidos para as demais substâncias indicam que são necessárias concentrações substancialmente maiores para alcançar a mesma atividade.

Tabela 4. Ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) expostos a diferentes tratamentos por 48 horas.

Parâmetros	Óleo Essencial/Componente Majoritário
------------	---------------------------------------

	Ivermectina ¹	<i>O. vulgare</i>	Carvacrol	<i>C. cassia</i>	Cinamaldeído
CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	0,14	1,03	6,81	53,09	47,87
IC 95% (µg.mL ⁻¹)	0,12 - 0,16	0,86 - 1,21	5,05 - 9,14	46,68 - 60,46	44,10 - 51,93
CL ₉₀ (µg.mL ⁻¹)	0,7	46,26	677,37	356,47	185,95
IC 95% (µg.mL ⁻¹)	0,53 - 1,00	36,55 - 59,95	418,24 - 1,20×10 ³	287,96 - 457,79	165,39 - 211,92
Intercept	1,0026	4,989	4,4653	2,3274	1,3463
Slope	1,8554	0,7761	0,6416	1,5494	2,1747
R ²	0,9424	0,4647	0,6053	0,8762	0,8097
p-valor	1	1	1	1	1

¹Dados de Nascimento (2019).

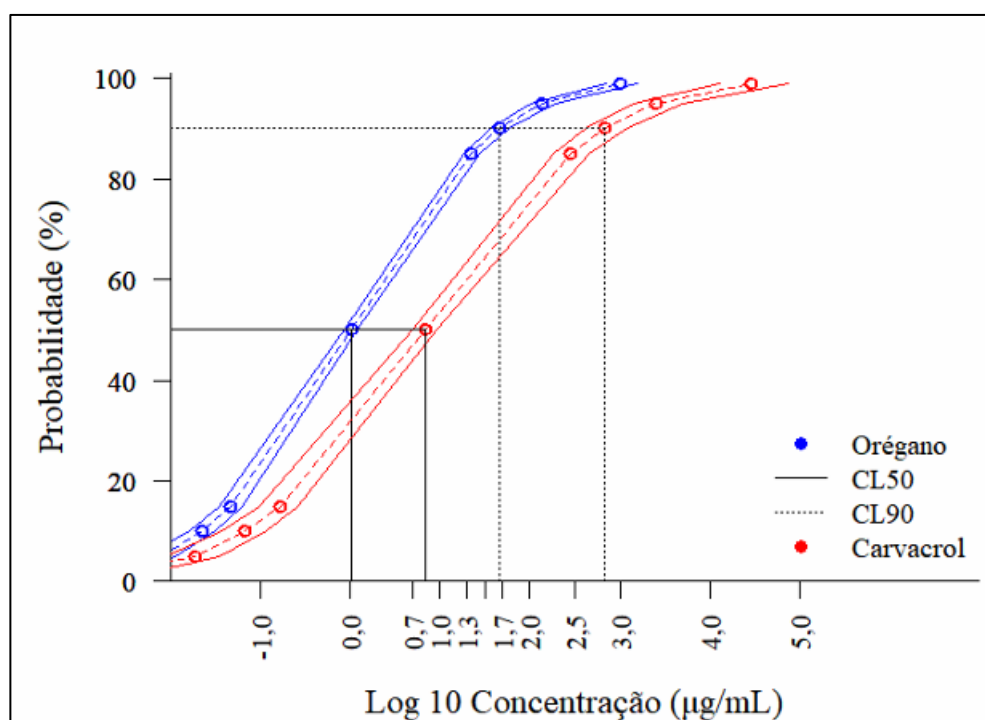


Figura 7. Curvas de concentração–mortalidade de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 horas de exposição ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) e ao carvacrol.

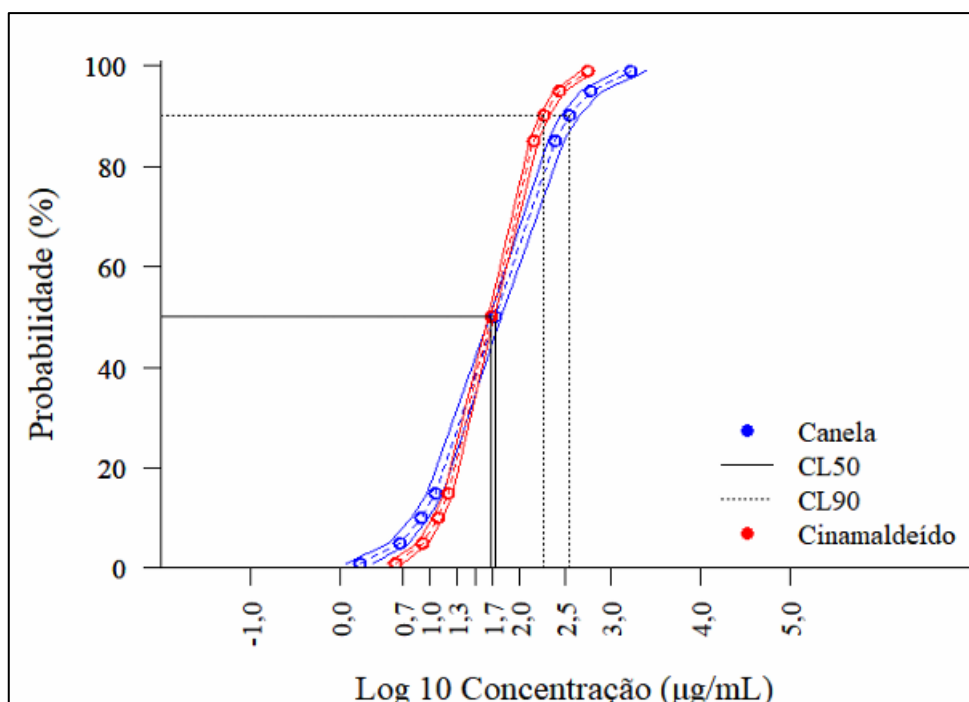


Figura 8. Curvas de concentração–mortalidade de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 horas de exposição ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela) e ao cinamaldeído.

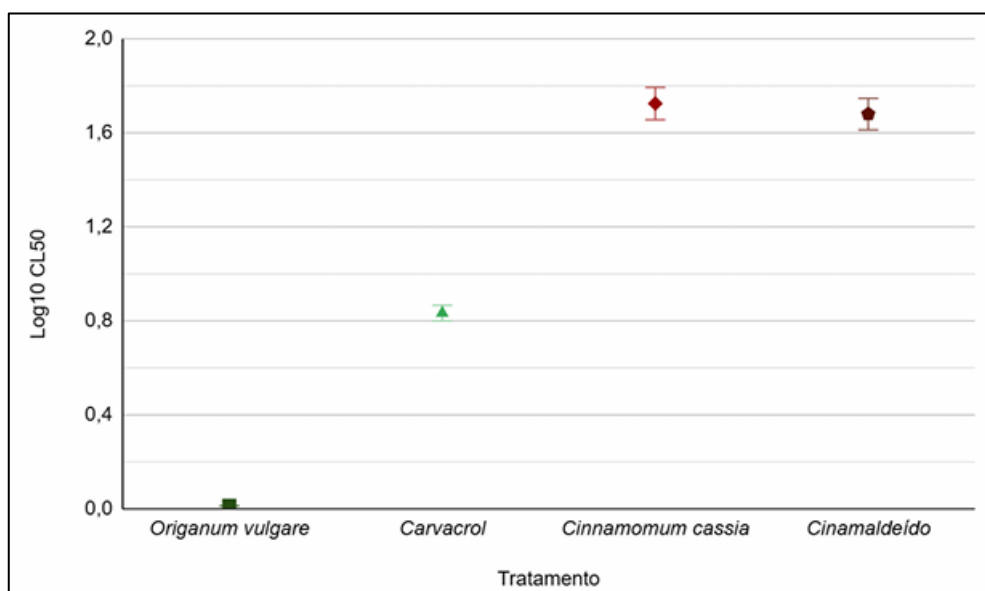


Figura 9. Comparação dos valores de CL₅₀ (Log₁₀) no ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 horas de exposição.

A análise de probit do OE de *O. vulgare* revelou as seguintes informações para as três cepas resistentes avaliadas. O valor de CL₅₀ variou significativamente entre as cepas: DA1316 apresentou um CL₅₀ de 2,84 µg.mL⁻¹, CB3471 43,83 µg.mL⁻¹, e CB211 132,94 µg.mL⁻¹. Para a CL₉₀, DA1316 teve um valor de 82,88 µg.mL⁻¹, CB3471 apresentou 2737,85 µg.mL⁻¹ e CB211 teve o maior valor de CL₉₀, com 22365,07 µg.mL⁻¹. Ao comparar as CL₅₀ encontradas,

obteve-se a seguinte ordem: DA1316 < CB3471 < CB211. Ao avaliar o FR, todas as cepas estudadas mostraram-se resistentes ao tratamento com OE de *O. vulgare*, com valores entre 2,8 – 126,1. Os dados brutos estão apresentados nos Apêndices B - D.

Tabela 5. Ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepas resistentes) expostos ao óleo essencial de *Origanum vulgare* e análise do fator de resistência.

Parâmetros	Cepas			
	N2	DA1316	CB3474	CB211
CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	1,03	2,84	43,83	132,94
IC 95% (µg.mL ⁻¹)	0,86 - 1,21	2,37 - 3,38	36,64 - 52,52	102,77 - 174,09
CL ₉₀ (µg.mL ⁻¹)	46,26	82,88	2737,85	22365,07
IC 95% (µg.mL ⁻¹)	36,55 - 59,95	64,39 - 109,61	2014,92 - 3844,28	13300,01 - 40857,41
Intercept	4,989	4,603	3,8282	3,7773
Slope	0,7761	0,8749	0,7137	0,5757
R ²	0,4647	0,4882	0,7115	0,8482
p-valor	1	1	1	1
FR	n/a	2,8 (R)	42,6 (R)	126,1 (R)

n/a: não se aplica.

A análise de probit do OE de *C. cassia* para as cepas avaliadas revelou os seguintes resultados. O valor de CL₅₀ foi de 85,04 µg.mL⁻¹ para DA1316, 50,58 µg.mL⁻¹ para CB3471 e 41,06 µg.mL⁻¹ para CB211. Para a CL₉₀, DA1316 apresentou 344,24 µg.mL⁻¹, CB3471 teve 327,11 µg.mL⁻¹ e CB211 teve 338,31 µg.mL⁻¹.

Quando comparadas as inclinações das curvas das cepas resistentes, o tratamento na cepa CB211 apresentou a maior inclinação (2,7427), sugerindo que a mortalidade aumenta mais rapidamente com o aumento da concentração para este composto. Ao avaliar o FR, as cepas CB3474 e CB211 mostraram-se sensíveis ao tratamento com OE de *C. cassia*, com valores de 1,0 e 0,8, respectivamente. Enquanto a cepa DA1316 revelou-se com resistência incipiente, com valor de FR de 1,6.

Tabela 6. Ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepas resistentes) expostos ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia* e análise do fator de resistência.

Parâmetros	Cepas			
	N2	DA1316	CB3474	CB211
CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	53,09	85,04	50,58	41,06
IC 95% (µg.mL ⁻¹)	46,68 - 60,46	77,35 - 93,76	45,85 - 55,80	37,00 - 45,61
CL ₉₀ (µg.mL ⁻¹)	356,47	344,24	327,11	338,31
IC 95% (µg.mL ⁻¹)	287,96 - 457,79	294,98 - 411,17	277,97 - 393,41	279,75 - 420,79
Intercept	2,3274	0,9276	2,3064	2,7427
Slope	1,5494	2,1105	1,5808	1,3991
R ²	0,8762	0,8846	0,8828	0,8767
p-valor	1	1	1	1
FR	n/a	1,6 (RI)	1,0 (S)	0,8 (S)

n/a: Não se aplica.

4.2.2 Eclodibilidade de Ovos

Os resultados do estudo demonstraram uma variação significativa na inibição da eclosão dos ovos ao longo das diferentes concentrações dos OEs e seus componentes majoritários testados.

Para o *O. vulgare*, foi avaliada a faixa de 0,06 a 542,2 µg.mL⁻¹. A maior taxa de inibição (100%) foi observada na concentração mais alta (5642,2 µg.mL⁻¹), com uma média de inibição de 100% ao longo dos dias de observação. O carvacrol, seu componente majoritário, também demonstrou uma inibição elevada, com uma taxa de 99,7% na concentração mais alta testada (5642,2 µg.mL⁻¹), evidenciando sua alta atividade.

Para *C. cassia*, com faixa avaliada de 4,6 a 517,9 µg.mL⁻¹, apresentou um padrão semelhante ao do carvacrol, com uma inibição máxima de 100% na maior concentração. Em geral, as substâncias testadas mostraram um padrão de aumento da inibição conforme a concentração aumentava, com exceção de algumas variações, como o OE. de *C. cassia*, que apresentou flutuações na eficácia de inibição entre as diferentes doses. Os dados brutos estão reportados no Apêndice E.

Os resultados obtidos a partir da análise da eclodibilidade de ovos indicam diferenças significativas na atividade dos OEs e seus componentes majoritários nas concentrações testadas.

O OE de *O. vulgare* apresentou uma CI_{50} de $13,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma CI_{90} de $381,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$, embora com uma variação considerável na concentração necessária para atingir 90% de inibição. O carvacrol demonstrou uma CI_{50} de $20,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com uma CI_{90} de $3,71 \times 10^4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sugerindo uma atividade menos intensa e uma grande variação nas concentrações de eclosão.

O OE de *C. cassia* teve uma CI_{50} de $9,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma CI_{90} de $29,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O cinamaldeído apresentou a CI_{50} mais baixa ($3,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a CI_{90} foi de $62,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com uma boa consistência na faixa de concentração de inibição.

Tabela 7. Ensaio de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) expostos a diferentes tratamentos por 24 horas.

Parâmetros	Óleo Essencial/Componente Majoritário			
	<i>O. vulgare</i>	Carvacrol	<i>C. cassia</i>	Cinamaldeído
CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	13,69	20,57	9,8	3,08
IC 95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10,51 - 17,58	14,86 - 28,80	9,04 - 10,58	1,98 - 4,31
CI_{90} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	381,61	$3,71 \times 10^4$	29,78	62,35
IC 95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	264,21 - 582,43	$1,70 \times 10^4$ - $9,44 \times 10^4$	26,83 - 33,63	49,38 - 82,79
Intercept	3,992	4,4831	2,3681	4,5202
Slope	0,8868	0,3935	2,655	0,9813
R^2	0,5982	0,7902	0,4982	0,7683
p-valor	1	1	1	0,8374

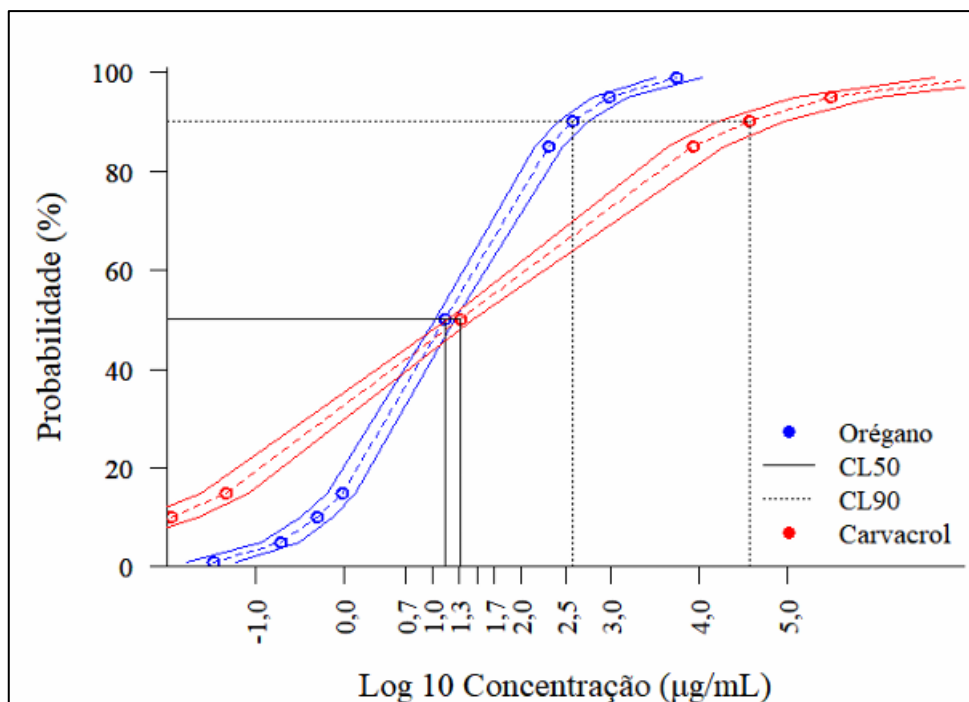


Figura 10. Curvas de concentração–inibição de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 horas de exposição ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) e ao carvacrol.

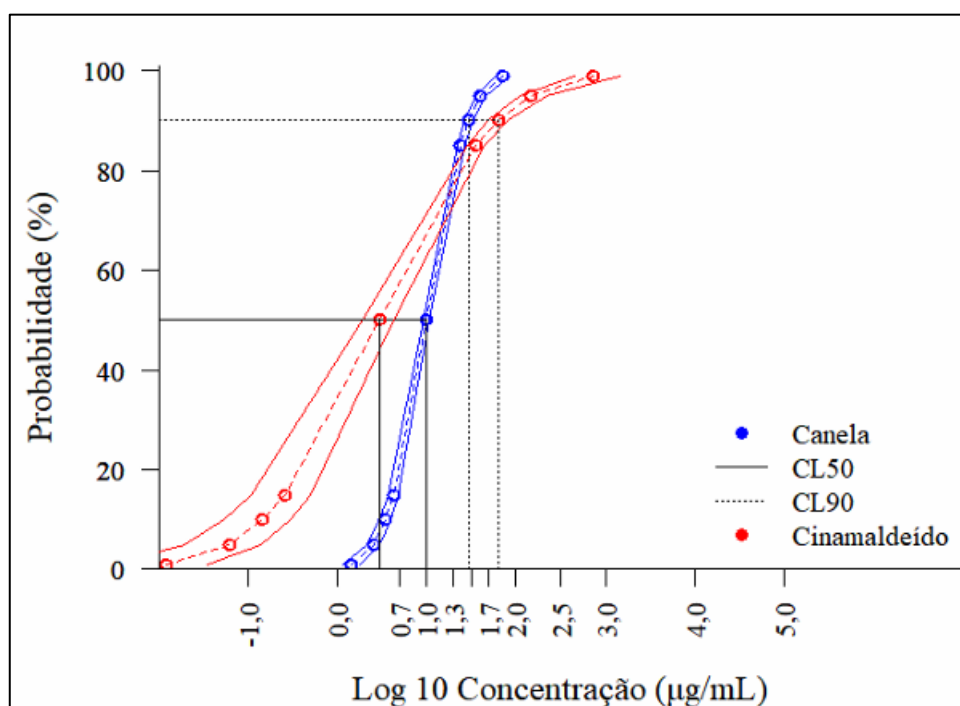


Figura 11. Curvas de concentração–inibição de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 horas de exposição ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela) e ao cinamaldeído.

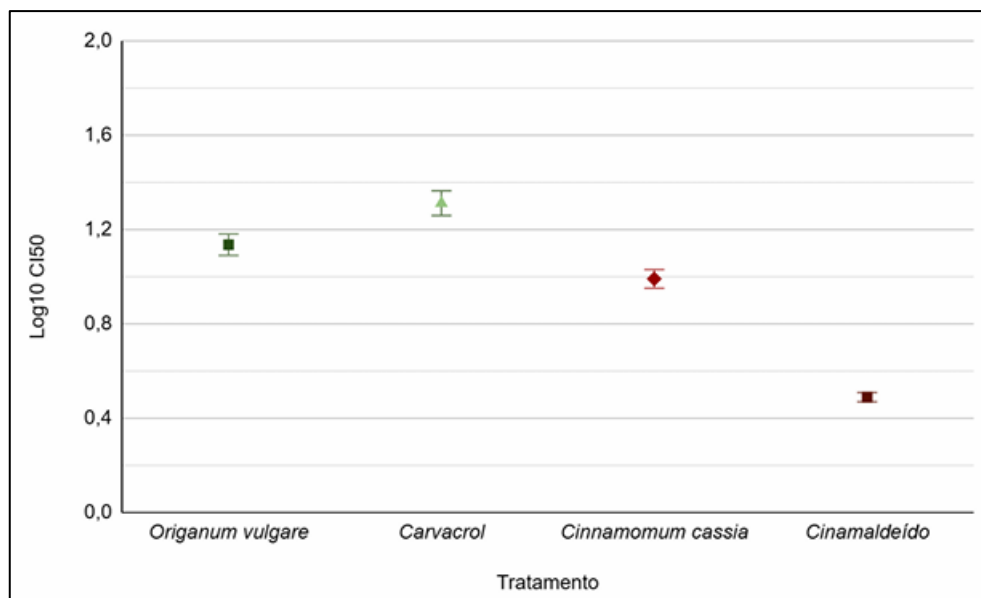


Figura 12. Comparação dos valores de CL₅₀ (Log₁₀) no ensaio de eclodibilidade de ovos de diferentes tratamentos em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 horas de exposição.

4.2.3 Postura de Ovos

Este teste demonstrou a atividade dos OEs e seus componentes na inibição da postura de ovos nos três dias de testes.

O OE de *O. vulgare* apresentou uma média de 51,46 ovos/indivíduo, com uma inibição de postura de 65,40%. O carvacrol resultou em uma média de 49,80 ovos/indivíduo e, com um valor médio de 49,26% de inibição.

O OE de *C. cassia* apresentou uma média de 70 ovos/indivíduo, com uma inibição de postura de 49,20%. O cinamaldeído teve uma média de 56 ovos/indivíduo e uma inibição de postura de 49,20%, variando consideravelmente entre os dias de teste, com 58,77% de inibição no primeiro dia, mas apenas 25,39% no terceiro.

Tabela 8. Ensaio de postura de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) expostos a diferentes tratamentos por 4 dias.

Replicata	Parâmetros	Controle	Óleo Essencial/Componente Majoritário			
			<i>O. vulgare</i>	Carvacrol	<i>C. Cassia</i>	Cinamaldeído
R1	Ovos/Indivíduos	152,56	57,57	56	70	62,9
	% de Inibição de Postura	n/a	62,26	63,29	51,62	58,77
R2	Ovos/Indivíduos	142,84	46,61	54,6	69,1	52,2
	% de Inibição de Postura	n/a	67,37	61,78	51,62	63,46
R3	Ovos/Indivíduos	150,2	50,2	38,8	70,90	52,9
	% de Inibição de Postura	n/a	66,58	22,71	52,80	25,39
Média	Ovos/Indivíduos	148,53	51,46	49,80	70,00	56,00
	% de Inibição de Postura	n/a	65,40	49,26	52,01	49,20
	DP		2,8	23,0	0,7	20,8

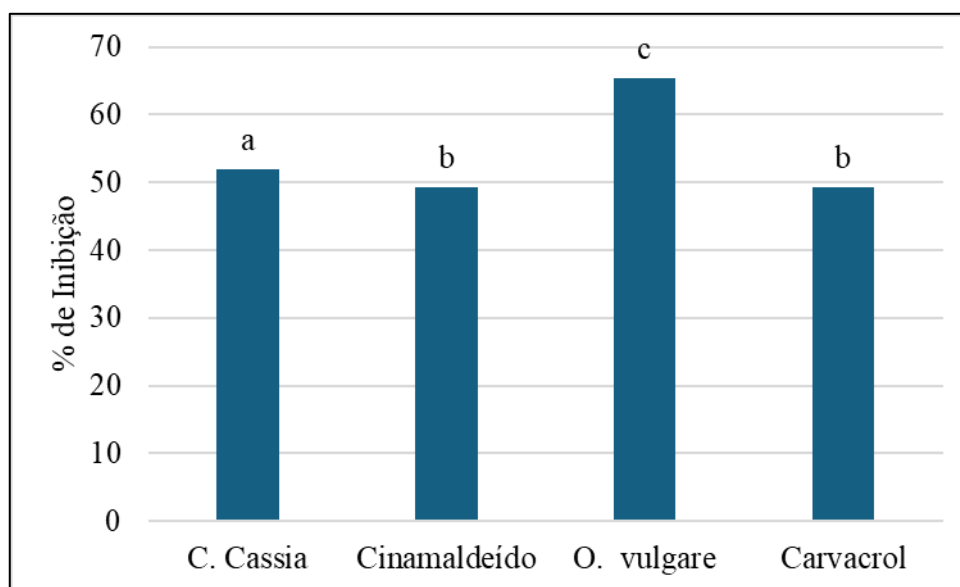


Figura 13. Gráfico de barras da inibição (%) da postura de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 4 dias de exposição aos diferentes tratamentos. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa.

4.2.4 Observações por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na observação por MEV, os nematoides do grupo controle apresentaram corpo bem arredondado, com cutículas simetricamente distribuídas ao longo de toda a extensão do corpo,

evidenciando a morfologia normal dos indivíduos (Figura 13). Em contraste, os nematoides tratados com os OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* exibiram corpo encurtado e retraído, acompanhado de cutícula pouco definida e desorganizada, sugerindo alterações morfológicas significativas induzidas pelo tratamento (Figuras 14 - 15).

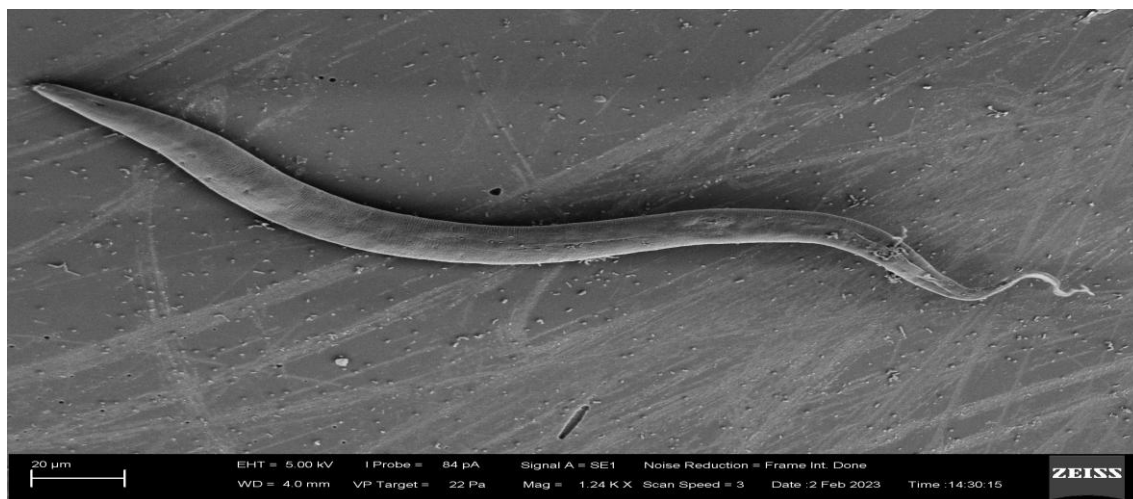


Figura 14. Observação morfológica de adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no grupo controle do ensaio de letalidade em adultos.

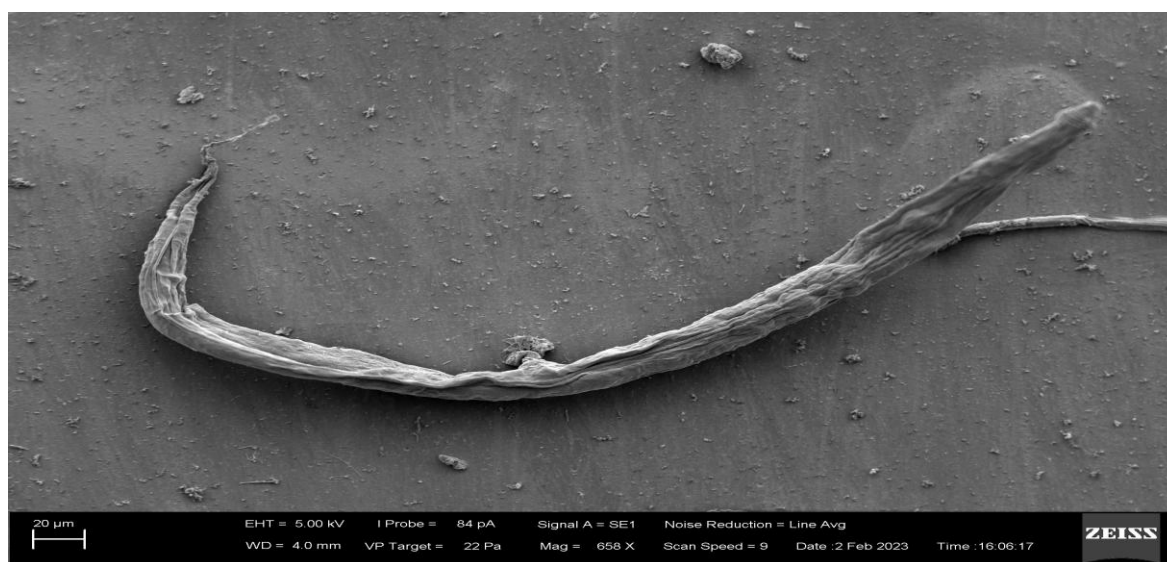


Figura 15. Observação morfológica de adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no grupo exposto ao óleo essencial de *Origanum vulgare* no ensaio de letalidade em adultos.

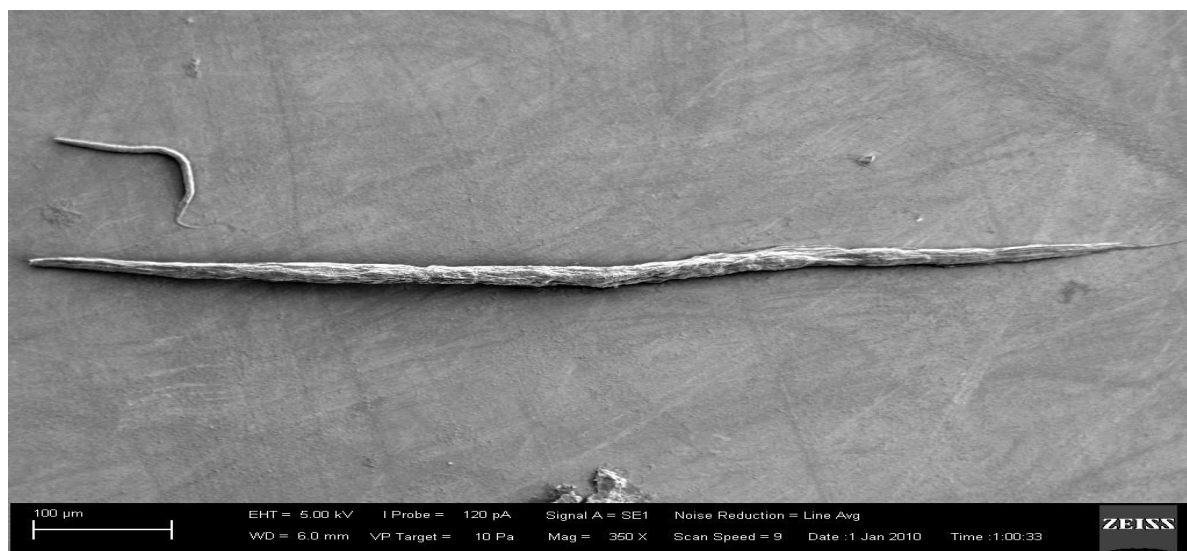


Figura 16. Observação morfológica de adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no grupo exposto ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia* no ensaio de letalidade em adultos.

4.2.5 Sinergia em Adultos

A escolha dos OEs para avaliação da sinergia foi fundamentada em estudos prévios que destacaram a boa atividade em diferentes estágios de vida do *C. elegans*, *O. vulgare* em adultos e de *C. cassia* em ovos.

Os resultados da análise de interação entre o componente majoritário carvacrol e o cinamaldeído, obtidos no ensaio de letalidade em adultos, indicaram predominância de efeito aditivo na maior parte da matriz de concentrações, com ocorrência pontual de regiões sinérgicas e antagônicas dependendo da combinação e do modelo estatístico aplicado. As médias globais dos *scores* de sinergia foram de 1,90 para o modelo *ZIP*, 10,03 para *Loewe*, 7,33 para *HSA* e 0,11 para *Bliss*. De acordo com os critérios de classificação, a interação geral é classificada como aditiva, com tendência à sinergia mais evidente no modelo de *Loewe* e, em menor grau, no modelo *HSA*.

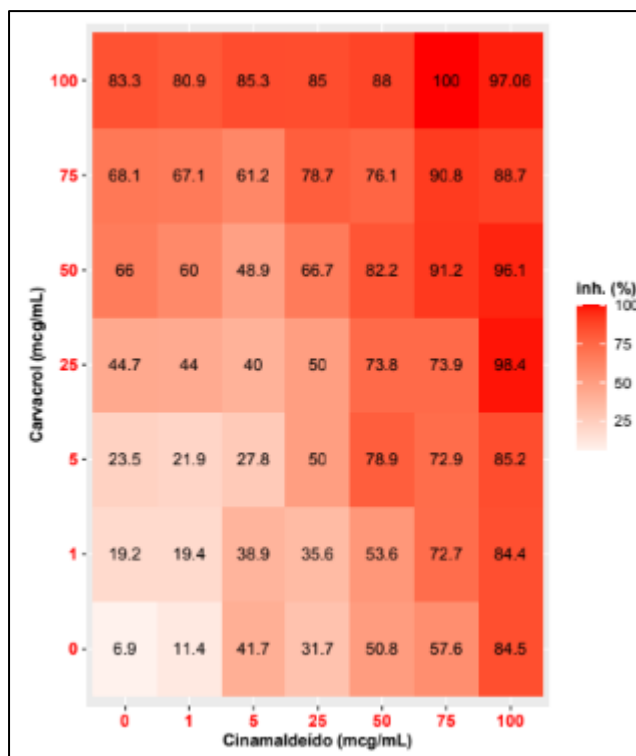


Figura 17. Matriz dose–resposta da combinação de carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 h de exposição.

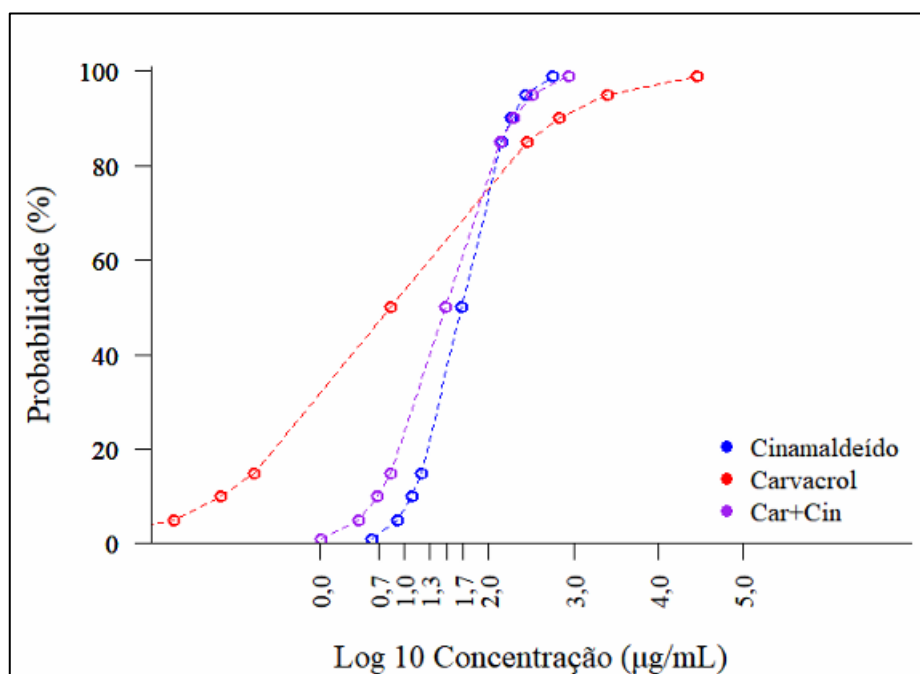


Figura 18. Curvas de concentração–mortalidade de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 horas de exposição ao carvacrol, ao cinamaldeído e à combinação de ambos os tratamentos.

Tabela 9. *Scores* de sinergia da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 h de exposição, segundo diferentes modelos estatísticos.

Componente Majoritário		Modelos estatísticos			
Carvacrol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cinamaldeído ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ZIP	Loewe	HSA	Bliss
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
0	1	0,00	0,00	0,00	0,00
0	5	0,00	0,00	0,00	0,00
0	25	0,00	0,00	0,00	0,00
0	50	0,00	0,00	0,00	0,00
0	75	0,00	0,00	0,00	0,00
0	100	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1	2,57	-23,98	0,24	0,24
1	5	-4,36	-22,02	-1,95	-1,95
1	25	-8,61	-4,90	-0,86	-0,86
1	50	-4,54	-4,16	-7,33	-7,33
1	75	-2,79	-5,10	-1,22	-1,22
1	100	-4,60	4,60	-2,93	-2,93
5	0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1	6,28	-8,92	-3,42	-4,33
5	5	-0,96	-18,05	-16,98	-21,63
5	25	-8,25	-8,91	-5,74	-25,18
5	50	-12,89	-13,21	-20,89	-32,84
5	75	-9,69	-9,90	-8,43	-19,64
5	100	1,16	9,98	2,44	-3,43
25	0	0,00	0,00	0,00	0,00
25	1	7,09	-12,45	4,77	3,70
25	5	10,38	-0,79	22,36	16,91
25	25	-4,25	-1,53	6,48	-4,70
25	50	-4,63	1,94	0,86	-6,02
25	75	-2,78	6,53	12,95	6,50
25	100	0,44	9,61	2,08	-1,30
50	0	0,00	0,00	0,00	0,00
50	1	7,77	2,79	3,42	2,66
50	5	34,03	33,59	34,33	30,41
50	25	8,81	26,29	28,10	8,61
50	50	6,62	20,88	19,79	3,22
50	75	-5,72	3,35	9,77	-5,77
50	100	-2,85	13,28	5,74	-2,40
75	0	0,00	0,00	0,00	0,00
75	1	9,49	25,81	18,45	17,79
75	5	11,76	25,94	18,69	15,31
75	25	4,93	26,12	19,92	3,11

75	50	8,16	31,88	30,79	10,77
75	75	4,62	21,31	27,74	8,95
75	100	7,58	27,94	20,41	10,57
100	0	0,00	0,00	0,00	0,00
100	1	2,30	39,88	-0,12	-0,36
100	5	-0,99	40,75	0,86	-0,38
100	25	9,03	55,85	16,98	10,84
100	50	3,49	37,86	14,17	3,10
100	75	-2,14	18,75	5,13	-6,43
100	100	1,46	24,34	15,34	0,27
Média		1,90	10,03	7,33	0,11

As Figuras 18 - 21 apresentam os gráficos de sinergia para a combinação de carvacrol e cinamaldeído, considerando diferentes modelos matemáticos. Para cada modelo, são mostrados um *heatmap* bidimensional e um gráfico de superfície 3D do *score* de sinergia. No *heatmap*, as cores verde e vermelho indicam, respectivamente, regiões em que o efeito da combinação é menor que o aditivo ou antagonista e regiões de efeito sinérgico. O gráfico 3D representa a mesma métrica, destacando visualmente áreas de sinergia leve e aditividade.

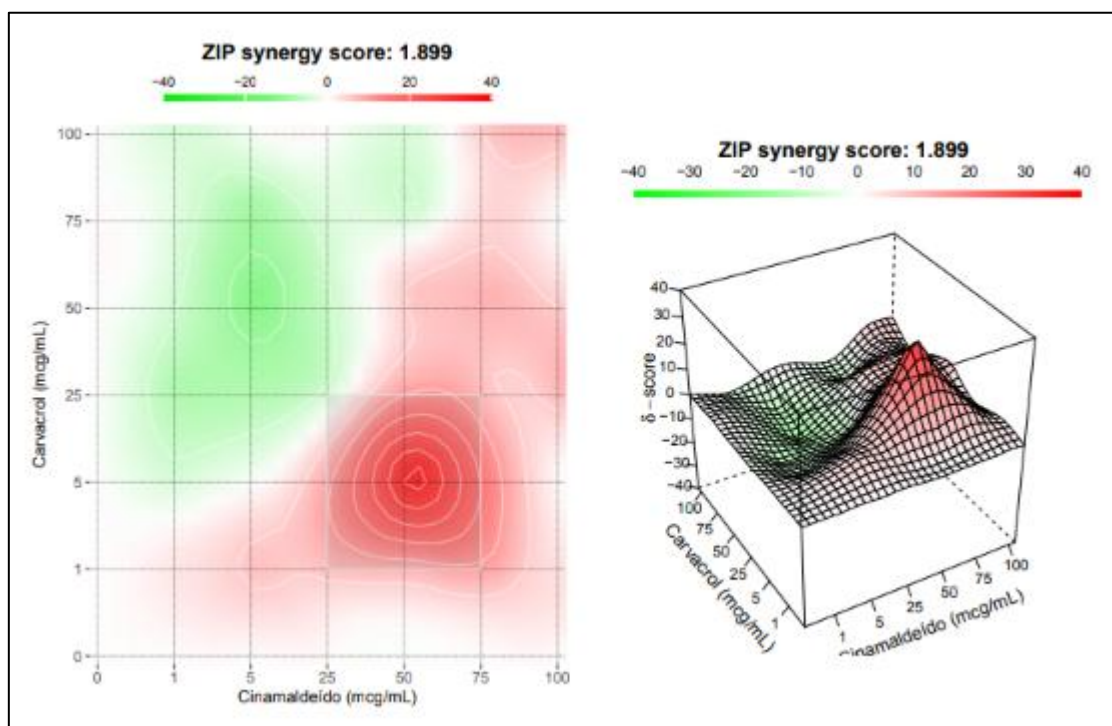


Figura 19. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo ZIP da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

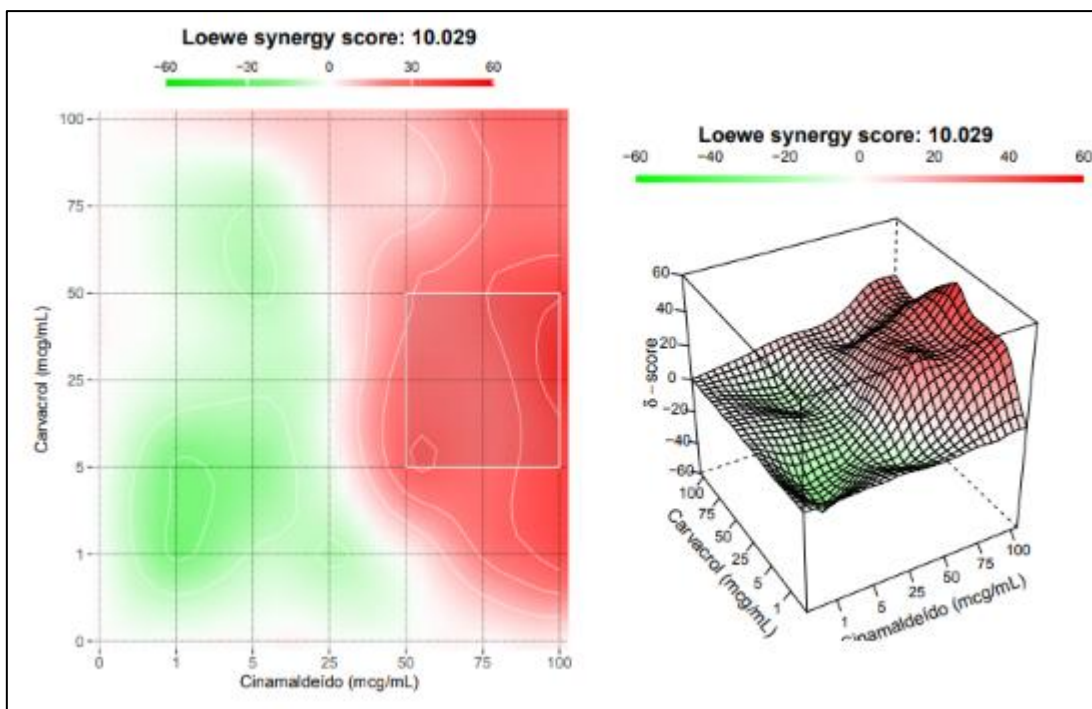


Figura 20. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo *Loewe* da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

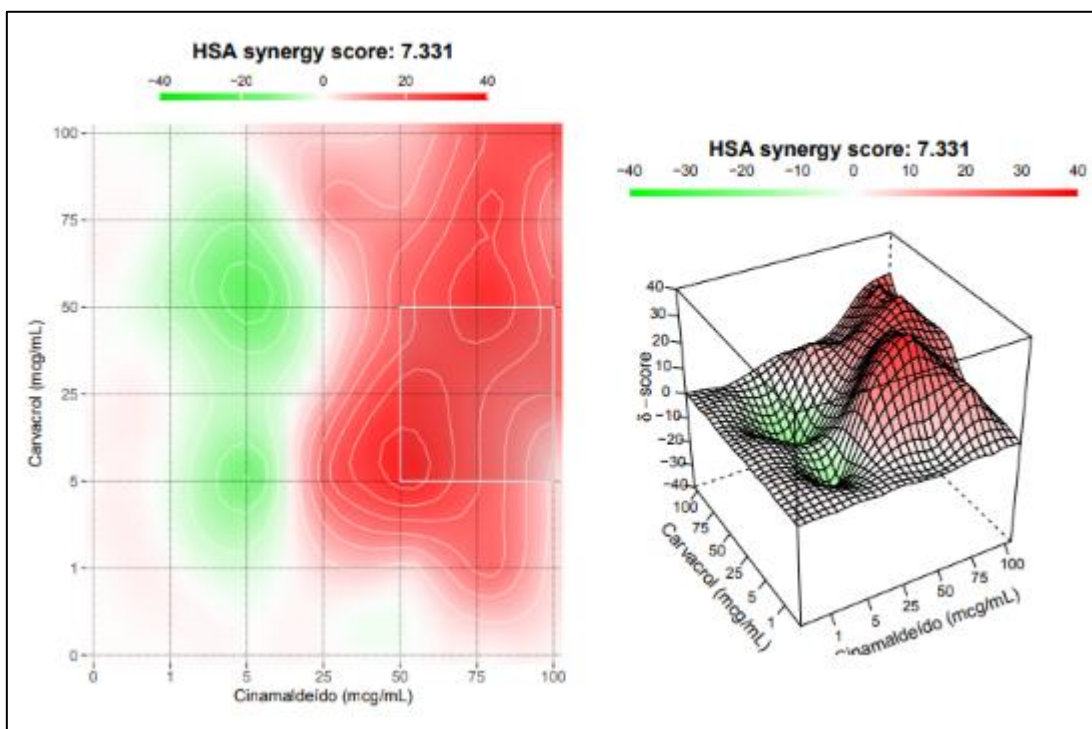


Figura 21. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo *HSA* da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

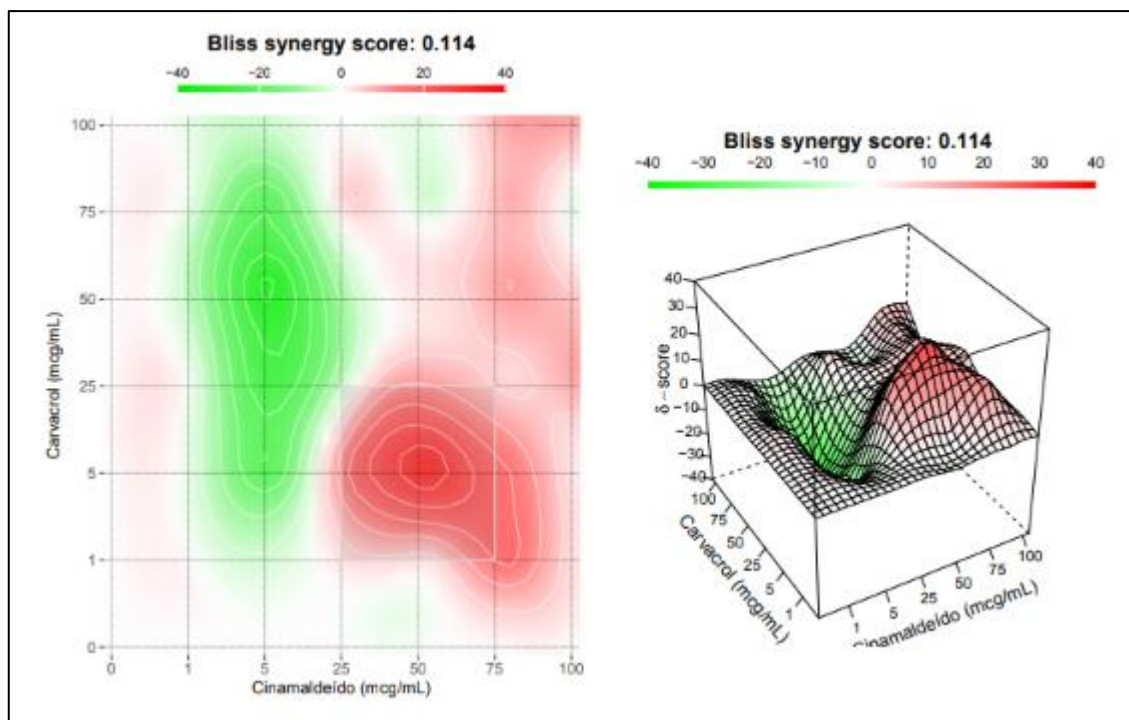


Figura 22. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo *Bliss* da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 48 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

4.2.5 Sinergia em Ovos

Os resultados da análise de interação entre o componente majoritário carvacrol e o cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos indicaram predominância de efeito aditivo a levemente antagônico na maior parte da matriz de concentrações, com poucas regiões pontuais de sinergia dependentes do modelo estatístico e da faixa de dose. As médias globais dos *scores* de sinergia foram de -6,15 para o modelo *ZIP*, 0,61 para *Loewe*, -0,62 para *HSA* e -7,35 para *Bliss*. De acordo com os critérios de classificação, a interação geral é considerada predominantemente aditiva, porém com tendência mais deslocada para antagonismo nos modelos *ZIP* e *Bliss*, enquanto o modelo de *Loewe* indicou comportamento próximo da neutralidade com raros pontos sinérgicos em concentrações intermediárias. De modo comparativo, a combinação apresentou perfil mais favorável de interação no ensaio de letalidade em adultos do que na eclodibilidade de ovos, onde o antagonismo foi mais frequente.

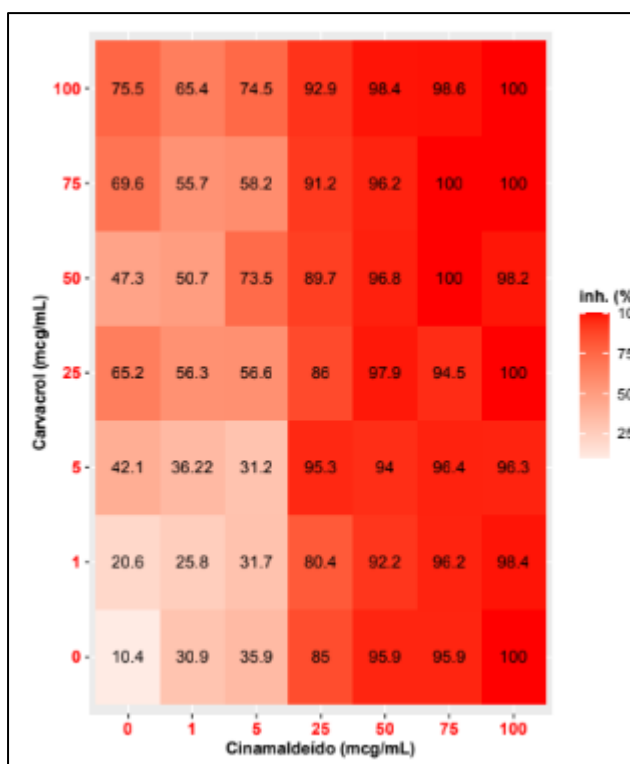


Figura 23. Matriz dose–resposta da combinação de carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 h de exposição.

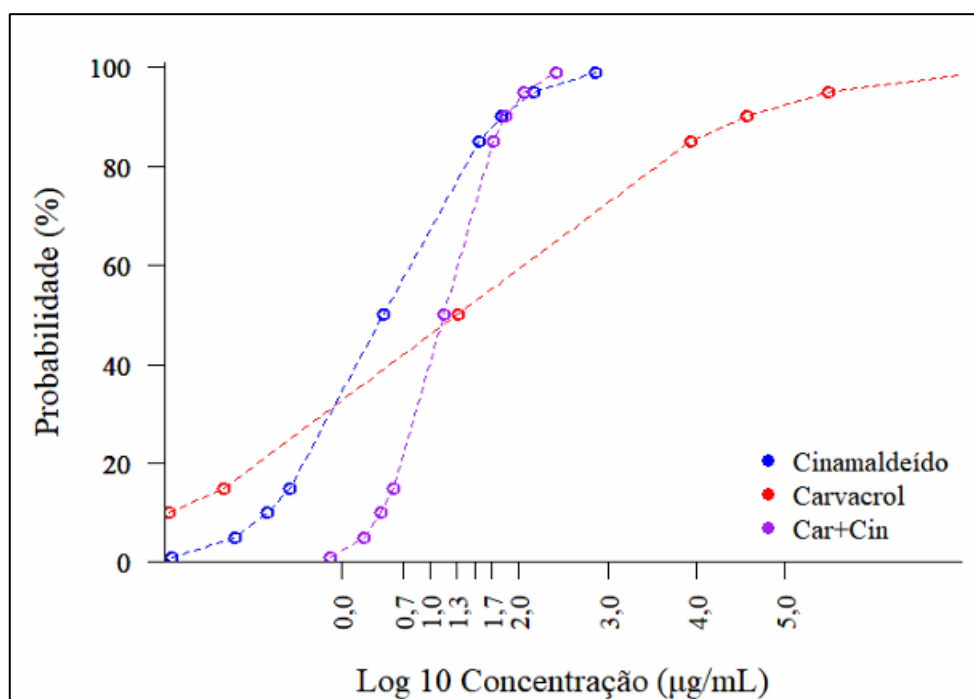


Figura 24. Curvas concentração–inibição da eclodibilidade de ovos *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 horas de exposição ao carvacrol, ao cinamaldeído e à combinação de ambos os tratamentos.

Tabela 10. *Scores* de sinergia da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 h de exposição, segundo diferentes modelos estatísticos.

Componente Majoritário		Modelos estatísticos			
Carvacrol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cinamaldeído ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ZIP	Loewe	HSA	Bliss
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
0	1	0,00	0,00	0,00	0,00
0	5	0,00	0,00	0,00	0,00
0	25	0,00	0,00	0,00	0,00
0	50	0,00	0,00	0,00	0,00
0	75	0,00	0,00	0,00	0,00
0	100	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1	-16,33	-13,70	-5,10	-19,33
1	5	-20,77	-7,32	-5,86	-23,75
1	25	-14,65	8,20	-8,90	-19,65
1	50	-14,35	2,22	3,40	-12,88
1	75	-14,66	7,00	-13,90	-23,29
1	100	-12,43	16,54	-10,10	-17,67
5	0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1	-15,57	-10,04	-4,20	-17,40
5	5	-23,89	-10,94	-10,90	-31,69
5	25	-16,71	8,13	-8,60	-21,09
5	50	-9,94	24,66	26,20	7,28
5	75	-10,65	9,14	-11,40	-22,31
5	100	-7,00	25,29	-1,00	-9,80
25	0	0,00	0,00	0,00	0,00
25	1	-4,39	-3,41	-4,60	-7,69
25	5	-0,04	6,38	10,30	3,99
25	25	-7,61	-6,76	1,00	-8,78
25	50	-4,93	-5,81	4,70	-2,40
25	75	-3,45	-5,32	6,20	-4,24
25	100	-1,44	-4,40	7,90	-3,43
50	0	0,00	0,00	0,00	0,00
50	1	-1,06	-2,73	-3,70	-4,54
50	5	-1,88	-1,91	-1,90	-3,63
50	25	-1,09	-0,35	2,00	-0,67
50	50	-0,70	-1,58	0,90	-1,04
50	75	-0,46	-2,20	0,30	-2,55
50	100	-0,43	-0,85	2,50	-0,60
75	0	0,00	0,00	0,00	0,00
75	1	-1,46	-1,51	0,30	-0,54
75	5	-2,04	-1,49	0,50	-1,23
75	25	-1,59	-3,12	-1,40	-4,07

75	50	-0,28	0,50	4,10	2,16
75	75	-0,07	0,33	4,10	1,25
75	100	0,04	-0,78	2,70	-0,40
100	0	0,00	0,00	0,00	0,00
100	1	-1,64	-0,53	-1,60	-1,60
100	5	-2,09	-1,97	-3,70	-3,70
100	25	-0,92	0,50	0,00	0,00
100	50	-0,50	-0,98	-1,80	-1,80
100	75	-0,28	0,23	0,00	0,00
100	100	-0,18	0,17	0,00	0,00
Média		-6,15	0,61	-0,62	-7,35

As Figuras 24 - 27 apresentam os gráficos de sinergia da combinação de carvacrol e cinamaldeído sobre a eclosão de ovos, utilizando os mesmos tipos de *heatmap* bidimensional e gráfico de superfície 3D apresentados para adultos.

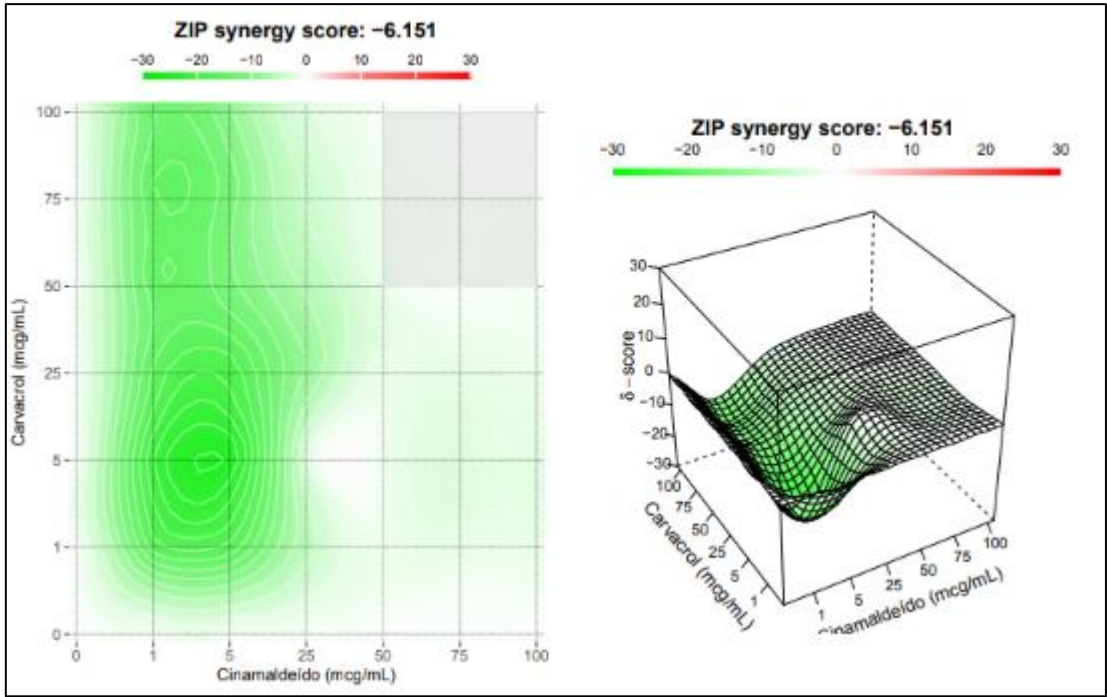


Figura 25. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo *ZIP* da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

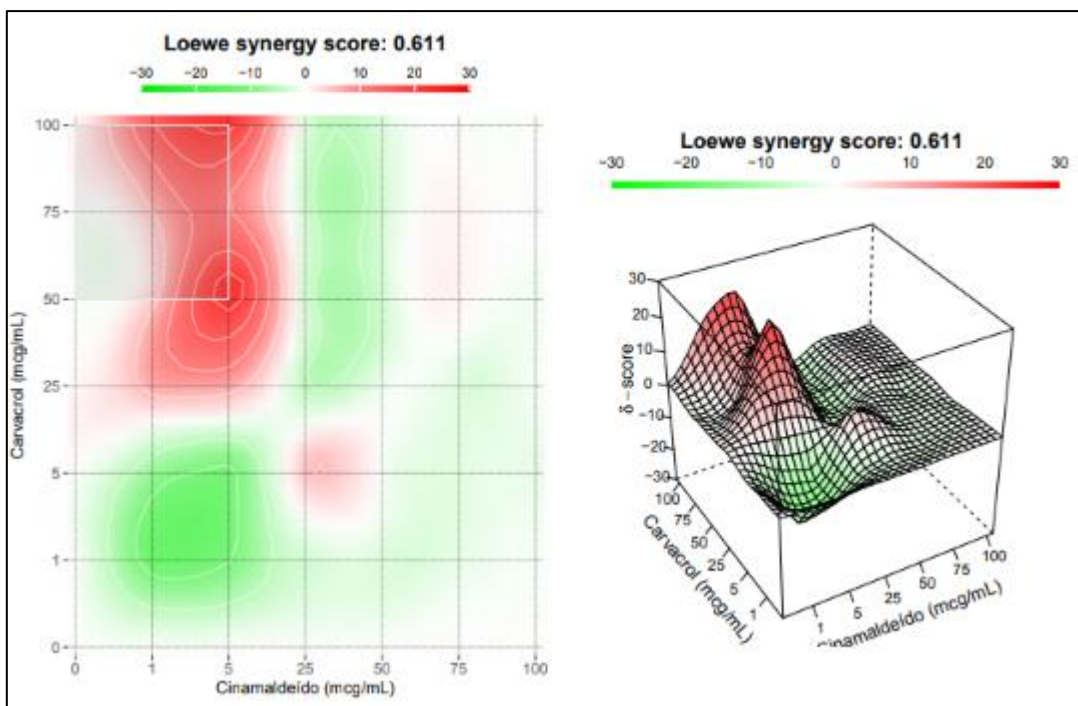


Figura 26. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo *Loewe* da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

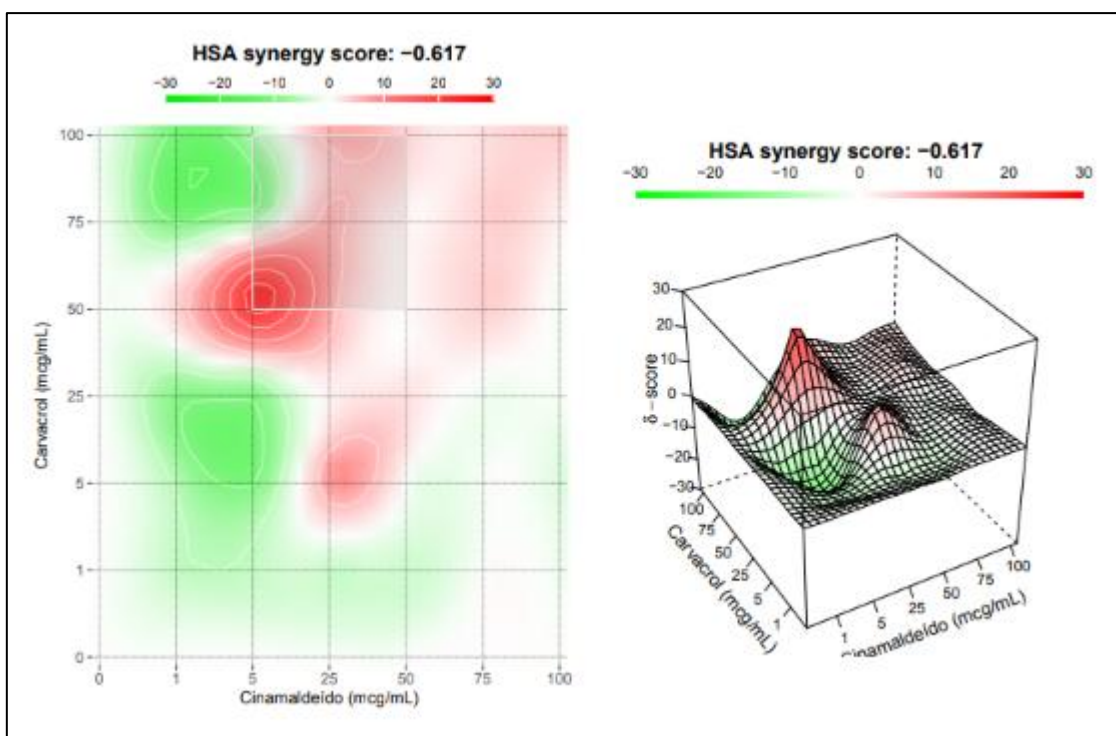


Figura 27. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo *HSA* da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

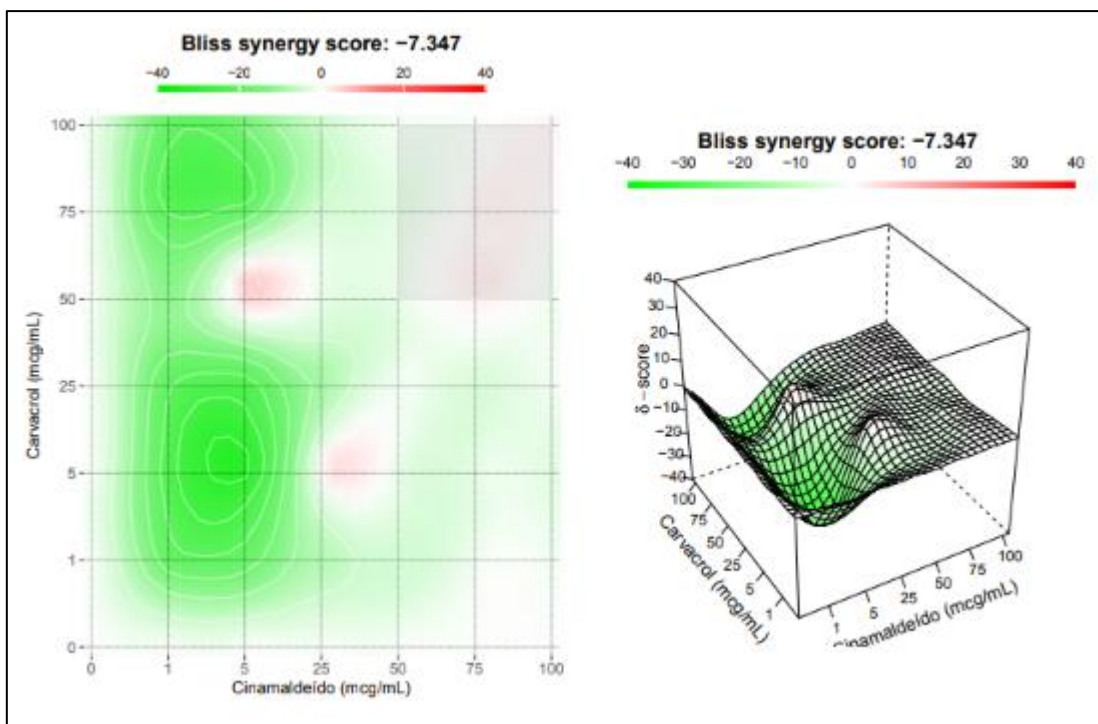


Figura 28. Mapa de sinergia *heatmap* pelo modelo *Bliss* da combinação carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de *Caenorhabditis elegans* (cepa N2) após 24 h de exposição. À esquerda, mapa bidimensional de calor; à direita, gráfico de superfície tridimensional.

4.3 *Haemonchus contortus*

4.3.1 Eclodibilidade de Ovos

Os OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* apresentaram diferentes níveis de atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* no ensaio de eclodibilidade de ovos, expressos em CE_{50} e CE_{90} . O OE de *O. vulgare* exibiu CE_{50} de $45,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC95%: 40,91–49,69) e CE_{90} de $220,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC95%: 96,54–503,20), com bom ajuste do modelo de regressão ($R^2 = 0,9841$ e $0,9873$, respectivamente). Já o OE de *C. cassia* demonstrou maior atividade, com CE_{50} de $3,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC95%: 3,04–3,40) e CE_{90} de $5,64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC95%: 4,72–6,75), também apresentando elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9887$ e $0,9892$, respectivamente), indicando alta confiabilidade no ajuste das curvas dose–resposta. Esses resultados evidenciam maior eficácia de *C. cassia* em comparação a *O. vulgare* na inibição da eclosão dos ovos.

Tabela 11. Ensaio de eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* expostos aos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Cinnamomum cassia*.

Parâmetros	Óleos Essencial	
	<i>O. vulgare</i>	<i>C. cassia</i>
CE ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	45,09	3,21
IC 95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	(40,91 – 49,69)	(3,04 – 3,40)
R ²	0,9841	0,9887
CE ₉₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	220,4	5,64
IC 95% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	(96,54 – 503,20)	(4,72 – 6,75)
R ²	0,9873	0,9892

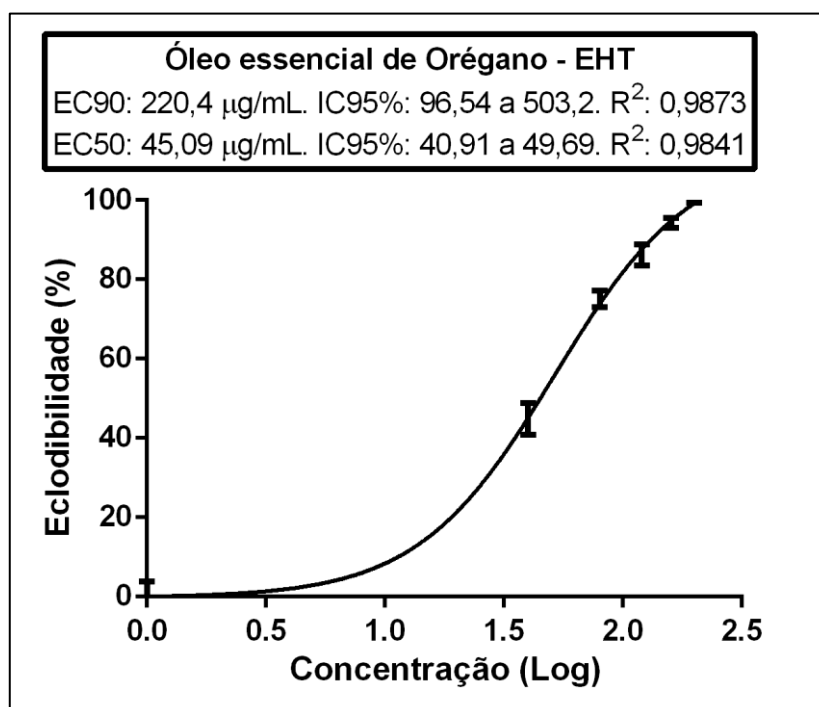


Figura 29. Curva concentração–inibição da eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* após exposição ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano).

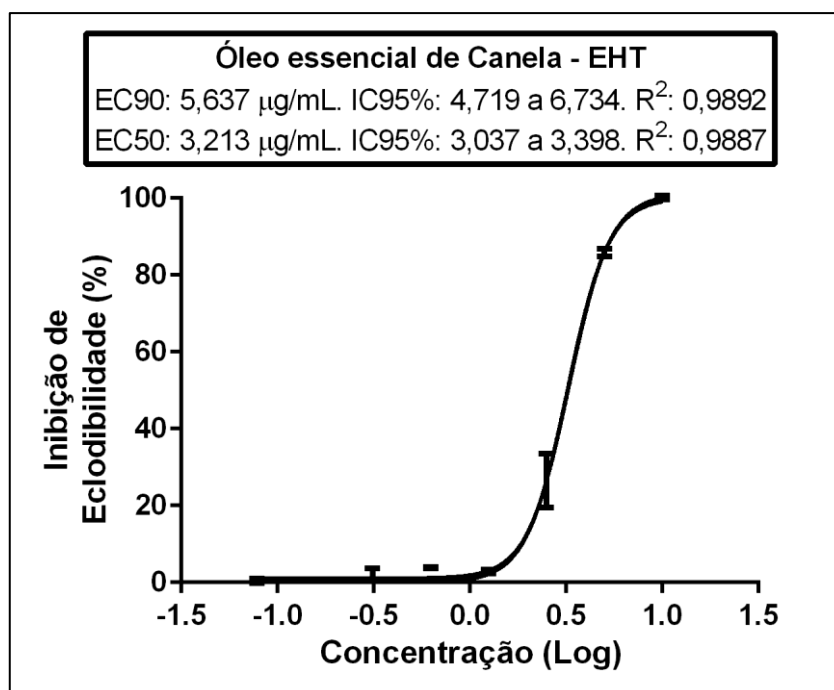


Figura 30. Curva concentração–inibição da eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* após exposição ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela).

4.3.2 Migração Larval

Os OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* demonstraram distinta atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus*, avaliada pelo ensaio de migração larval. O OE de *O. vulgare* apresentou CE50 de 0,0058 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com intervalo de confiança de 95% entre 0,0033 e 0,01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e coeficiente de determinação $R^2 = 0,9254$. Já o OE de *C. cassia* apresentou CE50 de 0,0187 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com IC95% de 0,0047–0,0295 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $R^2 = 0,94$, indicando bom ajuste do modelo dose–resposta. Esses resultados confirmam a atividade larvicida de ambos os OEs, com maior atividade observada para o OE de *O. vulgare* nesse ensaio.

Assim, observa-se que o OE mais ativo variou conforme o ensaio: *C. cassia* foi mais eficaz no teste de eclodibilidade de ovos, enquanto *O. vulgare* apresentou maior atividade no teste de migração larval.

Tabela 12. Ensaio de migração larval de *Haemonchus contortus* expostos aos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Cinnamomum cassia*.

Parâmetros	Óleo Essencial	
	<i>O. vulgare</i>	<i>C. cassia</i>
CL ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0058	0,0187
IC 50% ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	(0,0033 – 0,01)	(0,0047 - 0,0295)
R ²	0,9254	0,94

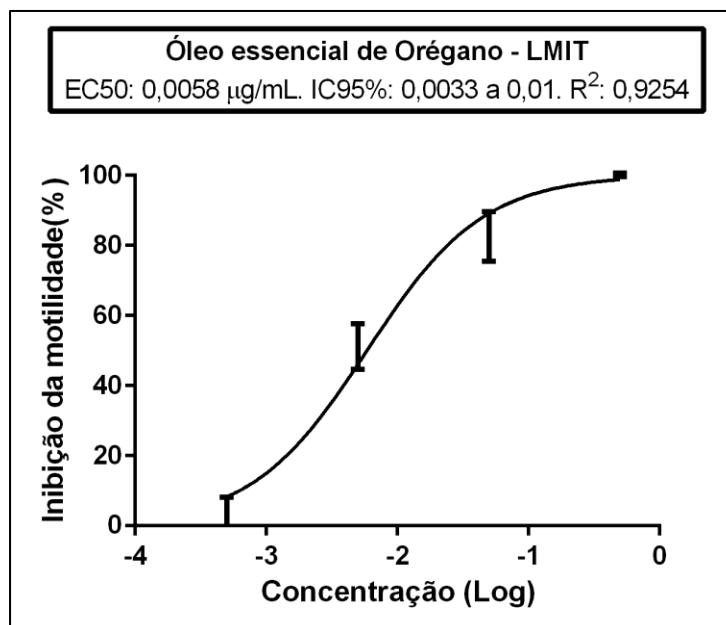


Figura 31. Curva concentração–inibição da motilidade das larvas L3 de *Haemonchus contortus* após exposição ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano).

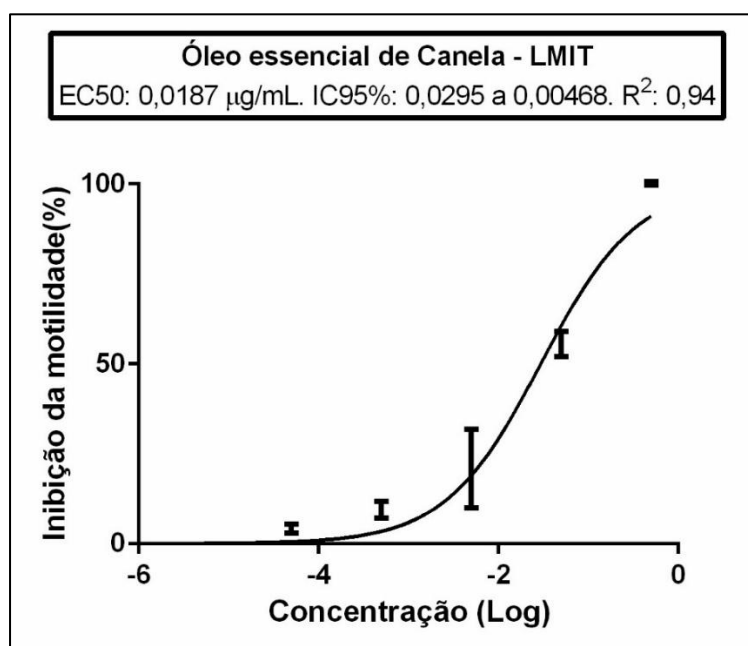


Figura 32. Curva concentração–inibição da motilidade das larvas L3 de *Haemonchus contortus* após exposição ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela).

4.4 Desenvolvimento de Formulações

As *beads* produzidas por gelificação iônica apresentaram características estruturais uniformes, com boa formação esférica e consistência adequada após a secagem. A homogeneidade visual e a integridade física das esferas indicaram uma boa incorporação dos princípios ativos, carvacrol e cinamaldeído, nas concentrações previstas. Não foram observados sinais de aglomeração ou deformação, e as *beads* mantiveram estabilidade durante todo o processo de manipulação e armazenamento.

As *beads* carregadas com sulfato de cálcio apresentaram resultados igualmente satisfatórios, com uma distribuição uniforme dos princípios ativos no material. As esferas obtidas a partir do molde de silicone demonstraram consistência homogênea e resistência mecânica, facilitando a manipulação. Após o processo de secagem, o formato das *beads* foi mantido, e nenhuma fissura ou irregularidade foi observada.

Ambas as técnicas resultaram em produtos com propriedades físicas adequadas e indicaram potencial para as etapas de caracterização e análise funcional das substâncias incorporadas. Os materiais demonstraram estabilidade estrutural e preservação das características esperadas, essenciais para a continuidade das avaliações previstas.

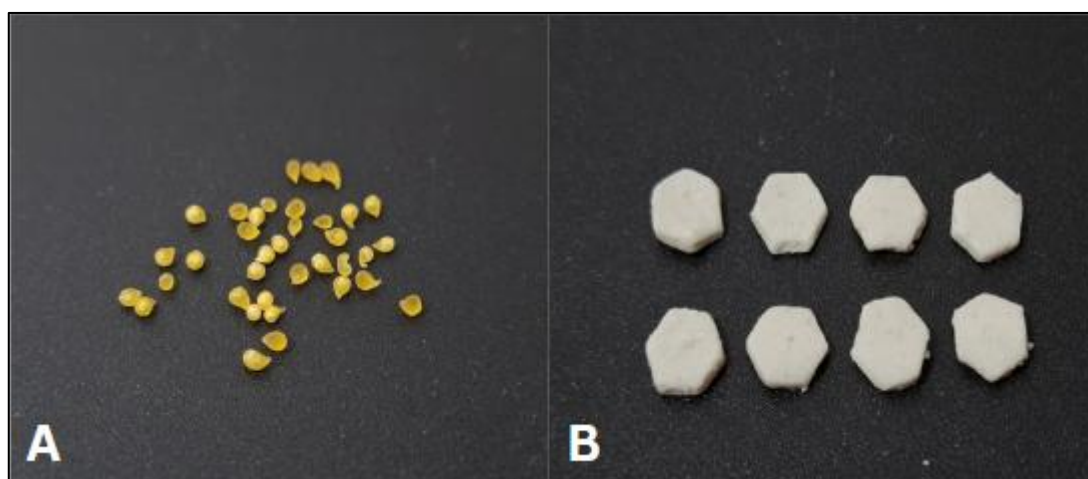


Figura 33. Formulações desenvolvidas à base de carvacrol e cinamaldeído. A: *beads* produzidas por gelificação iônica. B: *beads* carregadas com sulfato de cálcio.

4.5 Validação de Metodologia Analítica

Os resultados da validação analítica para o carvacrol e o cinamaldeído estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela RDC nº 166/2017 da Anvisa.

A linearidade foi confirmada com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99 em todos os dias avaliados. A precisão, expressa como desvio padrão relativo (DPR), foi satisfatória tanto nas análises intra-dia quanto inter-dia, com valores inferiores a 9%, atendendo aos critérios de aceitabilidade. A exatidão, expressa como recuperação percentual, variou de 84,10% a 100,25% para o carvacrol e de 98,78% a 118,63% para o cinamaldeído, demonstrando boa recuperação nas diferentes faixas de concentração. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram compatíveis com os requisitos do método proposto, sendo calculados com base na fórmula estabelecida pela RDC nº 166/2017. Para o carvacrol, observou-se um efeito matriz significativo na formulação *Bead* por geleificação iônica, com variação de 31,37% entre os coeficientes angulares, indicando ausência de paralelismo entre as curvas e potencial interferência da matriz na resposta analítica. Em contrapartida, na formulação de *bead* por sulfato de cálcio, a variação observada foi de apenas 1,98%, sugerindo paralelismo adequado e ausência de efeito matriz relevante. Quanto ao cinamaldeído, ambos os sistemas apresentaram variações inferiores a 5% (3,09% para gelificação iônica e 3,45% para sulfato de cálcio), demonstrando boa concordância entre as curvas e evidência de paralelismo, indicando que a matriz não exerce influência significativa sobre a resposta do analito nessas condições experimentais.

Tabela 13. Validação de carvacrol e cinamaldeído.

Validação	Carvacrol			Cinamaldeído		
Linearidade	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Intervalo	5 – 122 µg/mL			5 – 121 µg/mL		
a	0,2693	0,2672	0,2667	2,3034	2,3320	2,2059
b	-	-0,2921	-0,3830	8,6195	7,3576	7,9560
	0,3286					
r ²	0,9977	0,9988	0,9996	0,9994	0,9978	0,9908
Precisão (Intra-dia/inter-dia) - DPR						
10 µg/mL	2,1200 / 3,0237			1,0005 / 1,4705		
50 µg/mL	6,3696 / 8,9637			1,0170 / 1,1815		
100 µg/mL	3,9023 / 4,0272			2,1663 / 2,3171		
Exatidão (Intra-dia/inter-dia) - %						
10 µg/mL	100,2479 / 100,2479			98,7874 / 98,7874		
50 µg/mL	97,1533 / 97,1533			118,6375 / 118,6375		
100 µg/mL	84,1097 / 84,1097			113,1229 / 113,1229		
LQ	1,7073 µg/mL			2,7679 µg/mL		
LD	0,5634 µg/mL			0,9134 µg/mL		
Efeito Matriz – Paralelismo (%)						
Bead por GI	3,09			31,37		
Bead por SC	3,45			1,98		

a: slope; b: intercepto; r²: coeficiente de correlação; DPR: desvio padrão relativo; LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção; GI: gelificação iônica; SC: sulfato de cálcio.

5 DISCUSSÃO

Embora a atividade anti-helmíntica específica dos OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* contra nematoides ainda seja um campo em expansão, a pesquisa com essas substâncias é bem consolidada em outros modelos biológicos, permitindo comparações valiosas com os achados deste trabalho. Para tanto, as concentrações reportadas na literatura foram convertidas para $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Diante desse contexto, a o presente estudo adquire relevância científica e prática significativa ao enfrentar a problemática crítica e emergente da resistência anti-helmíntica, um dos maiores obstáculos contemporâneos para a saúde animal e a sustentabilidade da produção pecuária. Por meio de uma abordagem metodológica robusta e integrativa, que engloba triagem inicial com *C. elegans*, avaliação de interações sinérgicas mediante modelos matemáticos avançados, desenvolvimento e caracterização de formulações e validação em um parasito-alvo de alto impacto econômico, *H. contortus*, o estudo demonstra de forma sistemática e quantitativa o potencial dos OEs e de seus constituintes majoritários como candidatos promissores a novos agentes anti-helmínticos. Os resultados obtidos, que revelam perfis de atividade complementares, respostas diferenciadas frente a cepas resistentes e a viabilidade de sistemas de liberação estáveis, fornecem uma base experimental sólida para futuros estudos *in vivo* e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas combinatórias, alinhando-se, portanto, à urgente demanda global por alternativas sustentáveis e com menor propensão à seleção de resistência.

5.1 Atividade do OE de *Origanum vulgare* e Carvacrol

5.1.1 Composição Química do OE de *Origanum vulgare*

A caracterização cromatográfica do OE de *O. vulgare* no presente estudo revelou um perfil químico amplamente dominado por monoterpenos oxigenados, com destaque para o carvacrol (58,92%), que se manteve como composto majoritário. Em seguida, destacaram-se outros constituintes dessa classe, como timol (3,76%), linalol (5,21%), 1,8-cineol (2,35%), cânfora (1,56%), borneol (1,83%), terpinen-4-ol (1,28%) e α -terpineol (1,48%), evidenciando a complexidade do perfil oxigenado do óleo.

Entre os monoterpenos hidrocarbonados, foram identificados p-cimeno (7,25%), γ -terpineno (6,53%), α -terpineno (1,11%) e limoneno (1,17%), enquanto os sesquiterpenos hidrocarbonados foram representados principalmente por (E)-cariofileno (5,26%) e α -humuleno (0,76%). Além disso, uma fração minoritária de compostos não identificados (1,52%) também foi observada.

A comparação com Štrbac et al. (2022) evidencia que, embora o carvacrol seja predominante em ambos os estudos, a porcentagem observada foi maior no estudo citado (76,21%). Diferenças na composição secundária dos monoterpenos aromáticos também foram observadas: no presente estudo, o o-cimeno predominou entre os hidrocarbonados aromáticos (7,25%), enquanto Štrbac et al. (2022) relataram maior abundância de p-cimeno (12,57%). Essas variações podem ser atribuídas à origem geográfica das plantas, condições de cultivo, estágio fenológico e métodos de extração, influenciando diretamente o perfil químico e a atividade biológica do OE.

Esses resultados corroboram Morshedloo et al. (2018), que investigaram sete populações de OE de *O. vulgare* do Irã, demonstrando ampla variabilidade no teor de carvacrol (0,3 - 46,8%) e nos demais constituintes, como acetato de linalila, (Z)- α -bisaboleno, (E)- β -cariofileno e óxido de cariofileno. Os autores destacam que tais diferenças refletem a eficiência e atividade das vias biossintéticas do metileritritol 4-fosfato (MEP) e do mevalonato, bem como fatores genéticos e ambientais que modulam o perfil químico intraespecífico.

Considerando a elevada proporção do carvacrol e seu reconhecimento como principal marcador químico e bioativo do OE de *O. vulgare*, os ensaios biológicos subsequentes foram conduzidos também com o carvacrol isolado, com o objetivo de discriminar sua contribuição individual para os efeitos observados e avaliar em que medida a atividade do OE poderia ser atribuída a esse constituinte majoritário ou, alternativamente, à ação combinada dos diferentes componentes do óleo.

5.1.2 Atividade em Adultos

A comparação entre o OE de *O. vulgare* e o carvacrol isolado indica maior atividade do óleo essencial no ensaio com adultos de *C. elegans*. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram menores para o OE, e os respectivos intervalos de confiança de 95% não se sobrepõem aos do carvacrol,

sustentando que a diferença entre os tratamentos é consistente. Embora ambos atinjam 100% de mortalidade em concentrações mais elevadas, a diferença de quase uma ordem de grandeza na CL₅₀ reforça a maior atividade do OE em relação ao seu constituinte majoritário isolado. A taxa de atividade observada no teste aduítica foi de 9,18, indicando que seria necessária uma concentração de carvacrol cerca de nove vezes maior do que a presente no OE de *O. vulgare* para produzir o mesmo efeito. Em conjunto, esses achados sugerem que a atividade aduítica não depende exclusivamente do carvacrol, mas da contribuição da matriz química do OE, possivelmente associada a interações entre seus diferentes constituintes.

Quando comparados à ivermectina, fármaco anti-helmíntico de referência, observou-se que o OE de *O. vulgare* apresenta atividade inferior à de um composto sintético altamente específico, porém ainda se destaca por exibir atividade expressiva dentro da mesma ordem de grandeza, especialmente considerando sua natureza química complexa e multicomponente.

Esse padrão também se refletiu em outros desfechos biológicos. O OE de *O. vulgare* promoveu maior redução da postura de ovos do que o carvacrol isolado, indicando que seu efeito não se limita à letalidade, mas também compromete a capacidade reprodutiva dos nematoides. Esse achado amplia a relevância biológica da atividade observada, uma vez que a interferência na reprodução pode contribuir para o controle populacional mesmo quando a mortalidade não é imediata.

A comparação entre os modelos experimentais mostra ainda uma diferença clara de magnitude de resposta, com maior atividade do OE no ensaio com larvas L3 de *H. contortus* do que no modelo de adultos de *C. elegans*. Esse contraste de sensibilidade biológica entre os diferentes organismos destaca que o perfil de atividade pode variar conforme o estágio e o sistema avaliado. Mesmo nesse cenário, mantém-se a tendência observada no ensaio aduítico: o OE apresenta desempenho superior ao carvacrol isolado.

A análise morfológica por MEV reforça essa interpretação, ao revelar alterações estruturais expressivas nos nematoides expostos, incluindo deformações corporais e desorganização da cutícula, compatíveis com dano direto à estrutura externa. Em conjunto, esses achados sustentam que a atividade do OE envolve não apenas efeito tóxico, mas também comprometimento estrutural e funcional dos organismos expostos.

A atividade adulticida do carvacrol, principal componente fenólico de óleos essenciais como o de *O. vulgare*, tem sido demonstrada em diferentes espécies de nematoides. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a eficácia do OE está fortemente associada à presença de carvacrol, o principal componente fenólico do óleo, que atinge concentrações de até 76,21%, sendo que, nesse estudo, o OE foi adquirido comercialmente e posteriormente emulsificado em Tween 80 a 3% (v/v) para preparo das soluções de trabalho (Štrbac et al., 2022).

Estudos utilizando *C. elegans* como organismo modelo demonstram que o carvacrol apresenta elevada atividade nematicida, mesmo em concentrações muito baixas, evidenciando seu potencial como ferramenta para estudos mecanísticos iniciais. Marjanović et al. (2018) observaram que a CL_{50} para adultos de *C. elegans* foi de $0,00797 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 24 horas de exposição e de $0,00508 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 48 horas, indicando aumento da toxicidade com o tempo de exposição. De forma consistente, Abdel-Rahman et al. (2013) demonstraram que concentrações de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de carvacrol promoveram mortalidade igual ou superior a 50% nesse modelo, confirmando um efeito nematicida claramente dependente da dose, sendo que, nesse estudo, a substância foi previamente dissolvida em DMSO antes da diluição em tampão aquoso.

No contexto de nematoides gastrintestinais de ruminantes, o carvacrol também demonstrou atividade relevante contra *H. contortus*. Ensaio *in vivo* indicaram CE_{50} de $730 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no desenvolvimento larval e elevada inibição da migração larval, alcançando até 95,6% a $100.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Zhu et al., 2013). Andre et al. (2016) observaram CE_{50} de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tanto no ensaio de desenvolvimento larval quanto na redução da motilidade larval, com diminuição de 58,3% após 24 horas de exposição, indicando um efeito consistente sobre diferentes parâmetros biológicos, sendo que as substâncias foram solubilizadas em sistemas contendo Tween 80 a 1% ou meio aquoso tamponado. Além disso, análises por MEV revelaram alterações morfológicas significativas em nematoides adultos de *H. contortus*, incluindo enrugamento da cutícula e deformações na região da aba vulvar, com formação de bolhas no tegumento, sugerindo dano estrutural direto induzido pelo composto, confirmando os achados do presente estudo.

A atividade do carvacrol estende-se a outros nematoides patogênicos de animais. Boyko & Brygadyrenko (2023) demonstraram que emulsões aquosas contendo $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de carvacrol resultaram em mortalidade de 100% das larvas após 24 horas de exposição, enquanto

concentrações de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveram mortalidade superior a 96% , sendo que, nesse estudo, a substância foi previamente dissolvida em DMSO para posterior diluição. Esses dados reforçam o amplo espectro de ação do composto contra helmintos de importância veterinária, embora a sensibilidade varie entre espécies e estágios de desenvolvimento.

No âmbito dos nematoides fitopatogênicos, estudos com quimiotipos de *O. vulgare* reforçam o papel central do carvacrol na atividade nematicida. Ferreira et al. (2025) demonstraram que o quimiotipo rico em carvacrol (OvPEF) apresentou maior mortalidade de *Meloidogyne javanica*, com CL_{50} de $845,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24 horas e $840,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 48 horas, em comparação ao quimiotipo rico em timol e ao quimiotipo misto carvacrol–timol, sendo que o OE foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e posteriormente solubilizado em mistura contendo etanol e Tween 20. Esses resultados indicam que a predominância de carvacrol na composição química do OE é determinante para o efeito nematicida, embora a eficácia varie de acordo com a espécie avaliada.

Em nematoides associados à madeira, o carvacrol apresentou atividade variável. Choi et al. (2007) relataram CL_{50} de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para machos, $97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para fêmeas e 90mg.mL^{-1} para juvenis de *Bursaphelenchus xylophilus*, indicando maior suscetibilidade dos estágios adultos, sendo que as substâncias foram solubilizadas em água contendo Triton X-100. Em contraste, Kong et al. (2007) observaram CL_{50} de $1.230 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o mesmo nematoide, sugerindo variações metodológicas ou diferenças entre populações, sendo que, nesse estudo, os OEs foram adquiridos comercialmente e solubilizados em sistema contendo óleo de rícino e etanol. Estudos adicionais também apontaram baixa atividade do carvacrol contra *Pratylenchus penetrans*, com apenas 16,75% de mortalidade a $2.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, reforçando que a atividade adulticida do composto não é uniforme entre nematoides fitófagos e associados à madeira.

Além dos nematoides, o carvacrol demonstrou atividade significativa contra outros helmintos de importância médica e veterinária. Em *Schistosoma mansoni*, exposições a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por duas horas resultaram em perda completa da viabilidade dos nematoides adultos (Gomes et al., 2022). Adicionalmente, Moraes et al. (2013) demonstraram que o acetato de carvacrol, um derivado com maior estabilidade química, interferiu significativamente na produção diária de ovos em concentrações subletais entre $1,562$ e $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando impacto relevante sobre parâmetros reprodutivos, sendo que, nesse estudo, as substâncias foram dissolvidas em DMSO em baixa concentração e posteriormente diluídas em meio de cultura.

A avaliação da toxicidade aguda e da ecotoxicologia do carvacrol sugere um perfil de segurança relativamente favorável. Andre et al. (2016) relataram DL_{10} e DL_{50} de 546,8 mg/kg e 919 mg/kg, respectivamente, em camundongos, sem alterações comportamentais observáveis durante os ensaios. Estudos de ecotoxicidade demonstraram que resíduos de carvacrol em fezes bovinas são extremamente baixos e não causam efeitos adversos sobre organismos coprófagos, sendo que as substâncias foram inicialmente dissolvidas em etanol antes da aplicação na matriz e posterior evaporação do solvente (Verdú et al., 2023). Adicionalmente, modificações químicas, como a benzilação do carvacrol, foram associadas à redução da toxicidade, e testes de toxicidade oral aguda indicam que faixas seguras de dose podem ser estabelecidas para futuras aplicações em ovinos, sendo que, nesse estudo, foi utilizado Tween 80 como agente solubilizante (Braga et al., 2025).

De forma geral, os trabalhos analisados indicam que o carvacrol, isolado ou como constituinte majoritário do OE de *O. vulgare*, apresenta atividade nematicida relevante frente a diferentes grupos de helmintos. A intensidade do efeito varia amplamente em função da espécie avaliada, do estágio de desenvolvimento do parasito, da concentração empregada e do modelo experimental, mas os resultados convergem para um padrão de ação dependente da dose e do organismo-alvo. Em conjunto, esses achados reforçam a atividade do carvacrol como composto bioativo de interesse para o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de nematoides e outros helmintos.

5.1.3 Atividade em Cepas Resistentes

A avaliação da letalidade em cepas resistentes revelou um aumento expressivo das CL_{50} em comparação à cepa selvagem, evidenciando redução da suscetibilidade ao OE de *O. vulgare*. Os valores de CL_{50} variaram de 2,84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (DA1316) a 132,94 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CB211), resultando em FR de 2,8 a 126,1. De acordo com os critérios estabelecidos por Castro-Janer et al. (2009), todas as cepas avaliadas enquadram-se na categoria Resistente ($FR \geq 2$), embora em diferentes magnitudes.

Esse comportamento diferencial observado entre as cepas resistentes sugere que a atividade do OE de *O. vulgare* é modulada por mecanismos de resistência anti-helmíntica previamente descritos para as classes de fármacos às quais essas cepas são resistentes. A cepa DA1316, caracterizada como resistente à ivermectina, apresentou o menor FR, o que pode estar

relacionado a mecanismos associados às lactonas macrocíclicas, como alterações na expressão ou funcionalidade de canais de cloreto dependentes de glutamato e à superexpressão de glicoproteínas de efluxo do tipo P-gp, que reduzem a concentração intracelular de substâncias xenobióticas. Ainda assim, a manutenção de relativa sensibilidade ao OE sugere que seus constituintes, por apresentarem alvos múltiplos e não altamente específicos, não dependem exclusivamente dessas vias para exercer seu efeito tóxico (Brownlee et al., 1997; Feng et al., 2002).

Por outro lado, a cepa CB211, resistente ao levamisol, apresentou os maiores valores de CL₅₀, CL₉₀ e FR, indicando um impacto mais pronunciado dos mecanismos associados a alterações nos receptores nicotínicos da junção neuromuscular. Considerando que a paralisia e a perda de motilidade são eventos críticos para a letalidade em nematoides, modificações nesses receptores podem reduzir a eficácia de substâncias que, direta ou indiretamente, interferem na excitabilidade neuromuscular, contribuindo para a expressiva redução da sensibilidade observada (Robertson; Martin, 1993; Viana, 2000; Mckellar; Jackson, 2004). É relevante destacar que levamisol atua como agonista do receptor nicotínico de acetilcolina, enquanto carvacrol foi recentemente caracterizado como um antagonista potente e irreversível desses mesmos receptores em *Parascaris* sp., bloqueando correntes induzidas por acetilcolina e abolindo contrações musculares em preparações neuromusculares (Trailovic et al., 2021). Esse contraste farmacológico indica que alterações nos nAChRs da cepa CB211 resistente podem afetar a ação de carvacrol, modulando sua eficácia antiparasitária. Dessa forma, o antagonismo de carvacrol em receptores alterados pode contribuir para a redução da sensibilidade observada.

A cepa CB3474, resistente ao albendazol, apresentou valores intermediários de resistência, compatíveis com mecanismos relacionados a mutações na β -tubulina, especialmente aquelas que alteram a afinidade do fármaco pelo sítio de ligação. Embora os óleos essenciais não atuem diretamente sobre microtúbulos, alterações estruturais e funcionais associadas à β -tubulina podem refletir uma reorganização celular mais ampla, potencialmente influenciando processos de divisão celular, transporte intracelular e resposta ao estresse químico, o que pode contribuir para a redução parcial da eficácia do OE (Bogan; Armour, 1987; Elard et al., 1999).

De forma integrada, esses resultados indicam que, embora o OE de *O. vulgare* não pertença a nenhuma das classes químicas tradicionais de anti-helmínticos, sua atividade é

influenciada pelos mesmos contextos fisiológicos e moleculares que sustentam a resistência às drogas convencionais.

5.1.4 Atividade Ovicida

Os resultados de eclodibilidade em *C. elegans* indicam que tanto o OE de *O. vulgare* quanto o carvacrol apresentam atividade ovicida. Apesar da taxa de atividade calculada de 2,08, observou-se que as faixas de resposta de ambos se sobrepõem, o que sugere que, apesar do carvacrol ser o principal componente do óleo, a diferença na atividade entre o OE e o componente isolado não é significativa. Essa sobreposição também sugere que outros constituintes presentes no OE podem modular a atividade, mas não é possível determinar se aumentam ou diminuem o efeito.

Ao comparar com *H. contortus*, observa-se que os ovos desse nematoide apresentaram menor sensibilidade ao OE de *O. vulgare* do que os ovos de *C. elegans*, indicando diferenças na atividade entre espécies. Essa diferença pode estar relacionada a barreiras biológicas nos ovos ou a características fisiológicas próprias do nematoide parasitário.

Quando analisada a letalidade em adultos de *C. elegans*, o padrão de atividade se mantém: o OE demonstrou maior atividade do que o carvacrol isolado. Assim, o OE de *O. vulgare* pode apresentar maior atividade em tanto em adultos como em ovos de *C. elegans*.

A atividade ovicida do OE de *O. vulgare* tem sido demonstrada em espécies de nematoides. Štrbac et al. (2022) avaliaram o efeito do OE de *O. vulgare* em GINs de ovinos e observaram que o CI_{50} foi de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando OE de origem comercial previamente emulsificado em Tween 80 (3% v/v) e diluído em água para obtenção das concentrações de trabalho. De forma semelhante, Andre et al. (2016) testaram *H. contortus* resistente a benzimidazóis e encontraram que uma dose de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de carvacrol inibiu 99,7% da eclosão dos ovos, confirmando que o composto mantém alta eficácia mesmo em populações resistentes, sendo o carvacrol de origem comercial solubilizado em Tween 80 (~1%) ou em meio aquoso (PBS) para os ensaios. Além disso, Braga et al. (2025) compararam o carvacrol com seu derivado benzilado em *H. contortus* resistente a BZs, levamisol e lactonas macrocíclicas. Os valores de CE_{50} foram $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o carvacrol e $1.110 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o composto benzilado, indicando que a benzilação alterou a eficácia do composto, sendo o

carvacrol mais potente na inibição da eclosão, com ambos os compostos preparados utilizando Tween 80 (1,5%) como agente solubilizante. Isso sugere que modificações químicas podem afetar significativamente a atividade anti-helmíntica. Por fim, Katiki et al. (2017) testaram carvacrol isoladamente em uma cepa multirresistente de *H. contortus*, observando CI_{50} de 110 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que evidencia alta eficácia individual contra ovos, sendo a substância previamente dissolvida em Tween 80 ($\approx 3\%$) antes da diluição nas soluções de ensaio. Esses achados corroboram que o carvacrol mantém efeito ovicida consistente em diferentes contextos genéticos, consolidando seu papel como alternativa natural.

A mortalidade observada em bioensaios de quimiotaxia e de mortalidade de nematoides de solo e madeira também confirma o efeito do carvacrol sobre ovos e estágios iniciais. Ferreira et al. (2025) avaliaram o quimiotipo de carvacrol (OvPEF) inibiu 15,94% da eclosão de *M. javanica* em 216 horas, valor superior ao observado para o quimiotipo de timol (OvPS; 10,14%) e para o quimiotipo carvacrol–timol (OvLL; 9,42%) sendo o OE obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e posteriormente solubilizado em mistura de etanol (0,5%) e Tween 20 (1%) para preparo das soluções de trabalho.

Ensaio *in vivo* corroboram esses achados. Jiménez-Penago et al. (2021) observaram que o OE de *O. vulgare* reduziu a contagem de ovos em fezes de ovinos, com DL_{50} para larvas de *H. contortus* de 0,21 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,58 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em *Cooperia spp.* utilizando OE de origem comercial administrado diretamente aos animais, sem necessidade de sistemas de solubilização.

Os estudos revisados indicam que o OE de *O. vulgare* e o carvacrol isolado apresentam atividade ovicida consistente contra diferentes espécies de nematoides, com intensidade do efeito variando conforme a espécie e o tipo de ensaio realizado.

5.1.4 Inferência de Mecanismo de Ação

Os estudos revisados indicam que o carvacrol exerce sua atividade anti-helmíntica por múltiplos mecanismos, afetando tanto estágios larvais quanto adultos. Ensaio de motilidade e desenvolvimento larval em *H. contortus* resistente a benzimidazóis demonstraram que o carvacrol reduz significativamente a viabilidade e a motilidade das larvas, indicando um efeito direto sobre a fisiologia larval (Andre et al., 2016). Nesses ensaios, o carvacrol, de origem comercial, foi solubilizado em Tween 80 (1%) e posteriormente diluído em meio aquoso ou

PBS com antibióticos, evidenciando o uso de surfactantes para viabilizar a dispersão de compostos hidrofóbicos em sistemas biológicos. Imagens de MEV revelaram que, em nematoides adultos, o carvacrol provoca alterações morfológicas na cutícula, incluindo enrugamento e formação de bolhas no tegumento, sugerindo danos estruturais que comprometem a integridade do parasito (Andre et al., 2016).

Além disso, o carvacrol atua sobre o sistema neuromuscular dos nematoides. Estudos em *Ascaris suum* e *C. elegans* mostraram que o composto interage com receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) e com o receptor de tiramina (TyrR), resultando em inibição da despolarização muscular, redução das contrações induzidas por acetilcolina e dessensibilização do receptor (Trailović et al., 2015; Stojkovic et al., 2025; Lei et al., 2010). Nesses estudos mecanísticos, o carvacrol foi tipicamente dissolvido em DMSO e posteriormente diluído em soluções fisiológicas ou tampões experimentais, estratégia amplamente empregada para garantir solubilidade sem comprometer a viabilidade dos sistemas biológicos. Ensaio em oócitos de *Xenopus laevis* expressando Asu-ACR-16 ou nAChRs sensíveis à levamisol demonstraram que o carvacrol atua como inibidor não competitivo, reduzindo a resposta máxima à acetilcolina sem alterar o CE_{50} , evidenciando que o efeito não depende da ligação direta ao sítio agonista (Choudhary et al., 2019; Marjanović et al., 2021). De forma consistente, nesses modelos eletrofisiológicos, o preparo das soluções também envolveu DMSO em baixa concentração seguido de diluição em meio fisiológico, permitindo a avaliação precisa das interações receptor-ligante.

O carvacrol também apresenta atividade sobre ovos, alterando a ultraestrutura da casca e aumentando a rugosidade da superfície, o que provavelmente compromete a eclosão larval (Silva et al., 2021). Neste estudo, o óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, e posteriormente solubilizado com auxílio de surfactantes e/ou etanol antes das diluições em meio aquoso, evidenciando uma abordagem distinta dos ensaios com compostos isolados. Estudos com *Anisakis simplex* indicam que o carvacrol pode interferir na capacidade de penetração das larvas e inibir a acetilcolinesterase, sugerindo que a toxicidade também envolve disfunções na transmissão nervosa (López et al., 2017). Nesse contexto, o carvacrol utilizado foi dissolvido em etanol ou DMSO, seguido de diluição em meio biológico, reforçando o padrão metodológico observado para compostos lipofílicos.

Portanto, os mecanismos de ação do carvacrol parecem envolver uma combinação de efeitos estruturais, neuromusculares e enzimáticos, que se manifestam tanto em ovos quanto em larvas e nematoides adultos, explicando sua eficácia consistente contra diferentes espécies e estágios de parasitos. De forma integrada, observa-se que, independentemente do modelo experimental, a solubilização do carvacrol e de óleos essenciais depende predominantemente do uso de co-solventes orgânicos (como DMSO e etanol) ou surfactantes (como Tween), destacando a importância dessas estratégias para garantir biodisponibilidade e reprodutibilidade dos ensaios biológicos. Apesar dessa multifuncionalidade, a eficácia do carvacrol foi reduzida em cepas resistentes, possivelmente devido à competição por receptores compartilhados e à resistência cruzada ou a efeitos compensatórios que modulam a sensibilidade dos nematoides a diferentes substâncias. Esses achados evidenciam que a ação do carvacrol depende não apenas de seus múltiplos mecanismos de ação, mas também do contexto fisiológico e genético das cepas, destacando a complexidade da interação entre fitoquímicos e mecanismos de resistência anti-helmíntica.

5.2 Atividade do OE de *Cinnamomum cassia* e Cinamaldeído

5.2.1 Composição Química do OE de *Cinnamomum cassia*

A análise cromatográfica do óleo essencial de *C. cassia* revelou um perfil químico fortemente dominado por fenilpropanoides, com destaque para o (E)-cinamaldeído, que representou 80,68% da composição total, sendo identificado como o principal constituinte do óleo. Além dele, outros derivados fenilpropanoídicos também foram detectados, como o (E)-o-metoxicinamaldeído (9,68%), o (E)-acetato de cinamila (3,62%) e o (Z)-cinamaldeído (0,31%), reforçando a predominância dessa classe química no perfil analisado. Compostos aromáticos de outras classes também foram identificados em menores proporções, incluindo benzaldeído (0,88%) e o-anisaldeído (0,75%), ambos pertencentes à classe dos aldeídos aromáticos. Além disso, foram detectados o álcool feniletílico (0,35%) e o hexanol (0,27%), bem como a cumarina (2,02%), representando a fração de cumarinas presente no óleo essencial. Em menor abundância, observou-se ainda o sesquiterpeno hidrocarbonado α -cubebeno (0,29%), além de uma fração residual de compostos não identificados.

A composição química do OE de *C. cassia* obtida neste estudo apresenta elevada similaridade com a composição descrita na literatura por Cheng et al. (2024) para folhas da

mesma espécie analisadas em diferentes estações do ano, embora algumas diferenças quantitativas e qualitativas possam ser observadas. Nesse estudo, o OE foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, a partir de folhas da planta, seguido de secagem com sulfato de sódio anidro e armazenamento sob refrigeração até análise por GC-MS. Em ambos os casos, os aldeídos aromáticos e fenilpropanoides constituem a classe química predominante, confirmando o perfil característico do OE de *C. cassia*. No estudo de referência, o trans-cinamaldeído foi identificado como o principal constituinte em todas as estações, variando de 73,24% no inverno a 92,59% na primavera, sendo responsável pela elevada fração de aldeídos totais (83,48–96,23%). De forma consistente, no presente trabalho o (E)-cinamaldeído também se destacou como o componente majoritário, atingindo 80,68%, valor que se encontra dentro da faixa reportada para amostras sazonais, especialmente próxima aos teores observados no verão e inverno.

Além do cinamaldeído, ambos os estudos identificaram derivados aromáticos estruturalmente relacionados. O o-metoxicinamaldeído foi detectado em concentrações moderadas no estudo sazonal (2,08–8,07%), enquanto na amostra analisada neste trabalho esse composto apresentou teor relativamente mais elevado (9,68%), sugerindo possível influência de fatores como origem botânica, condições ambientais, processamento do material vegetal ou método de extração. De maneira semelhante, o o-metoxibenzaldeído (2-anisaldeído) foi identificado em ambos os perfis, embora com diferenças nas proporções relativas (Cheng et al., 2024).

Os sesquiterpenos, como α -cubebeno e cariofileno, apareceram como componentes minoritários no estudo de referência, com maior variabilidade sazonal, especialmente no inverno. No presente trabalho, o α -cubebeno também foi identificado, porém em baixa concentração (0,29%), corroborando seu papel secundário na composição do OE de *C. cassia*. Outros constituintes oxigenados e hidrocarbonetos alifáticos, como álcoois e ácidos orgânicos, foram detectados apenas na presente análise, em teores reduzidos, contribuindo pouco para o perfil global do óleo (Cheng et al., 2024).

De modo geral, a comparação entre os dois conjuntos de dados demonstra forte concordância quanto ao predomínio do (E)-cinamaldeído e de aldeídos aromáticos, confirmando a identidade química do OE de *C. cassia*. As diferenças observadas nas proporções relativas de substâncias secundárias, como o o-metoxicinamaldeído e alguns sesquiterpenos,

provavelmente refletem variações sazonais, ambientais ou metodológicas, sem alterar o perfil químico central característico dessa espécie (Cheng et al., 2024).

Considerando a elevada proporção do cinamaldeído e seu reconhecimento como principal marcador químico e bioativo do OE de *C. cassia*, os ensaios biológicos subsequentes foram conduzidos tanto com o OE quanto com o cinamaldeído isolado, com o objetivo de discriminar a contribuição individual desse aldeído aromático para os efeitos observados e avaliar em que medida a atividade do OE poderia ser atribuída ao seu constituinte majoritário ou à interação entre os diferentes componentes da matriz química.

5.2.2 Atividade em Adultos

A avaliação da letalidade em adultos de *C. elegans* indica que tanto o OE de *C. cassia* quanto o cinamaldeído isolado apresentam atividade adulticida, com intervalos de confiança sobrepostos, sugerindo que a diferença entre eles não é significativa nesse estágio. A taxa de atividade observada, de 1,13, confirma que ambos apresentam efeito muito próximo, evidenciando que a contribuição do componente majoritário é relevante, mas a matriz química do OE também desempenha papel importante. Em comparação, a atividade do OE de *C. cassia* e do cinamaldeído foi menor do que a observada para o OE de *O. vulgare* e carvacrol, nos quais o efeito adulticida do OE foi claramente superior ao do componente isolado, demonstrando que a influência relativa do constituinte principal pode variar entre os OEs. Além disso, o fato de ambos atingirem 100% de mortalidade apenas em concentrações relativamente elevadas sugere que o OE de *C. cassia* apresenta menor atividade em comparação ao OE de *O. vulgare*, refletindo diferenças intrínsecas entre as classes químicas predominantes, aldeídos aromáticos versus monoterpenos fenólicos.

Quando comparados à ivermectina, fármaco anti-helmíntico de referência tanto o OE de *C. cassia* quanto o cinamaldeído exibem atividade substancialmente inferior. No entanto, a atividade observada permanece relevante do ponto de vista biológico, especialmente considerando que o cinamaldeído atua por mecanismos distintos dos anti-helmínticos clássicos, não relacionados a alvos moleculares altamente específicos.

Esse padrão de maior atividade do OE de *C. cassia* também se refletiu na redução da postura de ovos, com o OE promovendo maior inibição da reprodução do que o cinamaldeído,

apesar da variação observada entre os dias de teste, o que demonstra que o efeito do OE não se restringe à letalidade, mas compromete a capacidade reprodutiva dos nematoides. Ambos OEs interferiram na capacidade reprodutiva dos nematoides; entretanto, o impacto do OE e do cinamaldeído sobre a postura de ovos é menos pronunciado do que o observado para *O. vulgare*, sugerindo diferenças nos alvos fisiológicos envolvidos.

No ensaio de migração larval em *H. contortus*, o OE de *C. cassia* manteve atividade larvicida, confirmando o efeito observado em adultos de *C. elegans* e mostrando que sua ação não se limita a um organismo ou estágio biológico. A magnitude da resposta nos adultos de *C. elegans* foi menor do que nas larvas L3 de *H. contortus*, indicando efeito aduicida inferior nesse modelo, embora ambos apresentem atividade. Um padrão semelhante foi observado para o outro OE estudado: tanto o OE de *O. vulgare* quanto o carvacrol apresentaram comportamento equivalente em larvas de *H. contortus* e adultos de *C. elegans*. Assim, apesar de a intensidade da atividade variar conforme o organismo e o estágio, a relação relativa entre OE e componente isolado se mantém, evidenciando um padrão geral de efeito para os OEs e seus constituintes majoritários.

A análise morfológica dos nematoides tratados com OE de *C. cassia* por MEV revelou alterações semelhantes nos nematoides tratados com o OE de *O. vulgare*.

Quando comparados os resultados de *C. cassia* e cinamaldeído com os previamente obtidos para *O. vulgare* e carvacrol, observa-se que, em ambos os OEs, a atividade do OE em adultos de *C. elegans* é superior à do componente majoritário isolado, a matriz química contribui para a redução da postura de ovos e há efeitos estruturais evidenciados por MEV. Uma diferença relevante é que, nos adultos de *C. elegans*, os intervalos de confiança se sobrepõem para *C. cassia* e cinamaldeído, indicando atividade muito semelhante entre OE e seu componente majoritário, enquanto para *O. vulgare* e carvacrol o OE se mostrou claramente mais ativo. Outras diferenças estão na magnitude da atividade: o OE de *O. vulgare* é mais ativo em larvas de *H. contortus*, enquanto o OE de *C. cassia* mantém forte efeito em adultos e na reprodução de *C. elegans*, demonstrando que cada OE pode apresentar perfis de atividade distintos conforme o organismo e o estágio biológico avaliado.

No contexto de nematoides gastrintestinais de ruminantes, o cinamaldeído tem se destacado pela elevada atividade frente a *H. contortus*. Frota et al. (2023) reportaram atividade

estável do cinamaldeído frente a isolados de *H. contortus* com diferentes perfis de resistência. Nesse estudo, os valores de CE₅₀ nos ensaios de desenvolvimento larval situaram-se entre 864 e 977 µg.mL⁻¹, com fatores de resistência inferiores a duas vezes, indicando que os mecanismos clássicos de resistência a anti-helmínticos não comprometem substancialmente sua eficácia. O estudo utilizou cinamaldeído de alta pureza (≥99%) adquirido comercialmente, com preparo de soluções padrão para ensaios larvais em meio aquoso suplementado, permitindo avaliação direta da atividade em isolados resistentes.

A atividade do cinamaldeído também foi demonstrada contra outros nematoides patogênicos de animais, incluindo parasitos de peixes e suínos. Ling et al. (2015) avaliaram a eficácia *in vivo* do cinamaldeído contra o monogenético *Dactylogyrus intermedius* em peixes dourados (*Carassius auratus*), observando CE₅₀ de 0,57 µg.mL⁻¹, valor consideravelmente inferior ao obtido para o ácido cinâmico (6,32 µg.mL⁻¹), evidenciando maior potência relativa do primeiro composto dentro do mesmo sistema biológico. Nesse estudo, o cinamaldeído foi preparado a partir de padrão puro dissolvido em metanol/água (1:1), com geração de curvas de calibração por HPLC e aplicação direta em ensaios *in vivo* e *in vitro* aquáticos. A DL₅₀ de 13,34 µg.mL⁻¹, para os peixes indica uma margem terapêutica favorável.

Resultados complementares foram reportados por Ji et al. (2012), que demonstraram 100% de eficácia anti-helmíntica de extratos da casca de *C. cassia* contra *D. intermedius* em peixes dourados (*C. auratus*) na concentração de 200 µg.mL⁻¹, enquanto a toxicidade letal para os peixes foi observada apenas a partir de 300 µg.mL⁻¹. A avaliação da toxicidade aguda de 48 horas revelou valores de CL₅₀ de 56,9 µg.mL⁻¹, para o extrato aquoso e de 31,3 µg.mL⁻¹, para o extrato metanólico, corroborando a robustez da atividade antiparasitária da espécie vegetal nesse modelo e indicando uma margem de segurança dependente do tipo de extrato avaliado. O material vegetal foi submetido a extração sequencial com solventes orgânicos (incluindo metanol e outros solventes polares e apolares), seguido de concentração em rotaevaporador e preparo de soluções finais diluídas diretamente em sistemas aquáticos experimentais.

Em contraste, Williams et al. (2015) observaram que, embora o trans-cinamaldeído apresentasse elevada atividade *in vivo* contra *A. suum*, *Trichuris suis* e *Oesophagostomum dentatum*, essa eficácia não se traduziu em redução significativa da infecção por *A. suum* em suínos *in vivo*, ressaltando limitações de extrapolação entre ensaios laboratoriais e sistemas biológicos complexos, bem como a influência da farmacocinética e da biodisponibilidade na

resposta terapêutica. O cinamaldeído foi obtido comercialmente e posteriormente fracionado a partir de extrato de casca de canela obtido por extração acetona/água (7:3), seguido de purificação e preparo de soluções em sistemas aquosos ou administradas por encapsulamento oral em ensaios *in vivo*.

No âmbito dos nematoides fitopatogênicos, o cinamaldeído demonstrou atividade relevante contra *Meloidogyne incognita*. Jardim et al. (2018) relataram que o OE de *C. cassia* apresentou maior eficácia *in vivo* contra juvenis de segundo estágio na concentração de 62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, superando o carbofurano a 173 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesse mesmo estudo, o (E)-cinamaldeído, identificado como principal constituinte do óleo, foi avaliado isoladamente e demonstrou desempenho comparável ao nematicida sintético tanto em ensaios *in vivo* quanto em aplicações em plantas de soja, resultando em redução significativa do número de galhas. O OE foi obtido por hidrodestilação e posteriormente emulsificado em Tween 80 (0,01 g.mL^{-1}), sendo diluído em série para aplicação direta em suspensões de nematoides e sistemas vegetais. Resultados adicionais foram apresentados por Barros et al. (2021) demonstraram que o OE de *Cinnamomum zeylanicum* apresentou elevada atividade nematicida contra *M. incognita*, com valores de CL_{50} e CL_{95} de 49 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 131 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O OE foi obtido por destilação a vapor e solubilizado em Tween 80 para preparo de diluições seriadas, enquanto o cinamaldeído puro foi preparado em solução emulsificada para comparação direta de toxicidade. O cinamaldeído, identificado como o principal constituinte do óleo, apresentou CL_{50} de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CL_{95} de 768 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto seu análogo estrutural, o cinamaldeído oxima, apresentou CL_{50} e CL_{95} de 323 e 529 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Adicionalmente, juvenis de segundo estágio previamente expostos à concentração correspondente ao CL_{50} do OE promoveram redução de 98% no número de galhas. Vanegas et al. (2022) demonstraram que o (E)-cinamaldeído apresenta alta atividade contra *M. incognita*, porém baixa persistência no solo, o que motivou a avaliação de ésteres do ácido cinâmico. Os derivados metílicos p-fluorados, p-clorados e p-bromados apresentaram CL_{50} de 168, 95 e 216 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, contra juvenis, valores comparáveis ao carbofurano (160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), reforçando o cinamaldeído como estrutura líder para o desenvolvimento racional de novos nematicidas. Caboni et al. (2013) avaliaram o cinamaldeído isolado contra *M. incognita* e relataram CE_{50} de 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, valor comparável a outros aldeídos aromáticos redox-ativos, como ftalaldeído e salicilaldeído. Os compostos foram preparados a partir de padrões químicos comerciais e solubilizados em sistemas aquosos com Tween ou DMSO, sendo aplicados diretamente em microplacas 96-well para ensaios de motilidade e inibição de eclosão. Em

conjunto, esses resultados confirmam que o cinamaldeído contribui de forma majoritária para a atividade nematicida do OE, embora a matriz do óleo apresente maior potência global, possivelmente em função de interações entre seus constituintes.

A atividade do cinamaldeído também se estende a nematoides associados à madeira. Park et al. (2005) demonstraram que o OE de *Cinnamomum verum* apresentou forte efeito nematicida contra *B. xylophilus*, promovendo 100% de imobilidade em machos, fêmeas e juvenis. A análise química revelou o cinamaldeído como constituinte majoritário do óleo (78,4%), seguido do acetato de cinamaldeído (5,7%), sendo ambos avaliados individualmente quanto à atividade nematicida. O acetato de cinamaldeído apresentou toxicidade mais pronunciada, com valores de CL_{50} de 32,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para juvenis e 39,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para machos, enquanto o cinamaldeído, embora tenha demonstrado efeito nematicida relevante, não teve seus valores de CL_{50} detalhados no estudo. Ainda assim, a imobilidade total observada nos ensaios com o OE confirma a contribuição significativa do cinamaldeído para o efeito global, corroborando sua relevância biológica nesse sistema. O OE foi testado em soluções emulsificadas em Tween 80 para avaliação individual de toxicidade. Adicionalmente, Kim et al. (2012) demonstraram elevada toxicidade fumigante de diferentes óleos de canela contra larvas utilizando insetos de *Camptomyia corticalis*, utilizando OEs aplicados em fase vapor após solubilização em etanol e evaporação em sistemas fechados de bioensaio, com CL_{50} variando entre 0,58 e 0,66 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reforçando o amplo espectro de ação biológica de substâncias voláteis derivadas de *Cinnamomum*.

A avaliação toxicológica do cinamaldeído indica, de modo geral, um perfil de segurança favorável, embora dependente do organismo e do estágio de desenvolvimento avaliado. Verdú et al. (2023) relataram baixa toxicidade para organismos não alvo, com CI_{50} de 5.439 mg/kg para inibição da resposta antenal em *Aegla cicatricosus*. Os compostos foram preparados em soluções padrão diluídas em etanol e água salinizada. Alves et al. (2021) corroboraram esse perfil ao demonstrarem ausência de genotoxicidade e baixa toxicidade em modelos murinos e em larvas de *Galleria mellonella*. Entretanto, efeitos adversos foram observados em embriões de *D. rerio*, com CL_{50} de 0,311 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, evidenciando que a sensibilidade ao cinamaldeído é altamente dependente do modelo biológico, reforçando a necessidade de avaliações toxicológicas específicas para cada aplicação proposta.

Os dados da literatura analisados indicam que *C. cassia* e seus principais constituintes, em especial o cinamaldeído, apresentam atividade antiparasitária consistente frente a uma ampla diversidade de nematoides, incluindo espécies de vida livre, parasitos de animais e fitopatogênicos. A magnitude do efeito varia de acordo com o organismo avaliado, o estágio de desenvolvimento do parasito e o modelo experimental empregado, mas, de modo geral, os resultados convergem para um perfil de elevada eficácia biológica, sustentando a atividade dessas substâncias como candidatas para o desenvolvimento de novas estratégias de controle antiparasitário.

5.2.3 Atividade Ovicida

Os resultados de eclodibilidade em *C. elegans* indicam que tanto o OE de *C. cassia* quanto o cinamaldeído apresentam atividade ovicida, mas, ao contrário do que ocorre em adultos, os intervalos de confiança não se sobrepõem, mostrando que o OE é mais ativo que o componente isolado na inibição da eclosão dos ovos. A taxa de atividade calculada, de 0,4, indica que o cinamaldeído é o principal responsável pela atividade ovicida, enquanto a contribuição do OE é menor nesse estágio. Comparando os OEs e seus componentes, observa-se que tanto o OE de *C. cassia* quanto o cinamaldeído apresentam maior atividade ovicida e efeito mais intenso em *C. elegans* do que o OE de *O. vulgare* e o carvacrol, além de a diferença entre OE de *C. cassia* e o cinamaldeído ser mais evidente nos intervalos de confiança.

Nos adultos de *C. elegans*, os intervalos de confiança se sobrepõem, mostrando que OE e componente isolado apresentam atividade semelhante, em concordância com a taxa de atividade. Isso demonstra que, enquanto nos ovos a contribuição do OE é evidente, nos adultos a atividade do componente principal já reflete boa parte do efeito observado, mostrando que a sensibilidade e o papel da matriz química variam conforme o estágio biológico.

Ao comparar com os ovos de *H. contortus*, observa-se que os ovos desse nematoide foram mais sensíveis ao OE de *C. cassia* do que aos ovos de *C. elegans*, indicando que a sensibilidade pode variar entre espécies e que características biológicas próprias do parasita podem influenciar a atividade. Em relação ao OE de *O. vulgare*, os ovos de *H. contortus* mostraram menor sensibilidade ao OE de *C. cassia*, refletindo um efeito ovicida menos intenso desse OE nesse nematoide. Esse padrão não se mantém na migração larval, em que ambos os OEs apresentam atividade larvicida, mas a sensibilidade das L3 de *H. contortus* é maior para o

OE de *O. vulgare*, mostrando que a magnitude da atividade varia conforme o estágio biológico avaliado.

A atividade ovicida do cinamaldeído e de OEs de *Cinnamomum* tem sido investigada em diferentes sistemas biológicos, evidenciando sua atividade como agente antiparasitário natural. Em nematoides gastrointestinais de ruminantes, Katiki et al. (2017) demonstraram que o cinamaldeído isolado apresentou CI_{50} de $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra ovos de *H. contortus* multirresistente, indicando elevada eficácia individual. Frota et al. (2023) confirmaram esses resultados, com CE_{50} de $133,2 - 142,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e CE_{95} de $34,2 - 36,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nos ensaios de eclosão de ovos de diferentes isolados, evidenciando que a eficácia do cinamaldeído não é comprometida pela resistência clássica a anti-helmínticos. Campbell et al. (2025) reforçaram a atividade ovicida do trans-cinamaldeído (TCL), relatando inibição superior a 90% da eclosão de ovos de nemabiomas de ovinos resistentes a benzimidazóis a $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com $CE_{90} \approx 27 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando-se mais potente que outras substâncias aromáticas naturais.

Em nematoides fitopatogênicos, Jardim et al. (2018) também observaram que o OE de *C. cassia* e o (E)-cinamaldeído reduziram a eclosão de ovos em ensaios *in vivo*, com $62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do óleo e $416 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do aldeído, resultados comparáveis ao nematicida carbofurano ($415 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Em plantas de soja inoculadas com ovos de *M. incognita*, a aplicação de (E)-cinamaldeído a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de substrato reduziu a população de nematoides de forma equivalente ao Basamid ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), evidenciando a relevância do composto na redução da eclosão de ovos no campo.

Caboni et al. (2013) relataram CE_{50} de $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cinamaldeído contra ovos de *M. incognita*, comparável a outros aldeídos aromáticos redox-ativos, sugerindo que o mecanismo de ação pode envolver interferência em processos internos essenciais para o desenvolvimento do ovo, sem modificação direta da cutícula.

Por fim, Alves et al. (2021) demonstraram que em embriões de *Danio rerio*, o cinamaldeído apresentou CI_{50} de $0,311 \mu\text{g.mL}^{-1}$, CE_{50} de $0,097 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para atraso na eclosão e CE_{50} de $0,105 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para edema pericárdico, evidenciando que a sensibilidade do modelo biológico influencia a atividade sobre ovos e reforçando a necessidade de avaliações toxicológicas específicas para cada aplicação.

Em síntese, os estudos revisados mostram que o cinamaldeído e os óleos essenciais de *Cinnamomum* possuem atividade ovicida significativa contra nematoides parasitos de animais e plantas, com valores consistentes e margem de segurança variável conforme o organismo. Esses resultados consolidam o potencial do cinamaldeído como candidato a desenvolvimento de novos nematicidas e agentes anti-helmínticos de origem vegetal.

5.2.3 Atividade em Cepas Resistentes

A avaliação da letalidade do OE de *C. cassia* em cepas resistentes revelou um comportamento distinto daquele observado para *O. vulgare*. Os valores de CL_{50} variaram de $41,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CB211) a $85,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (DA1316), sem aumento expressivo em relação à cepa selvagem. Como consequência, os fatores de resistência calculados indicaram que as cepas CB3474 e CB211 permaneceram sensíveis ao tratamento ($FR = 1,0$ e $0,8$, respectivamente), enquanto a cepa DA1316 apresentou resistência incipiente ($FR = 1,6$), de acordo com os critérios de Castro-Janer et al. (2009).

Esse padrão sugere que os mecanismos clássicos de resistência associados às lactonas macrocíclicas, aos benzimidazóis e ao levamisol exercem impacto limitado sobre a atividade do OE de *C. cassia*. A ausência de resistência expressiva, mesmo em cepas altamente resistentes a anti-helmínticos convencionais, indica que o cinamaldeído e o OE como um todo atuam por vias que não dependem diretamente dos principais alvos moleculares afetados por essas classes farmacológicas (Bogan; Armour, 1987; Robertson; Martin, 1993; Elard et al., 1999; Brownlee et al., 1997; Viana, 2000; Feng et al., 2002; Mckellar; Jackson, 2004).

A maior inclinação observada para a cepa CB211 sugere ainda que, uma vez ultrapassado determinado limiar de concentração, a mortalidade aumenta de forma mais abrupta, o que pode refletir um mecanismo de ação rápido e menos dependente de processos fisiológicos moduláveis por resistência genética.

5.2.4 Inferência de Mecanismo de Ação

Os estudos revisados indicam que o cinamaldeído exerce sua atividade anti-helmíntica por múltiplos mecanismos, afetando tanto ovos quanto estágios larvais e adultos de nematoides. Ensaio com ovos de *H. contortus* multirresistente demonstraram que o cinamaldeído apresenta CE_{50}/CL_{50} baixos, evidenciando alta eficácia ovicida, e seus efeitos não são comprometidos

pela resistência clássica a anti-helmínticos (Katiki et al., 2017; Frota et al., 2023; Campbell et al., 2025). Estudos com nematoides fitopatogênicos, como *M. incognita*, mostraram que o cinamaldeído reduz a eclosão de ovos e a viabilidade de juvenis de segunda fase, indicando ação direta sobre processos essenciais do desenvolvimento embrionário (Barros et al., 2021; Jardim et al., 2018; Caboni et al., 2013).

Em modelos de nematoides livres, como *C. elegans*, o cinamaldeído interfere no metabolismo antioxidante, alterando a expressão de múltiplos genes do sistema glutatona (*gst-1* a *gst-8*, *gst-25*, *gst-30*, *gst-38*, *gst-44* e *gcs-1*), o que pode aumentar o estresse oxidativo celular e comprometer a viabilidade do organismo (Lu et al., 2020). Além disso, o composto pode afetar o sistema neuromuscular, uma vez que *C. elegans* apresenta uma grande diversidade de receptores iônicos do tipo Cys-loop, canais catiônicos e aniônicos essenciais para a transmissão sináptica, sugerindo que o cinamaldeído pode prejudicar a coordenação motora e o controle muscular, interferindo indiretamente na locomoção e sobrevivência do nematoide (Hernando et al., 2023).

Outro possível mecanismo envolve a propriocepção, mediada por canais TRP (*trp-1* e *trp-2*) e neurônios SMDD, que regulam a coordenação da movimentação da cabeça em *C. elegans* (Yeon et al., 2018). A interferência do cinamaldeído nesses canais pode comprometer a percepção de alongamento muscular e a coordenação motora, prejudicando o movimento e o comportamento alimentar do nematoide, com reflexo na eclosão e desenvolvimento dos ovos.

Portanto, os mecanismos de ação do cinamaldeído parecem envolver uma combinação de efeitos metabólicos, neuromusculares e sobre o desenvolvimento embrionário, que se manifestam tanto em ovos quanto em larvas e nematoides adultos. Essa multifuncionalidade explica sua eficácia consistente contra diferentes espécies de nematoides, reforçando o potencial do cinamaldeído como candidato promissor para o desenvolvimento de agentes anti-helmínticos de origem vegetal.

5.3 Avaliação da Sinergia

A escolha do carvacrol e do cinamaldeído para os ensaios de sinergia foi fundamentada não apenas em sua atividade biológica previamente demonstrada, mas também em aspectos práticos e estratégicos relevantes para o desenvolvimento de alternativas anti-helmínticas.

Ambas são substâncias majoritárias de OEs disponíveis no mercado, facilmente obtidas com alto grau de pureza, custo relativamente baixo e estabilidade química adequada, características que favorecem sua padronização, reprodutibilidade experimental e eventual aplicação em formulações. Além disso, são moléculas estruturalmente distintas, um fenol monoterpênico e um aldeído aromático, o que sustenta a hipótese de mecanismos de ação complementares.

5.3.1 Sinergia em Adultos

A análise da interação entre carvacrol e cinamaldeído no ensaio de letalidade em adultos de *C. elegans* evidenciou padrão dependente da faixa de concentração e do modelo estatístico empregado, com predomínio global de efeito aditivo, mas presença de regiões bem definidas de sinergia e antagonismo. Entre os modelos avaliados, *Loewe* e *HSA* foram os que mais frequentemente detectaram zonas sinérgicas, enquanto *ZIP* e *Bliss* apresentaram maior sensibilidade para identificar interações antagônicas em concentrações mais baixas. Os *scores* médios positivos em todos os modelos estatísticos reforçam que a interpretação da interação varia conforme o pressuposto matemático de cada modelo, especialmente quanto à aditividade de mecanismos semelhantes (*Loewe*) versus independentes (*Bliss*).

Regiões predominantemente aditivas foram observadas nas combinações com baixas concentrações de carvacrol ($\leq 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) associadas a diferentes níveis de cinamaldeído, bem como em parte das combinações intermediárias, onde os *scores* permaneceram dentro da faixa de -10 a 10 na maioria dos modelos. Por outro lado, interações antagônicas localizadas foram mais evidentes em faixas de carvacrol baixo a intermediário combinadas com cinamaldeído moderado a alto, com destaque para os modelos *HSA* e *Bliss*, nos quais diversos pontos apresentaram *scores* negativos expressivos (inferiores a -10), indicando desempenho combinado inferior ao esperado pelo efeito do agente mais ativo ou pela independência de ação.

Em contraste, as regiões sinérgicas concentraram-se principalmente nas faixas intermediárias e altas de carvacrol ($\geq 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Combinações como 50:5, 50:25, 50:50, 75:25–100 e 100:25–50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram *scores* superiores a 10 , e em vários casos superiores a 20 , sobretudo nos modelos *Loewe* e *HSA*, com concordância parcial do modelo *ZIP*. Esses achados sugerem que a presença de carvacrol em concentração mínima mais elevada é determinante para a potencialização do efeito combinado, enquanto o cinamaldeído atua como modulador da magnitude da resposta. A concordância entre *Loewe* e *HSA* nessas regiões indica

possível sobreposição ou complementaridade de mecanismos de ação sob determinadas proporções.

De modo geral, o mapeamento por múltiplos modelos demonstra que, embora a interação média seja aditiva, existem zonas específicas da matriz em que a combinação resulta em ganho ou perda relevante de atividade. Essa heterogeneidade reforça a importância de avaliar superfícies completas de resposta e múltiplos referenciais de aditividade na interpretação de combinações bioativas, evitando conclusões baseadas apenas em médias globais ou em um único modelo de sinergia.

5.3.2 Sinergia em Ovos

A análise de interação entre carvacrol e cinamaldeído no ensaio de eclodibilidade de ovos de *C. elegans* demonstrou padrão predominantemente aditivo com forte contribuição de regiões antagônicas, variando conforme o modelo estatístico aplicado. Os modelos *ZIP* e *Bliss* foram os mais sensíveis na detecção de antagonismo, apresentando médias globais negativas (*ZIP* -6,15; *Bliss* -7,35), enquanto *Loewe* (0,61) e *HSA* (-0,62) indicaram comportamento próximo da aditividade. De modo geral, os diferentes modelos mostraram menor concordância para sinergia em ovos do que a observada em adultos, sugerindo interação combinada menos favorável nesse estágio.

As regiões antagônicas concentraram-se principalmente nas combinações com baixas concentrações de carvacrol (1–5 $\mu\text{.mL}^{-1}$) associadas a concentrações intermediárias e altas de cinamaldeído (25–100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nesses pontos, observaram-se *scores* fortemente negativos, especialmente nos modelos *ZIP* e *Bliss*, com diversos valores inferiores a -10 e alguns abaixo de -20, caracterizando antagonismo consistente. Em parte dessas mesmas regiões, o modelo *HSA* também indicou perda de efeito combinado, reforçando que, nessas proporções, a associação resultou em resposta inferior à esperada pelo agente mais ativo. Esse padrão sugere possível interferência de mecanismo ou limitação de penetração/ação combinada no estágio embrionário.

Regiões aditivas abrangeram grande parte das combinações com concentrações intermediárias e altas de carvacrol ($\geq 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sobretudo quando associadas a concentrações baixas a moderadas de cinamaldeído. Nesses pontos, os *scores* permaneceram

majoritariamente entre -10 e 10 em todos os modelos, indicando efeito combinado previsível. Já as regiões sinérgicas foram mais restritas e dependentes do modelo, ocorrendo principalmente em *Loewe* e *HSA* em combinações específicas, como $5:50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $25:5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde os *scores* ultrapassaram 10 . Mesmo nesses casos, a sinergia foi localizada e não sustentada de forma consistente entre todos os modelos, diferentemente do padrão observado no ensaio com adultos.

Em comparação com os resultados em adultos, a matriz de ovos apresentou maior frequência e intensidade de antagonismo e menor extensão de regiões sinérgicas, indicando que a interação entre carvacrol e cinamaldeído é globalmente mais favorável no estágio adulto do que na eclodibilidade de ovos.

5.3.3 Análise Comparativa com Estudos da Literatura

A crescente resistência de nematoides gastrointestinais a anti-helmínticos convencionais tem impulsionado a busca por alternativas terapêuticas baseadas em substâncias naturais. Os monoterpenos e fenilpropanoides, têm se destacado pela capacidade de exercer atividade nematocida tanto de forma isolada quanto em combinações sinérgicas, oferecendo novas perspectivas para o manejo de parasitoses resistentes (Ropiak et al., 2016; Katiki et al., 2017).

A combinação de timol e carvacrol, ambos presentes no OE de *O. vulgare* (timol 3,76% e carvacrol 58,92% conforme este estudo), já foi avaliada por Katiki et al. (2014), que observaram CL_{50} de $0,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para carvacrol, $0,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para timol, e $0,037 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a combinação, evidenciando um efeito sinérgico expressivo. Dessa forma, avaliar diferentes substâncias do mesmo OE representa uma estratégia complementar relevante, pois permite investigar possíveis sinergias ou efeitos aditivos entre os constituintes majoritários, fornecendo informações importantes para o desenvolvimento de formulações mais eficazes. Entretanto, resultados divergentes foram relatados por Ferreira et al. (2015), que avaliaram OEs de *O. vulgare* com diferentes quimiotipos, contendo variações nas concentrações de carvacrol e timol, em modelos de fitonematoídeos, e não observaram benefícios significativos. Apesar da abundância de carvacrol e timol em uma das populações, a presença de outros constituintes do OE possivelmente modulou a atividade, interferindo na manifestação de efeitos sinérgicos. Esses achados indicam que a eficácia de combinações depende não apenas da proporção dos componentes majoritários, mas também do perfil químico completo do OE.

O cinamaldeído, principal componente de OEs de *C. cassia*, demonstrou elevada eficácia ovicida contra ovos de *H. contortus* multirresistente, com CI_{50} de $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando avaliado em combinações binárias, a sinergia mais potente foi observada entre cinamaldeído e carvacrol, resultando em CI_{50} reduzido para $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$, evidenciando a capacidade do cinamaldeído aumentar a atividade de outras substâncias bioativas (Katiki et al., 2017). Em estudos de coadministração com anti-helmínticos sintéticos, como a doramectina, a combinação de cinamaldeído e OE de grapefruit rosa resultou em aumento da eficácia contra *Haemonchus* spp., com redução de 40%, em comparação a 56% da doramectina isolada no Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes. A associação com loperamida aumentou ainda a taxa para 75%, sem alterações significativas nos parâmetros farmacocinéticos plasmáticos, sugerindo que o efeito sinérgico é mediado por interações locais na interface com o parasito (Miró et al., 2025).

Estudos realizados em ovinos portugueses resistentes a benzimidazóis demonstraram que o trans-cinamaldeído apresenta inibição da eclosão de ovos superior a 90% a $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com $CI_{90} \approx 27 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mais eficaz que carvacrol, timol e salicilaldeído. Ensaio de interação (*checkerboard*) com albendazol e tiabendazol indicaram sinergia forte, com Índice de Concentração Inibitória Fracionária $\leq 0,25$, reduzindo a CE_{90} média dos benzimidazóis em até 94,7%, reforçando a atividade do trans-cinamaldeído em estratégias combinatórias para controle de nematoides gastrointestinais resistentes, independentemente da espécie de nematoide (Campbell et al., 2025). De forma similar, o carvacrol isoladamente apresentou CE_{90} de aproximadamente $120,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra ovos de nematoides gastrointestinais resistentes, sendo necessário combinar o composto com benzimidazóis para alcançar efeitos sinérgicos significativos (Índice de Concentração Inibitória Fracionária entre 0,20 e 0,49), demonstrando que tanto o carvacrol quanto o trans-cinamaldeído atuam de maneira complementar à ação dos anti-helmínticos sintéticos, provavelmente por dano estrutural à casca dos ovos (Campbell et al., 2025).

Além das substâncias isoladas, a avaliação de combinações binárias revelou efeitos sinérgicos notáveis. A mistura de cinamaldeído e carvacrol reduziu a CL_{50} de 18 para $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *H. contortus*, enquanto a combinação de carvacrol com geraniol reduziu quase 10 vezes a CL_{50} individual em *C. elegans* (Silva et al., 2021). Esses efeitos sinérgicos foram também observados *in vivo* e *in vitro* em outros modelos parasitológicos, incluindo ensaios eletrofisiológicos, nos quais o trans-cinamaldeído aumentou a atividade os efeitos paralisantes

de levamisol e monepantel, demonstrando múltiplos alvos de ação e reforçando sua ação da politerapia com fitoquímicos (Hernando et al., 2025).

Estudos em ectoparasitos também confirmam o efeito sinérgico de monoterpenos e fenilpropanoides. Novato et al. (2015) avaliaram timol, carvacrol e (E)-cinamaldeído em larvas de *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*, observando que, isoladamente, o (E)-cinamaldeído apresentou os menores valores de CL₅₀ (1.400 µg.mL⁻¹ para *A. sculptum* e 1.680 µg.mL⁻¹ para *D. nitens*), seguido por timol e carvacrol. Quando combinados, timol e carvacrol apresentaram efeito sinérgico moderado, enquanto a combinação de carvacrol com (E)-cinamaldeído também resultou em sinergia moderada em *A. sculptum*, evidenciando que associações de monoterpenos podem amplificar a eficácia antiparasitária além dos efeitos isolados.

Além de aumentarem a eficácia, as combinações sinérgicas podem reduzir a necessidade de altas doses individuais, mitigando riscos de toxicidade e ecotoxicidade. Por exemplo, a puerarina, com baixa biodisponibilidade oral, teve sua absorção e efeito terapêutico significativamente aumentados quando combinada com cinamaldeído, com C_{max} e AUC(0–t) 4,84 e 11,54 vezes maiores, respectivamente, demonstrando como a sinergia também pode ser explorada do ponto de vista farmacocinético (Wang et al., 2025).

O presente estudo contrasta com achados de literatura em *H. contortus* e *C. elegans*, nos quais combinações de cinamaldeído e carvacrol ou com outros monoterpenos frequentemente reduziram significativamente as CL₅₀ e CE₅₀, destacando a variabilidade interespecies e o papel crítico da concentração relativa e do estágio biológico na manifestação de sinergia (Katiki et al., 2017; Silva et al., 2021). Assim, os resultados obtidos reforçam a necessidade de ajustar estratégias combinatórias e ressaltam que nem toda associação de substâncias bioativas resultará em sinergia relevante, especialmente em contextos de baixa atividade individual.

5.4 Desenvolvimento das Formulações e Validação Analítica

Os resultados obtidos no desenvolvimento das beads indicam que ambas as estratégias de encapsulamento, gelificação iônica e incorporação em matriz de sulfato de cálcio, foram adequadas para a veiculação das substâncias bioativas carvacrol e cinamaldeído. A formação de esferas uniformes, com boa integridade estrutural e estabilidade após a secagem, sugere que os processos empregados foram suficientemente robustos para garantir a incorporação

homogênea dos princípios ativos, sem comprometer as propriedades físicas do sistema. Essas características são particularmente relevantes para aplicações farmacêuticas ou veterinárias, nas quais a reprodutibilidade do tamanho, da forma e da resistência mecânica das unidades é determinante para o controle de dose e desempenho biológico.

A validação da metodologia para quantificação de carvacrol e cinamaldeído demonstrou adequação para monitoramento nas formulações, atendendo aos critérios da RDC nº 166/2017. A linearidade foi excelente ($r^2 > 0,99$), garantindo confiabilidade na quantificação, enquanto a precisão intra- e inter-dia (DPR < 9%) e a exatidão confirmaram repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação satisfatória dos analitos. Os valores de LOD e LOQ indicam sensibilidade compatível com as concentrações empregadas nos ensaios biológicos.

A avaliação do efeito matriz mostrou interferência significativa apenas para o carvacrol em formulações por gelificação iônica (variação de 31,37%), possivelmente devido a interações com a matriz polimérica, enquanto o sistema de sulfato de cálcio apresentou variação mínima (1,98%), indicando maior confiabilidade. Para o cinamaldeído, ambos os sistemas não apresentaram efeito relevante da matriz (<5%). Esses resultados evidenciam que o método é robusto e confiável, sendo particularmente adequado para formulações baseadas em sulfato de cálcio e aplicações quantitativas futuras.

Assim, a integração entre o desenvolvimento das formulações e a validação dos métodos analíticos assegura a consistência dos dados gerados e fortalece a interpretação dos resultados biológicos, consolidando essas beads como sistemas promissores para a veiculação de substâncias naturais com atividade anti-helmíntica.

A literatura evidencia que diferentes estratégias de formulação influenciam significativamente a eficácia biológica de substâncias naturais com atividade nematocida e antifúngica. Estudos com esferas de quitosana incorporando pó ou extrato de canela (CCP e CCE) demonstraram que a composição do núcleo afeta a atividade *in vivo*, tanto contra *Rhizoctonia solani* quanto contra *M. incognita*. Seo et al. (2014) relataram que esferas contendo 5% de pó de canela apresentaram atividade antifúngica relativa de 30,9% e 23,9% após 1 e 2 dias, respectivamente, enquanto esferas contendo 0,5% de extrato de canela atingiram valores mais baixos, indicando que a forma do composto e a concentração influenciam diretamente o desempenho biológico. No caso dos nematoides, a inibição de eclosão e mortalidade de juvenis foi elevada para ambas as formulações, porém as esferas com extrato de canela mostraram

mortalidade de 95,8%, levemente superior ao pó de canela (85%), sugerindo que a extração e a concentração das substâncias ativas podem maximizar a disponibilidade biológica dentro da matriz de quitosana.

A atividade dos OEs como alternativa nematicida também é documentada. Barros et al. (2021) observaram que o OE de *C. zeylanicum* reduziu em até 98% a infestação de *M. incognita* em plantas de tomate quando juvenis tratados foram inoculados, enquanto o cinamaldeído isolado apresentou CL_{50} de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e CL_{95} de $768 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e seu análogo cinamaldeído oxima apresentou CL_{50} de $323 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e CL_{95} de $529 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses dados indicam que a forma química do componente principal do OE influencia a potência nematicida, com o óleo completo apresentando efeito superior, possivelmente devido a interações sinérgicas entre constituintes minoritários, como fenóis e aldeídos aromáticos, que podem atuar em múltiplos alvos do nematoide.

Nanoencapsulações de derivados fenólicos também demonstram ganhos significativos em estabilidade e redução de toxicidade. André et al. (2021) relataram que carvacril acetato nanoencapsulado em quitosana/goma de chichá manteve a atividade anti-helmíntica *in vivo*, atingindo redução de 71,5% na contagem de ovos por grama de fezes, comparado a 52,9% do composto livre, enquanto a toxicidade aguda foi significativamente menor. Esse resultado evidencia que a encapsulação não apenas protege o composto contra degradação, mas também aumenta sua eficácia biológica, permitindo doses menores e maior segurança para aplicações veterinárias.

Esses estudos reforçam que a escolha da forma de incorporação influencia diretamente a eficácia biológica, a liberação dos princípios ativos e a toxicidade do sistema. As interações entre a matriz e as substâncias, a concentração e a forma química dos bioativos são determinantes críticos para otimizar o desempenho anti-helmíntico e antifúngico, indicando que estratégias de formulação bem planejadas são fundamentais para o desenvolvimento de alternativas naturais seguras e eficazes (Seo et al., 2014; Barros et al., 2021; André et al., 2021).

6 CONCLUSÃO

Os OEs de *O. vulgare* e *C. cassia*, assim como seus principais componentes, carvacrol e cinamaldeído, apresentaram atividade adulticida e ovicida frente ao *C. elegans*. As CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para adultos foram: OE de *O. vulgare* = 1,03; carvacrol = 6,81; OE de *C. cassia* = 53,09; e cinamaldeído = 47,87. Para ovos, as CI_{50} foram: OE de *O. vulgare* = 13,69; carvacrol = 20,57; OE de *C. cassia* = 9,8; e cinamaldeído = 3,08.

Em cepas resistentes de *C. elegans*, o OE de *O. vulgare* teve eficácia reduzida (FR = 126,1), enquanto o OE de *C. cassia* manteve atividade (FR = 0,8 - 1,6).

A interação entre carvacrol e cinamaldeído foi aditiva ou moderadamente sinérgica em adultos e aditiva a ligeiramente antagonista em ovos.

As formulações propostas incorporaram os princípios ativos.

Por fim, os OEs de *O. vulgare* e *C. cassia* apresentaram os seguintes valores frente a *H. contortus*: no ensaio de eclosão de ovos, CI_{50} = 45,09 e 5,64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente; e no ensaio de migração larval, CL_{50} = 0,0058 e 0,0187 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. No teste de ovos, o OE de *C. cassia* apresentou menor CI_{50} que o de *O. vulgare*, indicando maior atividade anti-helmíntico, enquanto no ensaio larval o OE de *O. vulgare* mostrou maior atividade.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados deste estudo, existem perspectivas futuras importantes para transformar os achados em soluções práticas e sustentáveis para o controle parasitário.

É importante investigar de forma detalhada os mecanismos de ação dos OEs e de seus componentes, incluindo receptores neuromusculares, canais iônicos e vias de estresse oxidativo. Esse conhecimento permitirá aprimorar as substâncias de maneira racional e identificar novos alvos terapêuticos.

A otimização e validação *in vivo* das formulações desenvolvidas também é essencial. As beads demonstraram estabilidade e viabilidade em laboratório, contudo, faz-se necessária avaliar sua eficácia, farmacocinética e segurança em modelos animais naturalmente infectados, considerando efeitos residuais e impacto no bem-estar animal.

Dada a sinergia limitada entre carvacrol e cinamaldeído, explorar combinações estratégicas com anti-helmínticos convencionais é uma abordagem promissora. Associações com benzimidazóis ou lactonas macrocíclicas podem gerar efeitos sinérgicos, superar mecanismos de resistência, retardar sua evolução e reduzir as doses necessárias de cada fármaco.

Uma avaliação abrangente de segurança e impacto ambiental é igualmente importante. Estudos toxicológicos detalhados, incluindo efeitos crônicos e análise de resíduos em produtos de origem animal, devem ser realizados, assim como pesquisas ecotoxicológicas para compreender o destino dessas substâncias no ambiente agropecuário e seus efeitos sobre organismos não-alvo.

Por fim, a plataforma experimental validada com *C. elegans* permite triagens ampliadas. Bibliotecas mais diversificadas de fitoativos ou derivados sintéticos podem ser testadas, e os candidatos mais promissores avaliados contra um espectro maior de helmintos de relevância veterinária e médica. A integração dessas estratégias, da pesquisa básica ao desenvolvimento aplicado e à avaliação ambiental, é essencial para consolidar os fitoativos como ferramentas viáveis e sustentáveis no controle parasitário.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, F. H.; Alaniz, N. M.; Saleh, M.A. Nematicidal activity of terpenoids. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 48, n. 1, p. 16–22, 2013.
- Abidu-Figueiredo, M.; Carvalho-De-Souza, B.; Maio, F. G.; Barbosa, C. G.; Reinecke, R. K. Comparação entre Técnicas Coproparasitológicas para a Contagem de Ovos de Nematóides Gastrointestinais de Búfalos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 5, 2005.
- Ahmed, I. & Kasraian, K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Reviews*, v. 54, p. 871-882, 2002.
- Akhlada; Siddiqui, N.; Anurag; Saifi, A.; Kesharwani, A.; Parihar, V.K.; Sharma, A. Neuroprotective Action of Selected Natural Drugs Against Neurological Diseases and Mental Disorders: Potential Use Against Radiation Damage. *Neurochem. Res*, 49, 2336–2351, 2024.
- Alamgir A. N. M. Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts. In: *Progress in Drug Research*. Rainsford KD (Ed.). Springer Nature, 2017.
- Alberich, M.; Garcia, M.; Petermann, J; Blancfuney, C.; Jouffroy, S.; Jacquiet, P; Lespine, A. Evaluation of nematode susceptibility and resistance to anthelmintic drugs with a WMicrotracker motility assay. *Sci Rep*, 15, 17968, 2025
- Albright, R. B.; Lawrence, M. C.; Sabnis, S. S.; Ranjan, S. Benzimidazole Anthelmintic Compositions. *European Patent EP2331068B1*, 4 January 2017.
- Albright, R.B.; Lawrence, M.C.; Sabnis, S.S.; Ranjan, S. Benzimidazole Anthelmintic Compositions. *U.S. Patent US9283176B*, 15 March 2016.
- Alkayali, T.; Casciato, D.; Wynes, J.; Chua, J.; Doub, J. B. Are Biodegradable Calcium Sulfate Antibiotic Beads Effective and Safe Adjuvants for Diabetic Foot Osteomyelitis?. *Cureus*, 16(1), e52444, 2024.
- Almatroodi, S.A.; Syed, M.A.; Rahmani, A.H. Potential therapeutic targets of Curcumin, most abundant active compound of turmeric spice: Role in the management of various types of cancer. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.*, 16, 3–29, 2021.
- Altun, Z. F. & Hall, D. H. Introduction. In: *WormAtlas*, 2009.
- Alves, D. D. N.; Martins, R. X.; Ferreira, E. D. S.; Alves, A. F.; Andrade, J. C.; Batista, T. M.; Lazarini, J. G.; Amorim, L. S.; Rosalen, P. L.; Farias, D. F.; Castro, R. D. Toxicological parameters of a formulation containing cinnamaldehyde for use in treatment of oral fungal infections: an *in vivo* study. *BioMed Research International*, v. 2021, p. 2305695, 2021.
- Andre, W. P.; Ribeiro, W. L.; Cavalcante, G. S.; Santos, J. M.; Macedo, I. T.; Paula, H. C.; Freitas, R. M.; Morais, S. M.; Melo, J. V.; Bevilaqua, C. M. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*, v. 218, p. 52–58, 2016.
- Arroyo-Lopez, C. *Caenorhabditis elegans*: a model to study the anthelmintic effects of polyphenolic compounds on the fertility of parasitic gastrointestinal nematodes? *bioRxiv*. 2020.
- Bakkali, F.; Averbeck, S. Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils – A Review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- Baneth G., Thamsborg, S. M.; Otranto, D.; Guillotx, J.; Blagax, R.; Deplazesk, P.; Solano-Gallego, L. Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe, *Journal of Comparative Pathology*, p. 1-21, 2015.
- Barros, A. F.; Campos, V. P.; Paula, L. L.; Pedroso, L. A.; Silva, F. J.; Silva, J. C. P.; Oliveira, D. F.; Silva, G. H. The role of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil, (E)-cinnamaldehyde and (E)-cinnamaldehyde oxime in the control of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Phytopathology*, v. 169, n. 4, p. 229–238, 2021.

- Berenbaum, M. C. What is synergy? *Pharmacological Reviews*, v. 41, n. 2, p. 93–141, 1989.
- Bhattacharyya, S.; Sinha, K.; Sil, P. Cytochrome P450s: Mechanisms and Biological Implications in Drug Metabolism and its Interaction with Oxidative Stress. *Curr. Drug Metab*, 15, 719–742, 2015.
- Biharee, A.; Sharma, A.; Kumar, A.; Jaitak, V. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, 146, 104720, 2020.
- 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.
- Bliss, C. I. The toxicity of poisons applied jointly¹. *The Annals of Applied Biology*, v. 26, n. 3, p. 585–615, 1939.
- Bogan, J. & Armour, J. Anthelmintics for Ruminants. *International Journal for Parasitology*, v. 17, n. 2, p. 483–491, 1987.
- Bon, K. K. & Chul, L. H. Nematicidal Composition Containing Geraniol. *KR101862202B1*, 29 May 2018.
- Booth, B. & Zimmel, R. Prospects for productivity. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 : 451 – 456, 2004.
- Boyko, O. & Brygadyrenko, V. Survival of nematode larvae after treatment with eugenol, isoeugenol, thymol, and carvacrol. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, v. 15, n. 4, p. 25, 2023.
- Braga, A. P.; Araújo Filho, J. V.; Barbosa, M. L. F.; Oliveira, R. F.; Alves, D. R.; Silva, W. M. B. Anthelmintic activity on *Haemonchus contortus* and toxicity of benzoyl-carvacrol: a study *in vitro*, *in silico* and *in vivo*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 34, n. 2, e018824, 2025.
- BRASIL, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 25 jul. 2017.
- BRASIL. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Estabelece o Regulamento Técnico elaborado pelo Departamento de Defesa Animal, que regula a produção, controle e emprego de antiparasitários de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, 12 maio 1997.
- Brenner, S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.
- Bullen, S.; Beggs, D.; Mansell, P.; Runciman, D.; Malmo, J.; Playford, M.; Pyman, M.; Beggs, D. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy cattle in the Macalister Irrigation District of Victoria. *Australian Veterinary Journal*, [s.l.], v.94, p. 35–41, 2016.
- Burns, A. R.; Luciani, G. M.; Musso, G.; Bagg, R.; Yeo, M.; Zhang, Y.; Rajendran, L.; Glavin, J.; Hunter R.; Redman, E.; Stasiuk, S.; Schertzberg, M.; McQuibban, G. A.; Caffrey, C. R.; Cutler, S. R.; Tyers, M.; Giaever, G.; Nislow, C.; Fraser, A. G.; MacRae, C. A.; Gilleard, J.; Roy, P. J. *Caenorhabditis elegans* is a Useful Model for Anthelmintic Discovery. *Nature Communications*, v. 6, n. 7485, p. 1–33, 2015.
- Butterweck, V.; Jurgentlied-Wolff, K. G.; Nahrstedt, A.; Win terhoff, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med.* 68, 577–580, 2003.
- Byerly, L.; Cassada, R. C.; Russel, R. L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, v. 51, n. 1, p. 23–33, 1976.
- Caboni, P.; Aissani, N.; Cabras, T.; Falqui, A.; Marotta, R.; Liori, B.; Ntalli, N.; Sarais, G.; Sasanelli, N.; Tocco, G. Potent nematicidal activity of phthalaldehyde, salicylaldehyde, and cinnamic aldehyde against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 8, p. 1794–1803, 2013.

- Calero, J.; Sanchez, Y. F.; Torrez, R.; Hemann, E.; Lopez, K. Elaboración y Caracterización de Microcápsulas Gastrorresistentes de Diclofenac Obtenidas por Gelificación Iónica. *Universitas*, v. 1, n. 2, p. 27-30, 2008.
- Campbell, N. F.; Waap, H.; Cortes, H. Species diversity, benzimidazole resistance, and phytochemical synergy in gastrointestinal nematode nemabiomes from sheep farms in Portugal. *Experimental Parasitology*, v. 279, p. 109058, 2025.
- Cançado, P. H. D.; Catto, J. B.; Soares, C. O.; Miranda, P. A. B.; Souza, T. F.; Piranda, E. M. Controle Parasitário de Bovinos de Corte em Sistemas de Integração. In: *Bungenstab, D. J. Sistemas de Integração Lavoura-pecuária-floresta: a Produção Sustentável*. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2012, p. 177-188.
- Castro, E.; Rifran, L.; Piaggio, J.; Gil, A.; Miller, R. J.; Schumaker, T. T. S. *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Veterinary Parasitology*, v. 162, n. 1, p. 120-128, 2009.
- Chaweeborisuit, P.; Suriyonplengsaeng, C.; Suphamungmee, W.; sobhon, P.; Meemon, K. Nematicidal Effect of Plumbagin on *Caenorhabditis elegans*: a Model for Testing a Nematicidal Drug. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, v. 71, n. 5-6, p. 121-131, 2016.
- Cheng, Y.; Fu, Y.; Gu, D.; Huang, Y.; Lu, Y.; Liu, Y.; Li, X.; Yao, X.; Zhang, X.; Jian, W. Seasonal variation in chemical composition and antioxidant and antibacterial activity of essential oil from *Cinnamomum cassia* leaves. *Plants*, v. 14, p. 81, 2025.
- Choi, I. H.; Kim, J.; Shin, S. C.; Park, I. K. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Korean Journal of Applied Entomology*, v. 46, n. 2, 2007.
- Choudhary, S.; Marjanović, D. S.; Wong, C. R.; Zhang, X.; Abongwa, M.; Coats, J.R.; Trailović, S. M.; Martin, R. J.; Robertson, A. P. Menthol acts as a positive allosteric modulator on nematode levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptors. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 9, p. 44–53, 2019.
- Costa, R. S. da; Gabetto, R. S. S.; Caribé, R. A. Análise farmacoeconômica de minimização de custos para protocolo de antibioticoterapia para pneumonia adquirida em comunidade de um hospital estadual do Rio de Janeiro/RJ. *Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde*, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 31-38, out./dez. 2013.
- Dantas-Torres, F. & Otranto, D. Dogs, Cats, Parasites, and Humans in Brazil: Opening the Black Box. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 22, p. 1-25, 2014.
- Davison, E. K. & Brimble, M. A. Natural Product Derived Privileged Scaffolds in Drug Discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 52, p. 1-8, 2019.
- Dehelean, C.A.; Marcovici, I.; Soica, C.; Mioc, M.; Coricovac, D.; Iurciuc, S.; Cretu, O.M.; Pinzaru, I. Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy. *Molecules*, 26, 1109, 2021.
- Delatour, T.; Racault, L.; Bessaire, T.; Desmarchelier, A. Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 35, 632–645, 2018.
- Demeler, J.; Küttler, U.; El-Abdellati, A.; Stafford, K.; Rydzik, A.; Varady, M.; Kenyon, F.; Coles, G.; Höglund, J.; Jackson, F. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.174, n. 1, p. 58-64, Nov. 2010.
- Dey, S.; Luo, H.; Fokoue, A.; Hu, J.; Zhang, P. Predicting adverse drug reactions through interpretable deep learning framework. *BMC Bioinf.* 19, 476, 2018
- Doyle, S. R.; Laing, R.; Bartley, D.; Morrison, A.; Holroyd, N.; Maitland, K.; Antonopoulos, A.; Chaudhry, U.; Flis, I.; Howell, S.; McIntyre, J.; Gilleard, J. S.; Tait, A.;

- Mable, B.; Kaplan, R.; Sargison, N.; Britton, C.; Berriman, M.; Devaney, E.; Cotton, J. A. Genomic landscape of drug response reveals mediators of anthelmintic resistance. *Cell reports*, 41(3), 111522, 2022.
- Ellse, L. & Wall, R. The Use of Essential Oils in Veterinary Ectoparasite Control: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 28, n. 3, p. 233-243, 2014.
- Eng, J. K. L.; Prichard, R. K. A Comparison of Genetic Polymorphism in Populations of *Onchocerca volvulus* from Untreated- and Ivermectin-treated Patients. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 142, n. 2, p. 193-202, 2005.
- Epe, C. & Kaminsky, R. New Advancement in Anthelmintic Drugs in Veterinary Medicine. *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 3, p. 129-134, 2013.
- Fairweather, I.; Boray, J. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *The Veterinary Journal*, v. 158, n. 2, p. 81-112, 1999.
- Falleh, H. Demystifying the power of essential oils: a review of their antibacterial properties and potential as natural food preservatives. *EXCLI journal*, 24, 828–850, 2025.
- FAO - Food and Agriculture Organization. Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants; Book of Abstracts of the Rome; FAO: Rome, Italy, 2004.
- Ferreira, R.; Maleita, C.; Fonseca, L.; Esteves, I.; Sousa-Ferreira, I.; Cabrera, R.; Castilho, P. Chemical screening and nematicidal activity of essential oils from Macaronesian and Mediterranean plants for controlling plant-parasitic nematodes. *Plants*, v. 14, p. 337, 2025.
- Fitzpatrick, J. L. Global Food Security: The Impact of Veterinary Parasites and Parasitologists. *Veterinary Parasitology*, v. 195, n. 3-4, p. 233-248, 2013.
- Fortes, E. *Parasitologia veterinária 4.ed.* São Paulo: Ícone, 2004. 607p.
- Foucquier, J. & Guedj, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*, v. 3, n. 3, p. e00149, 2015.
- Fox, N.J.; Smith, L.A.; Houdijk, J.G.M.; Athanasiadou, S.; Hutchings, M.R. Ubiquitous parasites drive a 33% increase in methane yield from livestock. *Int. J. Parasitol.* 2018, 48, 1017–1021.
- Frei, W. Versuche über Kombination von Desinfektionsmitteln. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 75, n. 1, p. 433–496, 1913.
- Frota, G. A.; Santos, V. O. D.; Rodrigues, J. F. V.; Oliveira, B. R.; Albuquerque, L. B.; Vasconcelos, F. R. C.; Silva, A. C.; Teixeira, M.; Brito, E. S.; Santos, J. M. L. D.; Vieira, L. D. S.; Monteiro, J. P. Biological activity of cinnamaldehyde, citronellal, geraniol and anacardic acid on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 32, n. 2, e006023, 2023.
- Fumagali, E.; Gonçalves, R. A. C.; Machado, M. F. P. S.; Vidoti, G. J.; Oliveira, A. J. B. Production of Secondary Metabolites in Plant Cell and Tissue Culture:
- Furtado, S. K. Alternativas Fitoterápicas Para O Controle Da Verminose Ovina No Estado Do Paraná: Testes *In Vitro* E *In Vivo*. 2006. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- Gao, M.; Igata, H.; Takeuchi, A.; Sato, K.; Ikegaya, Y. Machine learning-based prediction of adverse drug effects: an example of seizure-inducing compounds. *J. Pharmacol. Sci.* 133, 70–78, 2017.
- Garcia, S. N.; Osburn, B. I.; Cullor J. S. A One Health Perspective on Dairy Production and Dairy Food Safety. *One Health*, v. 7, 2019.
- Garcia-Bustos, J.F.; Sleebs, B.E.; Gasser, R.B. An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. *Parasites Vectors*, 12, 1–22, 2019.
- Geary, N. Understanding synergy. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, v. 304, n. 3, p. E237–E253, 2013.

- Geary, T. G. Ivermectin 20 Years on: Maturation of a Wonder Drug. *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 530-532, 2005.
- Geary, T. G.; Sangster, N. C.; Thompson, D. P. Frontiers in Anthelmintic Pharmacology. *Veterinary Parasitology*, v. 84, p. 275-295, 1999.
- Gilleard, J. S. *Haemonchus contortus* as a Paradigm and Model to Study Anthelmintic Drug Resistance. *Parasitology*, v. 140, n. 12, p. 1506-1522, 2013.
- Gilleard, J. S. Understanding Anthelmintic Resistance: The Need for Genomics and Genetics. *International Journal for Parasitology*, v. 36, n. 12, p. 1227-1239, 2006.
- Gomes, D. S.; Negrão-Corrêa, D. A.; Miranda, G. S.; Rodrigues, J. G. M.; Guedes, T. J. F. L.; Lucca Junior, W.; Sá Filho, J. C. F.; Nizio, D.A.C.; Blank, A.F.; Feitosa, V.L.C.; Dolabella, S.S. *Lippia alba* and *Lippia gracilis* essential oils affect the viability and oviposition of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, v. 231, p. 106434, 2022.
- Greco, W. R.; Bravo, G.; Parsons, J. C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews*, v. 47, n. 2, p. 331-385, 1995.
- Grisi, L.; Leite, R. C.; Martins, J. R. S.; Barros, A. T. M.; Andreotti, R.; Cançado, P. H. D.; Léon, A. A. P.; Pereira, J. B.; Villela, H. S. Reassessment of the Potential Economic Impact of Cattle Parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Revista Estudos Avançados*. São Paulo, v.24, n.70, p.81-98, 2010.
- Hahnel, S. R.; Dilks, C. M.; Heisler, I.; Andersen, E. C.; Kulke, D. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research - Old model, new perspectives. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 14, 237-248, 2020.
- Hernando, G. & Bouzat, C. Drug combination assays using *Caenorhabditis elegans* as a model system. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 131, 107583, 2025.
- Hernando, G.; Turani, O.; Rodriguez Araujo, N.; Bouzat, C. The diverse family of Cys-loop receptors in *Caenorhabditis elegans*: insights from electrophysiological studies. *Biophysical Reviews*, v. 15, n. 4, p. 733-750, 2023.
- Hernando, G.; Turani, O.; Rodriguez Araujo, N.; Bouzat, C. Unraveling anthelmintic targets and mechanisms of action of trans-cinnamaldehyde from cinnamon essential oil. *Scientific Reports*, v. 15, p. 5422, 2025.
- Hoang, N. H.; Le Thanh, T.; Sangpueak, R.; Treekoon, J.; Saengchan, C.; Thepbandit, W.; Papatthoti, N. K.; Kamkaew, A.; Buensanteai, N. Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. *Polymers*, 14(4), 662, 2022.
- Hodgkin, J. *Caenorhabditis elegans*. In: BRENNER, S.; MILLER, J. H. Encyclopedia of Genetics. *Academic Press*, 2001. p. 251-256.
- Holden-Dye, L. & Walker, R. J. Anthelmintic Drugs and Nematicides: Studies in *Caenorhabditis elegans*. In: *WormBook*, 2014.
- Hood, J. J. D. Essential Oil of *Kunzea ambigua* and Methods of Use. *Australia Patent AU2008241370B2*, 26 June 2014.
- Hood, J. J. D. Essential Oil of *Kunzea ambigua* and Methods of Use. *European Patent EP2192912B1*, 1 June 2016.
- Ianevski, A.; Giri, A. K.; Aittokallio, T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Research*, v. 50, Web Server issue, p. W739-W743, 2022.
- Imming, P.; Sinning, C.; Meyer, A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Drug Discov.* 5, 821-834, 2006.

- Irwing, P. J. Companion Animal Parasitology: a Clinical Perspective. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 581-593, 2002.
- Jardim, I. N.; Oliveira, D. F.; Silva, G. H. (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. *Journal of Pest Science*, v. 91, p. 479–487, 2018.
- Jesus, I. L. R. Desenvolvimento de formulações farmacêuticas tópicas contendo eugenol e carvacrol para o controle de pulgas e carrapatos em animais de companhia. 2023. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Ji, J.; Lu, C.; Kang, Y.; Wang, G. X.; Chen, P. Screening of 42 medicinal plants for *in vivo* anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, v. 111, n. 1, p. 97–104, 2012.
- Katiki, L. M.; Barbieri, A. M. E.; Araujo, R. C.; Veríssimo, C. J.; Louvandini, H.; Ferreira, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, v. 243, p. 47–51, 2017.
- Katiki, L.; Evangelista, A.; Canova, E.; Piza, A.; Fornazari, B.; Araujo, R.; Louvandini, H.; Amarante, A.; Costa, R.; Bueno, M.; Lima, J.; Verissimo, C. Synergic interaction of aromatic compounds thymol and carvacrol against nematode *Planta Medica*, 80(P1L28), 2014.
- Keiser, J.; Panic, G.; Adelfio, R.; Cowan, N.; Vargas, M.; Scandale, I. Evaluation of an FDA Approved Library Against Laboratory Models of Human Intestinal Nematode Infections. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, 2016.
- Kenyon, F.; Dick, J.; Smith, R.I.; Coulter, D.G.; McBean, D.; Skuce, P.J. Reduction in Greenhouse Gas Emissions Associated with Worm Control in Lambs. *Agriculture* 2013, 3, 271–284.
- Kim, J. R.; Haribalan, P.; Son, B. K.; Ahn, Y. J. Fumigant toxicity of plant essential oils against *Camptomyia corticalis*. *Journal of Economic Entomology*, v. 105, n. 4, p. 1329–1334, 2012.
- Kong, J. O.; Park, I. K.; Choi, K. S.; Shin, S. C.; Ahn, Y. J. Nematicidal and propagation activities of thyme red and white oil compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology*, v. 39, n. 3, p. 237–242, 2007.
- Kotze, A. C. & Prichard, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. In: Gasser, R. B. & Von Samson Himmelstjerna, G. *Advances in Parasitology*. Academic Press, v. 93, 2016, p. 397–428.
- Kraithong, S.; Teerapattarakarn, N.; Balasubramanian, B.; Issara, U. Bioactive compounds in tea: Effect of imbalanced intake on digestive enzymes activity, cytochrome inhibition and drug interaction. *S. Afr. J. Bot.*, 150, 58–68, 2022.
- Kwa, M. S. G.; Veenstra, J. G.; Roos, M. H. Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus* is Correlated with a Conserved Mutation at Aminoacid 200 in β -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 63, n. 2, p. 299–303, 1994.
- Laing, R.; Doyle, S. R.; McIntyre, J.; Maitland, K.; Morrison, A.; Bartley, D. J.; Kaplan, R.; Chaudhry, U.; Sargison, N.; Tait, A.; Cotton, J. A.; Britton, C.; Devaney, E. Transcriptomic analyses implicate neuronal plasticity and chloride homeostasis in ivermectin resistance and response to treatment in a parasitic nematode. *PLoS pathogens*, 18(6), e1010545, 2022.
- Lam, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 2007, 15, 279–289.
- Lambert, M. M.; Chaves, D. S. A.; Avelar, B. R.; Campos, D. R.; Borges, D. A.; Moreira, L. O.; Pereira, G. A.; Cid, Y. P.; Scott, F. B.; Coumendouros, K. *In vitro* evaluation of the acaricidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) essential oil and eugenol against non-fed

larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 43, n. 1, 2021.

Lanusse, C. E.; Alvarez, L. A.; Sallovitz, J. M.; Mottier, M. L.; Bruni, S. F. S. Antinematodal Drugs. In: Riviere, J. M.; Papich, M. G. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9. ed: Wiley-Blackwell, 2009, p. 1053-1094.

Lawrence, J.D. & Ibarburu, M.A. Economic Analysis of Pharmaceutical Technologies in Modern Beef Production. In *Proceedings of the NCCC-134 Conference on Applied Commodity Price Analysis, Forecasting, and Market Risk Management*, Chicago, IL, USA, 16–17 April 2007.

Leathwick, D. M.; Hosking, B. C.; Bisset, S.A.; McKay, C.H. Managing anthelmintic resistance: is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? *N. Z. Vet. J.* 57, 181–192, 2009

Lee, D. & Choi, K. Comparison of regulatory frameworks of environmental risk assessments for human pharmaceuticals in EU, USA, and Canada. *Sci. Total Environ.* 671, 1026–1035, 2019.

Lee, S. Y., & Kang, K. Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, v. 128, n. 56437, 2017.

Lehár J.; Zimmermann, G. R.; Krueger, A. S.; Molnar, R. A.; Ledell, J. T.; Heilbut, A. M.; Short, G. F.; Giusti, L. C.; Nolan, G. P.; Magid, O. A.; Lee, M. S.; Borisy, A. A.; Stockwell, B. R.; Keith, C.T. Chemical combination effects predict connectivity in biological systems. *Molecular Systems Biology*, v. 3, n. 1, p. 80, 2007.

Lei, J.; Leser, M.; Enan, E. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, n. 7, p. 1062–1071, 2010.

Lerner, H. & Berg, C. The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health? *Infection Ecology & Epidemiology*, v. 5, p. 25300, 2015.

Lewis, J. A. & Fleming, J. T. Basic Culture Methods. *Methods in Cell Biology*, [s. l.], v. 48, p. 3-29, 1995.

Liebig, M.; Fernandez, A. A.; Blübaum-Gronau, E.; Boxall, A.; Brinke, M.; Carbonell, G.; Egeler, P.; Fenner, K.; Fernandez, C.; Fink, G.; Garric, J.; Halling-Sørensen, B.; Knacker, T.; Krogh, K.A.; Küster, A.; Löffler, D.; Cots, M. A. P.; Pope, L.; Prasse, C.; Römbke, J.; Rönnefahrt, I.; Schneider, M. K.; Schweitzer, N.; Tarazona, J.V.; Ternes, T.A.;

Traunspurger, W.; Wehrhan, A.; Duis, K. Environmental risk assessment of ivermectin: a case study. *Integr. Environ. Assess.* 6, 567–587, 2010.

Ling, F.; Jiang, C.; Liu, G.; Li, M.; Wang, G. Anthelmintic efficacy of cinnamaldehyde and cinnamic acid from cortex cinnamon essential oil against *Dactylogyrus intermedius*. *Parasitology*, v. 142, n. 14, p. 1744–1750, 2015.

Loewe, S. Über Kombinationswirkungen. *Arch für Exp Pathol*, v. 114, p. 313–326, 1926.

Loewe, S. Die Mischarznei. Versuch einer allgemeinen Pharmakologie der Arzneiombinationen. *Klin Wochenschrift*, v. 6, p. 1077–1084, 1927.

Loewe, S. Randbemerkungen zur quantitativen Pharmakologie der Kombinationen. *Arzneimittelforsch - Drug Res*, v. 9, p. 449–456, 1959.

Loewe, S. The problem of synergism and antagonisms of combined drugs. *Arzneimittelforsch - Drug Res*, v. 3, p. 285–290, 1953.

López, H. S. S. & Camberos, L. O. *Farmacología Veterinaria*. 3. ed.: McGraw-Hill, 2006. 1082 p.

López, V.; Cascella, M.; Benelli, G.; Maggi, F.; Gómez-Rincón, C. Green drugs in the fight against *Anisakis simplex*: larvicidal activity and acetylcholinesterase inhibition of *Origanum compactum* essential oil. *Parasitology Research*, v. 117, n. 3, p. 861–867, 2018.

- Lu, L.; Shu, C.; Chen, L.; Yang, Y.; Ma, S.; Zhu, K.; Shi, B. Insecticidal activity and mechanism of cinnamaldehyde in *Caenorhabditis elegans*. *Fitoterapia*, v. 146, p. 104687, 2020.
- Lubega, G. W.; Prichard, R. K. Interaction of Benzimidazole Anthelmintics With *Haemonchus contortus* Tubulin: Binding Affinity and Anthelmintic Efficacy. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 73, n. 3, p. 203-213, 1991.
- Lumaret, J. P.; Errouissi, F.; Floate, K.; Rombke, J.; Wardhaugh, K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* 13, 1004–1060, 2012.
- Marjanović, D. S.; Trailović, S.M.; Milovanović, M. Interaction of agonists of a different subtype of the nAChR and carvacrol with GABA in *Ascaris suum* somatic muscle contractions. *Journal of Nematology*, v. 53, p. e2021-22, 2021.
- Martin, O.; Scholze, M.; Ermler, S.; McPhie, J.; Bopp, S.K.; Kienzler, A.; Parissis, N.; Kortenkamp, A. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. *Environ. Int.*, 146, 106206, 2021.
- Medeiros, M. T.; Campos D. R.; de Assis, J. D.; de Oliveira, G. F.; Ferreira, T. P.; Teixeira de Jesus, A. C.; Correia, T. R.; Scott, F. B.; Cid, Y. P.; Coumendouros, K. Effects of combinations of the essential oils trans-anethole, thymol and carvacrol against larvae of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* in vitro. *Vet Parasitol*, Feb;334:110398, 2025.
- Medeiros, M. T.; Campos, D. R.; Soares, E. F. M. S.; Assis, J. D.; Oliveira, G. F.; Santos, L. O.; Silva, T. M. E.; Silva, M. P. D.; Cid, Y. P.; Scott, F. B.; Comendouros, K. Larvicidal activity in vitro of essential oils against *Cochliomyia hominivorax*. *Veterinary parasitology*, 322, 2023.
- Mederos, A. E.; Ramos, Z.; Banchero, G. E. First Report of Monepantel *Haemonchus contortus* Resistance on Sheep Farms in Uruguay. *Parasit Vectors*, v. 7, n. 98, 2014.
- Miranda, F. R.; Avelar, B. R.; de Jesus, I. L. R.; Guimarães, B. G.; Bonfim, I. V.; Alves, M. C. C.; Ferreira, T. P.; Azevedo, T. R. C.; Cid, Y. P.; Scott, F. B. Do combinations of fipronil, eugenol and carvacrol have synergistic effects against *Rhipicephalus sanguineus*? *Parasitol Res.* 2023 Dec 14;123(1):48.
- Miró, M. V.; Ichinose, P.; Lloberas, M.; Moriones, L.; Lanusse, C.; Virkel, G.; Lifschitz, A. Phytochemical-mediated modulation of doramectin pharmacology in sheep: exploring the cinnamaldehyde–pink grapefruit combination. *Animals*, v. 15, p. 2539, 2025.
- Moraes, J.; Carvalho, A. A.; Nakano, E.; Almeida, A. A.; Marques, T. H.; Andrade, L. N.; Freitas, R. M.; Sousa, D. P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, v. 112, n. 2, p. 603–610, 2013.
- Moraes, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Rev. Serv. Esp. Saúde Pública*, 1:507-624, 1948.
- Morshedloo, M. R.; Salami, S. A.; Nazeri, V.; Maggi, F.; Craker, L. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops and Products*, v. 119, p. 183–190, 2018.
- Nascimento, P. M. *Caenorhabditis elegans* como ferramenta para pesquisa de novos anti-helmínticos de uso veterinário. 2019. 96 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Novato, T. P.; Araújo, L. X.; Monteiro, C. M.; Maturano, R.; Senra, T. O.; Silva Matos, R.; Gomes, G. A.; Carvalho, M. G.; Daemon, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* and *Dermacentor nitens* larvae. *Veterinary Parasitology*, v. 212, n. 3-4, p. 331–335, 2015.

- Oliveira, L. M.; Chaves, D. S. A.; De Jesus, I. L. R.; Miranda, F. R.; Ferreira, T. P.; Silva, C. N. E.; Alves, N. De S.; Alves, M. C. C.; Avelar, B. R.; Scott, F. B.; Campos, D. R.; Cid, Y. P. Ocimum gratissimum essential oil and eugenol against *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*: *In vitro* activity and residual efficacy of a eugenol-based spray formulation. *Veterinary Parasitology*, v. 309, p. 109771, setembro 2022.
- Oliveira, N. R. A relevância da prescrição e do uso racional de medicamentos para mitigar potenciais riscos à saúde e ao meio ambiente. 2015. 108 p. Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica.
- O'Reilly, L. P.; Luke, C. J.; Perlmutter, D. H.; Silverman, G. A.; Pak, S. C. *C. elegans* in High-Throughput Drug Discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 69-70, p. 247-253, 2013.
- Park, I. K.; Shin, S. C.; Lee, S. G. Composition of Nematocides Comprising Plant Essential Oils. *KR100960871B1*. 03 Jun. 2010.
- Park, I.; Park, J.; Kim, K.; Choi, K.; Choi, I.; Kim, C.; Shin, S. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Nematology*, v. 7, n. 5, p. 767–774, 2005.
- Pharmacognosy*, v. 18, p. 627–641, 2008.
- Piña-Vázquez, D. M.; Mayoral-Peña, Z.; Gómez-Sánchez, M.; Salazar-Olivo, L. A.; Arellano-Carbajal, F. Anthelmintic Effect of *Psidium guajava* and *Tagetes erecta* on Wild-type and Levamisole-resistant *Caenorhabditis elegans* strains. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 202, p. 92-96, 2017.
- Prichard, R. How do Anthelmintic Drugs Work? *The Veterinary Journal*, v. 154, n. 1, p. 5-7, 1997.
- Prichard, R. K. Genetic Variability Following Selection of *Haemonchus contortus* with Anthelmintics. *Trends in Parasitology*, v. 11, n. 9, p. 445-453, 2001.
- Rajendran, L.; Glavin, J.; Hunter R.; Redman, E.; Stasiuk, S.; Schertzberg, M.; Mcquibban, G. A.; Caffrey, C. R.; Cutler, S. R.; Tyers, M.; Giaever, G.; Nislow, C.; Fraser, A. G.; Macrae, C. A.; Gilleard, J.; Roy, P. J. *Caenorhabditis elegans* is a Useful Model for Anthelmintic Discovery. *Nature Communications*, v. 6, n. 7485, p. 1-33, 2015.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. Farmacologia. 5. ed.: Elsevier, 2003. 904 p.
- Ren, G.; Ke, G.; Huang, R., Pu, Q.; Zhao, J.; Zheng, Q.; Yang, M. Study of the volatilization rules of volatile oil and the sustained-release effect of volatile oil solidified by porous starch. *Scientific reports*, 12(1), 8153, 2022.
- Robertson, A. P.; Bjorn, H. E.; Martin, R. J. Resistance to Levamisole Resolved at the Single-channel Level. *The FASEB Journal*, v. 13, n. 6, p. 749-760, 1999.
- Rodriguez-Vivas, R.I.; Jonsson, N.N.; Bhushan, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol. Res.* 2017, 117, 3–29.
- Ropiak, H. M.; Desrués, O.; Williams, A. R.; Ramsay, A.; Mueller-Harvey, I.; Thamsborg, S. M. Structure-activity relationship of condensed tannins and synergism with trans-cinnamaldehyde against *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 46, p. 8795–8805, 2016.
- Ruvkun, G. & Hobert, O. The Taxonomy of Developmental Control in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, v. 282, n. 5396, p. 2033-2041, 1998.
- Sangster, N. C.; Cowling, A.; Woodgate, R. G. Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research. *Trends in Parasitology*, v. 34, n. 7, p. 553-563, 2018.

- Sangwan, N. S.; Farooqui, A. H. A.; Shabih, F. Sangwan, R. S. Regulation of Essential Oil Production in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 3-21, 2001.
- Seo, D. J.; Nguyen, D. M.; Park, R. D.; Jung, W. J. Chitosan-cinnamon beads enhance suppressive activity against *Rhizoctonia solani* and *Meloidogyne incognita* *in vitro*. *Microbial Pathogenesis*, v. 66, p. 44–47, 2014.
- Sepúlveda-Crespo, D.; Reguera, R. M.; Rojo-Vázquez, F.; Balaña-Fouce, R.; Martínez-Valladares, M. Drug Discovery Technologies: *Caenorhabditis elegans* as a Model for Anthelmintic Therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, v. 40, n. 5, p. 1715-1753, 2020.
- Shanley, H. T.; Wang, T.; Taki, A. C.; Byrne, J. J.; Chang, B. C. H.; Sleebs, B. E.; Gasser, R.B. Advances in Anthelmintic Target Identification. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 3738, 2025.
- Shen, B. A new Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell*, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.
- Shetty, V.; Chellampillai, B.; Kaul-Ghanekar, R.. Development and validation of a bioanalytical HPLC method for simultaneous estimation of cinnamaldehyde and cinnamic acid in rat plasma: application for pharmacokinetic studies. *New Journal of Chemistry*, v. 44, p. 4346-4352, 2020.
- Shi, X.; Wu, Y.; Ni ,H.; Li, M.; Zhang, C.; Qi, B.; Wei, M.; Wang, T.; Xu, Y. Antibiotic-loaded calcium sulfate in clinical treatment of chronic osteomyelitis: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. Feb 19;17(1):104. 2022.
- Shoop, W & Soll, M. Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy. *Cabi*, 2002. 448p.
- Shoop, W.; Mrozik, H.; Fisher, M. H. Structure and Activity of Avermectins and Milbemycins in Animal Health. *Veterinary Parasitology*, v. 59, n. 2, p. 139-156, 1995.
- Silva, C. R.; Lifschitz, A. L.; Macedo, S. R. D.; Campos, N. R. C. L.; Viana-Filho, M.; Alcântara, A.C.S.; Araújo, J.G.; Alencar, L.M.R.; Costa-Junior, L.M. Combination of synthetic anthelmintics and monoterpenes: assessment of efficacy and ultrastructural and biophysical properties of *Haemonchus contortus* using atomic force microscopy. *Veterinary Parasitology*, v. 290, p. 109345, 2021.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P. Mentz, L. A. Pharmacognosy: From Plant to Medicine. Porto Alegre/Florianópolis, ed.
- SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Anuário Sindan 2025. Disponível em: <https://sindan.org.br/wp-content/uploads/2025/12/Anuario-Sindan-2025-FINAL.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2026.
- Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans*. In: *Wormbook*, 2006.
- Stojkovic, M.; Marjanovic, D. S.; Medic, D.; Charvet, C. L.; Trailovic, S.M. Neuromuscular system of nematodes is a target of synergistic pharmacological effects of carvacrol and geraniol. *Pharmaceuticals*, v. 18, p. 1232, 2025.
- Stossi, F.; Singh, P.K.; Safari, K.; Marini, M.; Labate, D.; Mancini, M.A. High throughput microscopy and single cell phenotypic image-based analysis in toxicology and drug discovery. *Biochem. Pharmacol*, 216, 115770, 2023.
- Stratton, C. F.; Newman, D. J.; Tan, D. S. Cheminformatic Comparison of Approved Drugs from Natural Product versus Synthetic Origins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 21, p. 4802-4807, 2015.
- Štrbac, F.; Krnjajic, S.; Maurelli, M. P.; Stojanovic, D.; Simin, N.; Orcic, D.; Ratajac, R.; Petrovic, K.; Knezevic, G.; Cringoli, G. A potential anthelmintic phytopharmacological source of *Origanum vulgare* (L.) essential oil against gastrointestinal nematodes of sheep. *Animals*, v. 13, p. 45, 2023.
- Sulston, J. E.; Schierenberg, E.; White, J. G.; Thomson, J. N. The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, v. 100, n. 1, p. 64-119, 1983.

- Sun, Y. U.; Liu, L. J.; Caffrey, C. R. Discovery of small molecules with anthelmintic potential in the Medicines for Malaria Venture's COVID and Global Health Priority Boxes using an infrared-based assay for *Caenorhabditis elegans* motility. *BMC research notes*, 18(1), 422, 2025.
- Tallarida R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes & cancer*, 2(11), 1003–1008, 2011.
- the Example of the Genera *Tabernaemontana* and *Aspidosperma*. *Brazilian Journal of*
- Thomford, N. E.; Senthebane, D. A.; Rowe A.; Munro, D.; Seele, P.; Maroyi, A.; Dzobo, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 1, n. 96, 2018.
- Trailović, S. M.; Marjanović, D. S.; Nedeljković Trailović, J.; Robertson, A. P.; Martin, R. J. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors: potential mechanism of antinematodal action. *Parasitology Research*, v. 114, n. 8, p. 3059–3068, 2015.
- Trailovic, S. M.; Rajkovic, M.; Marjanovic, D. S.; Neveu, C.; Charvet, C. L. Action of Carvacrol on *Parascaris* sp. and Antagonistic Effect on Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Pharmaceuticals*, 14(6), 505, 2021.
- UNEP. Nações precisam fechar enorme lacuna de emissões para que metas climáticas de Paris não desapareçam. UNEP, 24 out. 2023. Disponível em: <https://www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/comunicado-de-imprensa/nacoes-precisam-fechar-enorme-lacuna-de-emissoes-em#:~:text=Cali%2FNair%C3%B3bi%2C%2024%20de%20outubro,de%20Paris%20desaparecer%C3%A1%20dentro%20de>. Acesso em: 20 mar. 2025.
- University/UFRGS/Ed.UFSC, 2001, 833 p.
- Van Den Brom, R.; Moll, L.; Kappert, C.; Vellema, P. *Haemonchus contortus* Resistance to Monepantel in Sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 209, n. 3-4, p. 278-280, 2015.
- Vanegas, J. A. G.; Pacule, H. B.; Capitão, R. M.; Correia, C. R. D.; Terra, W. C.; Campos, V. P.; Oliveira, D.F. Methyl esters of (E)-cinnamic acid: activity against the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* and *in silico* interaction with histone deacetylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 70, n. 22, p. 6624–6633, 2022.
- Velan, A. & Hoda, M. In-silico comparison of inhibition of wild and drug-resistant *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype-1 by glycyrrhetic acid, thymol and albendazole interactions. *J Parasit Dis*, 45, 24–34, 2021.
- Vercruysse, J. & Claerebout, E. Treatment vs Non-treatment of Helminth Infections in Cattle: Defining the Threshold. *Veterinary Parasitology*, v. 98, p. 195-214, 2001.
- Verdú, J. R.; Cortez, V.; Rosa-García, R.; Ortiz, A. J.; García-Prieto, U.; Lumaret, J.P. Nontoxic effects of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, and garlic oil on dung beetles: a potential alternative to ecotoxic anthelmintics. *PLoS ONE*, v. 18, n. 12, e0295753, 2023.
- Viana, F. A. B. Fundamentos da Terapêutica Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 222 p.
- Viegas Jr., C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- Viveiros, C. T. Parasitoses Gastrointestinais em Bovinos na Ilha de S. Miguel, Açores Inquéritos de Exploração, Resultados Laboratoriais e Métodos de Controle. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Técnica de Lisboa- Faculdade de Medicina Veterinária.
- Vlot, A. H. C.; Aniceto, N.; Menden, M. P.; Ulrich-Merzenich, G.; Bender, A. Applying synergy metrics to combination screening data: agreements, disagreements and pitfalls. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 12, p. 2286–2298, 2019.

- Wagner H. & Ulrich-Merzenich, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, 97–110, 2009.
- Wang, S.; Liu, Y.; Cui, M.; Zou, X.; Pan, M.; Jiang, D.; Chang, T.; Xu, H.; Wu, D.; Chu, X. Cinnamaldehyde enhances the intervention effect of puerarin on stroke from the perspectives of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *European Journal of Pharmacology*, v. 1000, p. 177732, 2025.
- Williams, A. R.; Ramsay, A.; Hansen, T. V.; Ropiak, H. M.; Mejer, H.; Nejsun, P.; Mueller-Harvey, I.; Thamsborg, S. M. Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Scientific Reports*, v. 5, p. 14791, 2015.
- Xiaohui, W.; Xiao, H.; Gangzhong, S.; Huamei, L.; Yonghua, G.; Rui, H.; Bo, Z.; Haiyan, J. Pesticide for Controlling Nematodes. CN107372644B, 22 November 2019.
- Yadav, B. et al. Searching for drug synergy in complex dose–response landscapes using an interaction potency model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 13, p. 504–513, 2015.
- Yeon, J.; Kim, J.; Kim, D. Y.; Kim, H.; Kim, J.; Du, E. J.; Kang, K.; Lim, H. H.; Moon, D.; Kim, K. A sensory-motor neuron type mediates proprioceptive coordination of steering in *Caenorhabditis elegans* via two TRPC channels. *PLoS Biology*, v. 16, n. 6, e2004929, 2018.
- Zehetner, P.; Höferl, M.; Buchbauer, G. Essential oil components and cytochrome P450 enzymes: A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(4), 223–240, 2019.
- Zhang X.; Hu D.; Shi S.; Song J.; Tang H. Biological control application of *Artemisia scoparia*, biocontrol preparation of *Artemisia scoparia*, preparation method of biocontrol preparation and biological control method. CN117918388A, 26 Apr, 2024.
- Zuanazzi, J. A. S. & Mayorga, P. Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico. *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados brutos do teste de letalidade em adultos – Cepa selvagem (N2)

Óleo Essencial/ Componente Majoritário	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média (%)	DP
		Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade		
<i>O. vulgare</i>	0	140	1	0,7	174	6	3,4	2,1	1,9
	0,067	363	79	21,8	202	60	29,7	25,7	5,6
	0,238	287	84	29,3	229	98	42,8	36,0	9,6
	0,837	201	88	43,8	257	130	50,6	47,2	4,8
	2,949	266	132	49,6	275	169	61,5	55,5	8,4
	10,39	246	167	67,9	217	162	74,7	71,3	4,8
	36,608	262	233	88,9	464	413	89,0	89,0	0,1
	128,986	287	282	98,3	306	299	97,7	98,0	0,4
	454,476	192	192	100,0	185	185	100,0	100,0	0,0
	1601,329	234	234	100,0	234	234	100,0	100,0	0,0
	5642,2	208	208	100,0	218	218	100,0	100,0	0,0
Carvacrol	0	167	4	2,4	175	3	1,7	2,1	0,5
	0,067	101	33	32,7	61	8	13,1	22,9	13,8
	0,238	117	41	35,0	81	11	13,6	24,3	15,2
	0,837	100	40	40,0	102	15	14,7	27,4	17,9
	2,949	114	45	39,5	78	20	25,6	32,6	9,8
	10,39	86	40	46,5	67	12	17,9	32,2	20,2
	36,608	124	67	54,0	66	24	36,4	45,2	12,5
	128,986	64	42	65,6	82	81	98,8	82,2	23,4

	454,476	101	101	100,0	91	91	100,0	100,0	0,0
	1601,329	45	45	100,0	103	103	100,0	100,0	0,0
	5642,2	44	44	100,0	78	78	100,0	100,0	0,0
	0	103	1	1,0	103	1	1,0	1,0	0,0
	4,6	71	8	11,3	111	16	14,4	12,8	2,2
	7,78	56	16	28,6	121	20	16,5	22,6	8,5
	13,5	57	19	33,3	186	36	19,4	26,3	9,9
	22,23	45	10	22,2	71	21	29,6	25,9	5,2
<i>C. cassia</i>	37,57	14	4	28,6	136	34	25,0	26,8	2,5
	63,49	39	10	25,6	96	34	35,4	30,5	6,9
	107,3	70	22	31,4	86	37	43,0	37,2	8,2
	181,34	50	49	98,0	105	104	99,0	98,5	0,7
	306,48	63	63	100,0	133	133	100,0	100,0	0,0
	517,97	60	60	100,0	104	104	100,0	100,0	0,0
	0	149	29	19,5	115	12	10,4	14,9	6,4
	4,6	126	35	27,8	95	9	9,5	18,6	12,9
	7,78	156	68	43,6	151	19	12,6	28,1	21,9
	13,5	119	47	39,5	101	17	16,8	28,2	16,0
<i>Cinamaldeído</i>	22,23	94	27	28,7	94	27	28,7	28,7	0,0
	37,57	155	62	40,0	108	23	21,3	30,6	13,2
	63,49	119	43	36,1	100	30	30,0	33,1	4,3
	107,3	143	118	82,5	132	132	100,0	91,3	12,4
	181,34	172	172	100,0	144	144	100,0	100,0	0,0

306,48	154	154	100,0	157	157	100,0	100,0	0,0
517,97	122	122	100,0	107	107	100,0	100,0	0,0

APÊNDICE B – Dados brutos do teste de letalidade em adultos – Cepa resistente à ivermectina (DA1316)

Óleo Essencial/ Componente Majoritário	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média (%)	DP
		Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade		
<i>O. vulgare</i>	0	183	2	1,1	156	2	1,3	1,2	0,1
	0,067	133	31	23,3	200	42	21,0	22,2	1,6
	0,238	195	27	13,8	146	29	19,9	16,9	4,3
	0,837	176	57	32,4	189	59	31,2	31,8	0,8
	2,949	199	75	37,7	166	60	36,1	36,9	1,1
	10,39	201	101	50,2	174	96	55,2	52,7	3,5
	36,608	163	126	77,3	179	160	89,4	83,3	8,5
	128,986	214	214	100,0	205	205	100,0	100,0	0,0
	454,476	202	202	100,0	119	119	100,0	100,0	0,0
	1601,329	221	221	100,0	167	167	100,0	100,0	0,0
	5642,2	190	190	100,0	147	144	98,0	99,0	1,4
<i>C. cassia</i>	0	110	1	0,9	110	1	0,9	0,9	0,0
	4,6	69	6	8,7	128	5	3,9	6,3	3,4
	7,78	68	6	8,8	124	6	4,8	6,8	2,8
	13,5	148	19	12,8	152	10	6,6	9,7	4,4
	22,23	48	7	14,6	151	14	9,3	11,9	3,8
	37,57	97	15	15,5	140	19	13,6	14,5	1,3
	63,49	22	6	27,3	172	27	15,7	21,5	8,2
	107,3	98	24	24,5	96	39	40,6	32,6	11,4
	181,34	156	114	73,1	82	82	100,0	86,5	19,0
	306,48	55	55	100,0	136	136	100,0	100,0	0,0
	517,97	39	39	100,0	151	151	100,0	100,0	0,0

APÊNDICE C – Dados brutos do teste de letalidade em adultos – Cepa resistente ao albendazol (CB3474)

Óleo Essencial/ Componente Majoritário	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média (%)	DP
		Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade		
<i>O. vulgare</i>	0	171	2	1,2	228	5	2,2	1,7	0,7
	0,067	202	21	10,4	217	26	12,0	11,2	1,1
	0,238	164	19	11,6	194	28	14,4	13,0	2,0
	0,837	214	38	17,8	216	31	14,4	16,1	2,4
	2,949	197	32	16,2	215	41	19,1	17,7	2,0
	10,39	214	44	20,6	237	62	26,2	23,4	4,0
	36,608	194	50	25,8	210	63	30,0	27,9	3,0
	128,986	244	100	41,0	232	112	48,3	44,6	5,2
	454,476	181	168	92,8	234	200	85,5	89,1	5,2
	1601,329	188	188	100,0	212	212	100,0	100,0	0,0
	5642,2	193	193	100,0	189	189	100,0	100,0	0,0
<i>C. cassia</i>	0	110	1	0,9	110	1	0,9	0,9	0,0
	4,6	131	30	22,9	136	17	12,5	17,7	7,4
	7,78	136	36	26,5	137	19	13,9	20,2	8,9
	13,5	114	32	28,1	142	23	16,2	22,1	8,4
	22,23	115	36	31,3	152	23	15,1	23,2	11,4
	37,57	177	60	33,9	122	21	17,2	25,6	11,8
	63,49	91	36	39,6	117	21	17,9	28,8	15,3
	107,3	181	163	90,1	107	20	18,7	54,4	50,5
	181,34	147	147	100,0	100	80	80,0	90,0	14,1
	306,48	132	132	100,0	146	146	100,0	100,0	0,0
	517,97	136	136	100,0	135	135	100,0	100,0	0,0

APÊNDICE D – Dados brutos do teste de letalidade em adultos – Cepa resistente ao levamisol (CB211)

Óleo Essencial/ Componente Majoritário	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média (%)	DP
		Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade	Número Total de Nematoides	Número de Nematoides Mortos	% de Mortalidade		
<i>O. vulgare</i>	0	135	2	1,5	150	3	2,0	1,7	0,4
	0,067	120	13	10,8	128	13	10,2	10,5	0,5
	0,238	177	18	10,2	169	17	10,1	10,1	0,1
	0,837	159	26	16,4	126	21	16,7	16,5	0,2
	2,949	184	34	18,5	171	34	19,9	19,2	1,0
	10,39	157	42	26,8	139	42	30,2	28,5	2,4
	36,608	149	45	30,2	153	49	32,0	31,1	1,3
	128,986	148	42	28,4	148	46	31,1	29,7	1,9
	454,476	157	55	35,0	142	55	38,7	36,9	2,6
	1601,329	156	139	89,1	141	137	97,2	93,1	5,7
	5642,2	134	134	100,0	151	151	100,0	100,0	0,0
<i>C. cassia</i>	0	110	1	0,9	110	1	0,9	0,9	0,0
	4,6	101	32	31,7	211	43	20,4	26,0	8,0
	7,78	90	29	32,2	291	51	17,5	24,9	10,4
	13,5	82	35	42,7	143	29	20,3	31,5	15,8
	22,23	102	44	43,1	215	54	25,1	34,1	12,7
	37,57	83	39	47,0	303	86	28,4	37,7	13,2
	63,49	78	41	52,6	151	53	35,1	43,8	12,3
	107,3	106	50	47,2	138	70	50,7	48,9	2,5
	181,34	84	84	100,0	160	160	100,0	100,0	0,0
	306,48	149	149	100,0	83	83	100,0	100,0	0,0
	517,97	63	63	100,0	187	187	100,0	100,0	0,0

APÊNDICE E – Dados brutos do eclodibilidade de ovos – Cepa selvagem (N2)

Óleo Essencial/ Componente Majoritário	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D1			D2			Média (%)	DP
		Número Total de Ovos	Número de Ovos Não- eclodidos	% de Inibição	Número Total de Ovos	Número de Ovos Não- eclodidos	% de Inibição		
<i>O. vulgare</i>	0	100	2	2,0	101	3	3,0	2,5	0,7
	0,067	79	8	10,1	76	9	11,8	11,0	1,2
	0,238	82	9	11,0	97	18	18,6	14,8	5,4
	0,837	80	16	20,0	67	13	19,4	19,7	0,4
	2,949	89	18	20,2	91	22	24,2	22,2	2,8
	10,39	64	17	26,6	79	22	27,8	27,2	0,9
	36,608	57	19	33,3	59	23	39,0	36,2	4,0
	128,986	48	37	77,1	73	66	90,4	83,7	9,4
	454,476	81	81	100,0	112	112	100,0	100,0	0,0
	1601,329	86	86	100,0	124	124	100,0	100,0	0,0
	5642,2	81	81	100,0	89	89	100,0	100,0	0,0
Carvacrol	0	139	3	2,2	159	3	1,9	2,0	0,2
	0,067	272	87	32,0	119	40	33,6	32,8	1,2
	0,238	152	65	42,8	171	38	22,2	32,5	14,5
	0,837	216	45	20,8	225	73	32,4	26,6	8,2
	2,949	193	57	29,5	129	39	30,2	29,9	0,5
	10,39	156	60	38,5	146	53	36,3	37,4	1,5
	36,608	182	62	34,1	169	68	40,2	37,2	4,4
	128,986	150	59	39,3	155	84	54,2	46,8	10,5
	454,476	141	78	55,3	86	82	95,3	75,3	28,3
	1601,329	144	143	99,3	102	102	100,0	99,7	0,5
	5642,2	148	148	100,0	101	101	100,0	100,0	0,0

<i>C. cassia</i>	0	115	2	1,7	115	2	1,7	1,7	0,0
	4,6	211	45	21,3	111	24	21,6	21,5	0,2
	7,78	210	64	30,5	94	22	23,4	26,9	5,0
	13,5	224	179	79,9	68	26	38,2	59,1	29,5
	22,23	213	195	91,5	68	66	97,1	94,3	3,9
	37,57	203	189	93,1	69	68	98,6	95,8	3,9
	63,49	202	192	95,0	75	75	100,0	97,5	3,5
	107,3	213	208	97,7	54	54	100,0	98,8	1,7
	181,34	185	184	99,5	71	71	100,0	99,7	0,4
	306,48	203	202	99,5	61	61	100,0	99,8	0,3
	517,97	210	209	99,5	78	78	100,0	99,8	0,3
Cinamaldeído	0	105	3	2,9	93	2	2,2	2,5	0,5
	4,6	75	46	61,3	96	61	63,5	62,4	1,6
	7,78	91	61	67,0	106	68	64,2	65,6	2,0
	13,5	99	77	77,8	120	82	68,3	73,1	6,7
	22,23	109	86	78,9	100	79	79,0	78,9	0,1
	37,57	92	78	84,8	116	99	85,3	85,1	0,4
	63,49	97	85	87,6	84	73	86,9	87,3	0,5
	107,3	115	109	94,8	96	86	89,6	92,2	3,7
	181,34	101	98	97,0	110	103	93,6	95,3	2,4
	306,48	91	90	98,9	125	123	98,4	98,7	0,4
	517,97	90	90	100,0	97	97	100,0	100,0	0,0