



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

JULIANA RIVAS FIGUEREDO PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO *POUR ON* DA
ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* var
amara L. COM IVERMECTINA PARA O CONTROLE DE
NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS**

São Luís
2025

JULIANA RIVAS FIGUEREDO PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO *POUR ON* DA
ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* var
amara L. COM IVERMECTINA PARA O CONTROLE DE
NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dauana Mesquita Sousa

São Luís

2015

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Figueredo Pereira, Juliana Rivas.

Desenvolvimento de uma formulação pour on da associação do óleo essencial de Citrus aurantium var amara L. com ivermectina para o controle de nematódeos gastrointestinais. / Juliana Rivas Figueredo Pereira. - 2025.

41 f.

Coorientador(a) 1: Dauna Mesquita Sousa.

Orientador(a): Livio Martins Costa Junior.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. Produtos Naturais. 2. Combinação de Compostos. 3. Helmintoses Em Bovinos. I. Costa Junior, Livio Martins. II. Mesquita Sousa, Dauna. III. Título.

JULIANA RIVAS FIGUEREDO PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO *POUR ON* DA
ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* var
amara L. COM IVERMECTINA PARA O CONTROLE DE
NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências daSaúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior (Orientador) Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador (Rafael Cardoso Carvalho) Universidade Federal do Maranhão

2º Examinador (Caio Pavão Tavares) Universidade Federal do Maranhão

3º Examinador (Hermes Ribeiro Luz) Universidade Federal do Maranhão

“O segredo da ciência está na descoberta de novos caminhos”.

Autora: Marie Cure

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha mais profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Lívio Martins Costa Junior, por sua orientação, paciência e dedicação ao longo de todo o processo deste trabalho. Sua sabedoria e comprometimento foram fundamentais para cada etapa deste estudo. Agradeço também à minha coordenadora, Profa. Dra. Dauana Mesquita Sousa, por seu apoio e pela confiança que sempre depositou em mim, auxiliando-me em cada fase deste percurso. Menção aos familiares e amigos.

Aos meus familiares, agradeço pelo amor, compreensão e suporte incondicional, que me deram a base necessária para enfrentar todos os desafios.

Quero estender minha gratidão às minhas amigas Rayssa e Ruth, que estiveram ao meu lado desde o início, oferecendo suporte que foi essencial para minha jornada. Agradeço também ao Rafael, por toda a ajuda em campo, e à Safira, que, mesmo tendo se juntado ao trabalho mais recentemente, contribuiu de forma significativa. Expresso minha gratidão à Ellen, cuja ajuda e carinho me motivaram a cada etapa desse processo. A todos vocês, minha sincera gratidão por acreditarem em mim e por tornarem possível a realização deste trabalho. Por fim, gostaria de expressar minha sincera gratidão à equipe da fazenda onde o estudo foi conduzido, pelo apoio e dedicação durante todo o experimento. O compromisso e a disponibilidade de todos foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço, ainda, à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro, que foi essencial para a realização deste estudo. Minha gratidão também à Universidade Federal do Maranhão (UFMA), instituição que proporcionou a estrutura e os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho, bem como à sua equipe docente e técnica pelo suporte ao longo do meu percurso acadêmico.

RESUMO

Os nematódeos gastrintestinais (NGI) afetam significativamente a economia pecuária ao comprometer a saúde dos bovinos, sendo tradicionalmente controlados com anti-helmínticos sintéticos. No entanto, o uso indiscriminado desses fármacos tem levado ao aumento da resistência parasitária, tornando necessário o desenvolvimento de novas estratégias para otimizar sua eficácia. O óleo essencial de *Citrus aurantium* var. amara (OECa) pode apresentar efeito sinérgico contra parasitos e favorecer a permeação transdérmica de fármacos. Assim, este estudo avaliou a eficácia anti-helmíntica da combinação do OECa com ivermectina (IVM), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contra NGI de bovinos naturalmente infectados. O estudo incluiu a análise do OECa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A atividade anti-helmíntica foi avaliada *in vitro* por meio do teste de desenvolvimento larval (TDL), expondo larvas L₁ a diferentes concentrações do óleo, da ivermectina e da combinação de ambos. Para os testes *in vivo*, foi desenvolvida uma formulação *pour-on* contendo óleo essencial e ivermectina, utilizando óleo vegetal de girassol como excipiente. A estabilidade da formulação foi avaliada em diferentes temperaturas. Por fim, a eficácia anti-helmíntica foi analisada em bovinos naturalmente infectados, por meio do teste de redução da contagem de ovos fecais (RCOF). As análises estatísticas foram realizadas com cálculo de médias e desvio padrão. A análise química identificou o limoneno (59,94%) e a carvona (4,93%) como os principais constituintes do óleo. O ensaio *in vitro* de TDL revelou que o OECa apresentou uma IC₅₀ (concentração inibitória média) de $0,554 \pm 0,006$ mg/mL, enquanto a ivermectina isolada teve uma IC₅₀ de $2,432 \pm 0,053$ ng/mL. A combinação dos compostos demonstrou sinergismo, com um *Synergy Score* (SS) de 14,71 e um *Combination Sensitivity Score* (CSS) de 65,58. Uma formulação *pour-on* da combinação do OECa com IVM foi desenvolvida utilizando óleo vegetal de girassol como excipiente, mantendo-se estável por três meses sob diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C e 37 °C), sem separação de fases ou degradação, e com pH constante (5,0). No bioensaio *in vivo*, a formulação contendo a associação do OECa com IVM reduziu a excreção de ovos nas fezes em 40,60%. Contudo, ao avaliar os diferentes gêneros de nematódeos, observou-se que o OECa isolado foi altamente eficaz contra *Haemonchus spp.* (93%, IC 95%: 90–96), enquanto a combinação com ivermectina resultou em uma redução de 88% (IC 95%: 84–93). Para *Cooperia spp.*, a combinação apresentou menor eficácia (20% IC 95%: 14–27) em comparação à ivermectina isolada (40% IC 95%: 29–51). Da mesma forma, contra *Oesophagostomum spp.*, a combinação teve efeito modesto (9% IC 95%: 6–11), enquanto a IVM isolada foi mais eficaz (51% IC 95%: 48–55). Os resultados indicam que o OECa apresenta atividade anti-helmíntica promissora, especialmente contra *Haemonchus spp.*, e pode atuar sinérgicamente com a ivermectina. No entanto, sua eficácia *in vivo* contra outros gêneros foi limitada. Pesquisas adicionais são necessárias para otimizar futuras formulações e explorar seu potencial na terapia anti-helmíntica.

Palavras-chave: Produtos naturais; Combinação de compostos; Helmintoses em bovinos.

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes (GIN) significantly impact the livestock economy by compromising cattle health and are traditionally controlled with synthetic anthelmintics. However, the indiscriminate use of these drugs has led to increased parasite resistance, making it necessary to develop new strategies to optimize their efficacy. The essential oil of *Citrus aurantium* var. amara (OECa) may have a synergistic effect against parasites and enhance the transdermal permeation of drugs. Thus, this study evaluated the anthelmintic efficacy of the combination of OECa with ivermectin (IVM), both *in vitro* and *in vivo*, against GIN in naturally infected cattle. The study included the analysis of OECa by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Anthelmintic activity was evaluated *in vitro* using the larval development test (LDT), exposing L1 larvae to different concentrations of the oil, ivermectin, and their combination. For the *in vivo* tests, a pour-on formulation containing essential oil and ivermectin was developed, using vegetable sunflower oil as an excipient. The formulation's stability was assessed at different temperatures. Finally, anthelmintic efficacy was analyzed in naturally infected cattle through the fecal egg count reduction test (FECRT). Statistical analyses were performed by calculating means and standard deviations. Chemical analysis identified limonene (59.94%) and carvone (4.93%) as the main constituents of the oil. The *in vitro* LDT assay showed that OECa had a median inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.554 ± 0.006 mg/mL, while ivermectin alone had an IC₅₀ of 2.432 ± 0.053 ng/mL. The combination of the compounds demonstrated synergy, with a Synergy Score (SS) of 14.71 and a Combination Sensitivity Score (CSS) of 65.58. A pour-on formulation combining OECa with IVM was developed using vegetable sunflower oil as an excipient, remaining stable for three months at different temperatures (5 °C, 25 °C, and 37 °C), without phase separation or degradation, and with a constant pH (5.0). In the *in vivo* bioassay, the formulation containing the combination of OECa and IVM reduced egg excretion in feces by 40.60%. However, when evaluating different nematode genera, OECa alone was highly effective against *Haemonchus* spp. (93%, 95% CI: 90–96), while its combination with ivermectin resulted in an 88% reduction (95% CI: 84–93). For *Cooperia* spp., the combination showed lower efficacy (20%, 95% CI: 14–27) compared to ivermectin alone (40%, 95% CI: 29–51). Similarly, against *Oesophagostomum* spp., the combination had a modest effect (9%, 95% CI: 6–11), while IVM alone was more effective (51%, 95% CI: 48–55). The results indicate that OECa has promising anthelmintic activity, especially against *Haemonchus* spp., and may act synergistically with ivermectin. However, its *in vivo* efficacy against other genera was limited. Further research is needed to optimize future formulations and explore its potential in anthelmintic therapy.

Key-words: Natural products; Compound combination; Helminthiasis in cattle.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CSS	Combination Sensitivity Score
GS-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
HSA	Highent Single Agente
IC50	Concentração inibitória média
IC95	Intervalo de confiança de 95%
IVM	Ivermectina
L1	Larva de primeiro estágio
L3	Larva de terceiro estágio
LIC	Limite inferior de confiança
LSC	Limite superior e confiança
NaCl	Cloreto de sódio
NGI	Nematódeos gastrointestinais
OECa	Óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i> var amara
OEs	Óleos essenciais
RA	Resistência anti-helmíntica
RCOF	Redução da contagem de ovos fecais
SS	Syrnergy Score
TDL	Teste de Desenvolvimento Larvar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *Citrus aurantium* var. amara.....27

Tabela 2 - A média e o desvio padrão das concentrações de inibição necessárias para atingir 50% (IC₅₀) do desenvolvimento larval de *H. contortus in vitro*, com respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%).....28

Tabela 3 - Porcentagem de RCOF (IC 95% inferior e superior) para diferentes espécies de nematódeos gastrintestinais tratados com ivermectina (IVM), óleo essencial de *C. aurantium* var. amara (OECa) e a combinação de OECa com IVM *in vivo*.....31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem ilustrativa do ciclo de vida dos nematódeos gastrointestinais em bovinos.....15
- Figura 2** - Aplicação de produtos pelo método *pour-on*.....17
- Figura 3** - Frutos de *Citrus aurantium* var. amara (laranja amarga) na planta, caracterizados por sua casca enrugada e cor vibrante.....20
- Figura 4** - Mapa de calor com pontuações de sinergismo da combinação do OEca com IVM de acordo com o modelo matemático HSA. A cor vermelha indica sinergismo e a verde antagonismo.....29
- Figura 5** - Tubos do tipo Falcon contendo 1° mL da formulação. 1 – Armazenado a 5°C. 2 - Armazenado a 25°C. Armazenado a 37°C.....30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS	14
2.2 ANTI-HELMÍNTICOS COMERCIAIS	15
2.3 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA.....	17
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	18
2.5 ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM SINTÉTICOS	20
3 OBJETIVO.....	22
3.1 GERAL.....	22
3.2 ESPECÍFICOS	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 ANÁLISE QUÍMICA.....	23
4.2 TESTE <i>IN VITRO</i>	23
4.2.1 <i>Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL)</i>	24
4.2.2 <i>Combinação de doses</i>	24
4.3 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE	25
4.4 TESTE <i>IN VIVO</i>	25
5 RESULTADOS	25
5.1 ANÁLISE QUÍMICA.....	27
5.2 TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR (TDL)	28
5.3 TESTE DE ESTABILIDADE	29
5.4 TESTE <i>IN VIVO</i>	30
6 DISCUSSÃO.....	32
7 CONCLUSÃO.....	35
8 REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

As infecções por nematoides gastrointestinais (NGI) em ruminantes são responsáveis por perdas econômicas significativas na produção pecuária, levando à redução do ganho de peso, diminuição da produção de leite e, em casos graves, morte animal (Craig, 2018; Charlier *et al.*, 2020). O controle dessas infecções tradicionalmente depende do uso de anti-helmínticos sintéticos (Herath *et al.*, 2021). No entanto, o uso contínuo desses compostos levou à seleção de indivíduos resistentes em várias regiões do mundo (Kaplan, 2020; Soutello *et al.*, 2007). Esse cenário ressalta a necessidade urgente de explorar estratégias que aumentem a eficácia dos anti-helmínticos disponíveis, como a ivermectina (IVM).

A administração transcutânea usando formulações *pour on* é amplamente empregada devido à sua praticidade e à redução do estresse e lesões aos animais durante a aplicação (Leathwick *et al.*, 2013; Laffont *et al.*, 2001). No entanto, esse método pode não garantir exposição prolongada ao ingrediente ativo, comprometendo a eficácia no controle de parasitas adultos (Leathwick *et al.*, 2021). Portanto, incorporar compostos naturais com atividade anti-helmíntica e propriedades de aumento da absorção pela pele em formulações *pour on* representa uma abordagem promissora.

Óleos essenciais (OEs) derivados de plantas ganharam atenção por seu potencial farmacológico e pela diversidade de compostos bioativos (Sharifi-Rad *et al.*, 2017). Um exemplo notável é OE de *Citrus aurantium* var. amara L. (laranja amarga), obtido da casca da fruta, um subproduto que constitui aproximadamente 50% do volume total da fruta (Vukic *et al.*, 2023). Este óleo exibe propriedades bioativas, incluindo eficácia anti-helmíntica contra diferentes estágios de desenvolvimento de NGI (Garbin *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2018).

Entre os principais compostos do OE de *C. aurantium* var. amara, o limoneno se destaca devido à sua atividade anti-helmíntica *in vitro* (Katiki *et al.*, 2017). Além disso, o limoneno pode alterar o arranjo lipídico do estrato córneo, aumentando a permeabilidade da pele e facilitando a administração transdérmica de medicamentos (Yang *et al.*, 2020).

A combinação de IVM com OEs, como *C. aurantium* var. amara (OECa), oferece uma estratégia potencial para o gerenciamento de NGI resistente, empregando diferentes mecanismos de ação (Ali-Shtayeh *et al.*, 2019). O potencial do limoneno como um intensificador de absorção transdérmica pode melhorar a eficácia das formulações *pour on*, proporcionando um tratamento mais eficaz e seguro para ruminantes (Hennessy, 1997; Leathwick *et al.*, 2013).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS (NGI)

Os NGI são um grupo de vermes parasitos que infectam o trato gastrointestinal de seres humanos e animais. Eles pertencem ao Filo Nematoda e incluem várias espécies que podem causar doenças em seus hospedeiros (Craig, 2018). Em relação ao gado, esses parasitos representam uma ameaça considerável para os ruminantes, uma vez que as pastagens, que compõem a maior parte de sua alimentação, acabam servindo como um veículo de transmissão para os NGI (Rashid *et al.*, 2018)

Os gêneros mais frequentemente encontrado em bovinos são *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., e *Trichostrongylus* spp. no (abomaso); *Cooperia* spp, e *Nematodirus* spp. no (intestino delgado); *Oesophagostomum* spp. (intestino grosso) (Charlier *et al.*, 2020).

A maioria dos NGI de bovinos têm um ciclo de vida direto (Figura 1). Os ovos são eliminados nas fezes e se desenvolvem com mudas sucessivas desde a larva de primeiro estágio (L1) até o terceiro estágio infeccioso (L3), com as condições de temperatura e umidade ideais. As L3 que tem como característica a presença de uma bainha para suprir condições adversas, migram das fezes para a forragem. Após a ingestão por um hospedeiro adequado, a L3 sai da bainha no rúmen e o desenvolvimento posterior ocorre na mucosa do abomaso ou no intestino, dependendo da espécie. Após 2 mudas adicionais, os adultos emergem na superfície da mucosa, cerca de 3 semanas após a infecção. Depois do acasalamento, a fêmea libera os ovos, reiniciando o ciclo (Charlier *et al.*, 2020).

Os sintomas clínicos são caracterizados principalmente por diarreia, pelagem opaca, anorexia e perda da condição corporal (Zajac *et al.*, 2020). A transmissão de NGI para humanos não é amplamente documentada, sendo relatada, de forma mais consistente, para pequenos ruminantes, especialmente em infecções causadas por *Trichostrongylus* spp. Esses casos são geralmente isolados e observados com maior frequência em comunidades pastorais, onde há maior exposição ao ambiente contaminado (Bhat *et al.*, 2023). Embora a maioria das infecções seja assintomática, em situações específicas, larvas de quarto estágio (L4) e formas adultas podem causar inflamação na mucosa intestinal e dano tecidual. Em infecções com elevada carga parasitária, também há relatos de evolução para eosinofilia e anemia (Flay *et al.*, 2022).

Além das implicações de saúde e bem-estar animal, os NGI afetam negativamente a economia. O Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina, e as perdas anuais estimadas

na produção de carne bovina devido a esses parasitos é de 7,11 bilhões de reais (Grisi *et al.*, 2014). Paralelo a isso, conforme a população mundial cresce e renda se eleva nos próximos dez anos, é previsto um aumento de aproximadamente 14% no consumo de carne até 2030 (Strydom *et al.*, 2023). Ademais, a produção de carne deve aumentar em torno de 5,9% para atender uma parcela da crescente procura por carne (OCDE-FAO, 2021). Com isto, medidas devem ser implementadas para mitigar o impacto do parasitismo na saúde pública.

2.2 ANTI-HELMÍNTICOS COMERCIAIS

Os anti-helmínticos sintéticos são os medicamentos mais utilizados no controle de parasitos gastrointestinais e que ainda apresentam eficácia adequada (Calvete *et al.*, 2020). As classes utilizadas para este fim são benzimidazóis, imidazotiazóis, lactonas macrocíclicas, e salicilanilidas, contendo alvos únicos no parasito (Herath, *et al.*, 2021).

Os benzimidazóis atuam interrompendo o desenvolvimento dos ovos dos parasitos ao bloquear a produção de tubulinas, proteínas essenciais para a divisão celular e obtenção de energia (Son *et al.*, 2020). Entre os princípios ativos dessa classe, destacam-se o albendazol e o tiabendazol, amplamente utilizados no controle de infestações parasitárias (Janke *et al.*, 2020). Outro grupo de compostos, os imidazotiazóis, age de forma diferente: como bloqueadores neuromusculares despolarizantes, esses compostos se conectam aos receptores nicotínicos de acetilcolina, intensificando sua atividade e resultando em uma superdespolarização das membranas. Isso provoca contrações repetidas nos parasitos, levando-os, eventualmente, à morte; o levamisol é o principal composto dessa classe (Fascio *et al.*, 2015; Shetty *et al.*, 2010). As salicilanilidas, por sua vez, exercem seu efeito antiparasitário interferindo nas reações mitocondriais que participam do transporte de elétrons nos nematódeos, reduzindo a produção de ATP. Essa interferência energética é acompanhada por uma paralisia espástica rápida, causada pelo aumento da concentração de íons de cálcio nas células musculares dos parasitos (Swan *et al.*, 1999). Um exemplo bem conhecido desta classe é o closantel, que possui efeito marcante sobre parasitos de grande impacto econômico (Bushra *et al.*, 2019).

O grupo das lactonas macrocíclicas é representado pelas avermectinas e milbemicinas, e tem como principal meio de ação nos tecidos do trato digestivo e na abertura dos canais de cloro mediados por glutamato (Moreno et al., 2021). Dentro da classe das avermectinas, se destaca a ivermectina, que foi descoberta em 1970, a partir do isolamento de produtos de fermentação de *Streptomyces avermitilis* que consiste em uma mistura de dois homólogos, 22,23-dihidro-ivermectina B1a (80%) e 22, 23-di-hidro- ivermectina B1b (20%) (Errecalde et al, 2021). O seu mecanismo de ação se baseia no bloqueio da condução de impulsos nervosos, utilizando canais iônicos regulados por glutamato ou ácido *g*-aminobutírico. Este efeito causa a paralisia e morte do nematódeo, inibindo sua alimentação, motilidade e reprodução (Martin et al., 2021).

Nas últimas décadas, várias vias de administrações foram projetadas para a aplicação da ivermectina, como soluções injetáveis, comprimidos, pastas orais, soluções orais e formulações *pour on* (Xu et al., 2020). As formulações *pour on* limitam o risco de ferimentos ao usuário e ao animal, além de ter um modo de aplicação mais prático (Figura 2) (Canga et al., 2009). Geralmente, a aplicação é realizada em um único ponto (daí o nome “pour-on”), mas, em alguns casos, podem ser necessários vários pontos para garantir uma distribuição adequada sobre o animal ou para alcançar a dosagem ideal (Lavy et al., 2022). Alguns medicamentos permanecem temporariamente no pelo e na camada de sebo dos animais, sendo posteriormente absorvidos e formando um depósito na derme. A partir desse depósito, o medicamento é liberado gradualmente, proporcionando uma liberação prolongada (Lavy et al., 2022).

Dessa forma, assim como ocorre com qualquer agente terapêutico administrado a animais produtores de alimentos, a presença de resíduos de ivermectina nos tecidos animais representa uma questão de significativa relevância, pois envolve a segurança dos consumidores de produtos de origem animal (Pawar et al., 2021). O caráter altamente lipofílico da ivermectina, e as diferentes proporções de gordura nos músculos, podem ser a razão para a distribuição irregular dos resíduos (Suvarna et al., 2023).

O conteúdo de gordura no músculo também é afetado pela idade, espécie, raça, nutrição e manejo animal, e assim, a quantidade de resíduos que podem ser encontrados pode variar dependendo dessas circunstâncias (Moreno *et al.*, 2007). Em bovinos, a taxa de eliminação da ivermectina apresentou variações, com uma meia-vida média de 7,6 dias para a gordura e 4,8 dias para o fígado. Portanto, a meia-vida da ivermectina em bovinos pode variar, mas geralmente é longa, permitindo que o medicamento persista nos tecidos por um período prolongado (Chiu *et al.*, 1986).

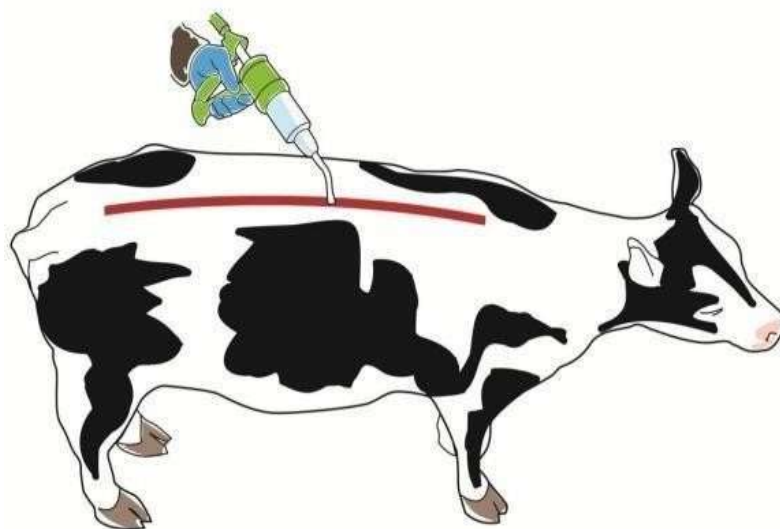


Figura 2. Aplicação de produtos pelo método *pour-on*. (Wormer administration 2014).

2.3 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

O uso frequente e aplicações irregulares de compostos anti-helmínticos, selecionou indivíduos resistentes (Potârniche *et al.*, 2021). A resistência anti-helmíntica (RA) se caracteriza, como, uma perda hereditária da sensibilidade do anti-helmíntico em uma população que anteriormente era suscetível (Fissiha, Kinde, 2021). O progresso da RA ocorre quando os parasitos sobreviventes ao tratamento, transmitem seus genes ligados à resistência aos seus descendentes (Sangster *et al.*, 2018). O resultado de numerosos estudos científicos aponta, em níveis variáveis, um aumento da resistência dos helmintos contra os conhecidos grupos de anti-helmínticos (Mickiewicz *et al.*, 2021).

A resistência a anti-helmínticos individuais, como a IVM, está incluída na resistência as lactonas macrocíclicas. Com o relato de que os alvos do tratamento como os canais de cloreto

controlado por ligantes (GluCIRs) tenham sofrido mutações nos genes responsáveis pela codificação de suas proteínas (Kotze *et al.*, 2014). As mutações em GluCIRs foram investigadas em amostras de *Haemonchus contortus* que mostraram resistência à ivermectina e à moxidectina, um alelo de um gene da subunidade GluCla sendo identificado com maior frequência (Kenealy, 2019). Isso sugere que uma mutação neste gene específico pode estar associada à resistência ao grupo das lactonas macrocíclicas (Kotze *et al.*, 2014).

Além disso, há relatos de resistência nas proteínas denominadas de P-gp, que funcionam como transportadores de membrana presentes em muitos organismos incluindo nematódeos. Essas proteínas desempenham o papel de eliminação de toxinas e moléculas hidrofóbicas como ivermectina e outras drogas através do mecanismo de bomba de efluxo celular (Lespine *et al.*, 2024). A resistência à IVM associada à Pgps também foi relatada em *H. contortus*. De forma mais consistente, a PGP-2 foi identificada como estando ligada à resistência à IVM (Reyes-Guerero *et al.*, 2020).

A administração de dose incorreta e inadequada de anti-helmíntico é um dos principais fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de RA (Fissiha, Kinde, 2021). Uma das formas de administração como as formulações *pour on*, que surgiu como uma forma prática de aplicação, têm sido associadas a baixa disponibilidade plasmática e concentrações subterapêuticas em bovinos (Lekimme *et al.*, 2010). Por sua vez, essa subdosagem permite a sobrevivência de vermes heterozigotos resistentes e, portanto, contribui para a seleção de cepas resistentes (Riaz *et al.*, 2024).

Porém, apesar de ser preferível a administração da IVM por via subcutânea, as suas propriedades físico-químicas e comportamento farmacocinético, devido à sua natureza altamente lipofílica, diminui sua absorção gastrointestinal e estabilidade (Leathwick *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2020). Dessa forma, é um fármaco que apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, incentivando a investigação de novas estratégias para melhorar o desempenho das formas farmacêuticas para aplicações veterinárias e humanas (Patel *et al.*, 2018).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os Oes têm sido frequentemente utilizados na prática popular ao longo da história. Se caracterizam por ser líquidos oleosos que são extraídos de várias partes das plantas (folhas, sementes, madeiras, cascas, raízes, flores, frutos e rizomas) (Aumeeruddy-Eralfi *et al.*, 2018). Os principais constituintes dos OEs podem ser categorizados de acordo com o número de hidrocarbonetos, sendo eles: terpenóides, sesquiterpenos, diterpeno e fenilpropanóides

(Stephane *et al.*, 2020). Se destacam por apresentarem diferentes tipos de atividades biológicas incluindo antibacteriana, antifúngica, anticancerígena e, também, anti-helmíntica (Álvarez-Martínez *et al.*, 2021; Rashed *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2018).

A espécie *Citrus aurantium* var *amara* L. (família Rutaceae) também conhecida popularmente como a laranja amarga (Figura 3), é uma das culturas mais antigas e comercializadas (Panwar *et al.*, 2021). Suas origens ainda são bastantes debatidas, mas acredita-se que tenha se originado no sudeste da Ásia (Dozoky, Setzer, 2018). É abundante em substâncias bioativas, incluindo fenólicos, flavonoides e terpenoides, sendo bastante utilizada para fins terapêuticos (Maksoud *et al.*, 2021). Outra variedade dessa espécie, *Citrus aurantium* var. *dulcis*, possui como principal componente do óleo essencial o limoneno, que demonstrou eficiência *in vitro* na inibição da eclosão de ovos de *H. contortus*, indicando potencial anti-helmíntico (Mesquita-Sousa *et al.*, 2023).

O Brasil lidera o ranking mundial de exportação de frutas cítricas processadas, com mais de 18 milhões de toneladas (Neves *et al.*, 2020). Essa produção em massa, acaba gerando muitos resíduos como cascas e sementes, o que pode ocasionar problemas ambientais (Mohsin *et al.*, 2022). Mas os resíduos, possuem oportunidades de aproveitamento, principalmente a casca, pois é a principal fonte de extração de óleo essencial (Andrade *et al.*, 2023).

A extração do OE da casca da laranja pode ser realizada de várias maneiras, incluindo destilação a vapor, destilação por arraste de vapor, extração com solventes e extração por CO₂ supercrítico (Giwa *et al.*, 2018). Na destilação a vapor a casca da laranja é aquecida com vapor d'água, permitindo que o OE seja liberado. O vapor contendo o OE é então resfriado e condensado, resultando na separação do OE da água (Del Carmen Razola-Díaz *et al.*, 2021). Dessa forma, é um óleo de fácil obtenção, o que facilita para ser trabalhado em novas formulações.



Figura 3. Frutos de *Citrus aurantium* var. amara (laranja amarga) na planta, caracterizados por sua casca enrugada e cor vibrante (Klaus Rudloff, 2011).

2.5 ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM SINTÉTICOS

Devido às grandes dificuldades associadas ao desenvolvimento de novas moléculas anti-helmínticas, a otimização dos compostos existentes tem tido uma alta prioridade para pesquisas na área. Dessa forma, a combinação de compostos sintéticos com OEs pode combater as implicações negativas das grandes doses efetivas, como a seleção de cepas resistentes (Chopra *et al.*, 2021). Os compostos, quando combinados, interagem de forma diferente, gerando efeitos classificados como sinérgicos e antagônicos. As interações sinérgicas aumentam a atividade do fármaco, reforçando o efeito um do outro e afetando o organismo alvo com mais eficiência (Adrar *et al.*, 2016).

Em ruminantes, as combinações anti-helmínticas podem ser usadas para retardar o desenvolvimento da resistência, para controlar espécies específicas limitantes de dose (Rehborg *et al.*, 2023). A lógica por trás do uso de combinações de drogas é que a formulação com diferentes substâncias pode reduzir a probabilidade de que vermes individuais desenvolvam resistência, tornando o tratamento mais eficaz (cada produto químico com um modo de ação/resistência diferente) em comparação com o observado quando uma única molécula anti-helmíntica é usada (Zajíčková *et al.*, 2020).

Além disso, vermes adultos resistentes quando expostos à combinação de IVM + limoneno, principal componente do OECA, apresentou menor expressão de proteínas de transporte de transmembranas (PgP) que livra as células de moléculas tóxicas, supondo que o limoneno pode modular esses genes (Pacheco *et al.*, 2022).

Apesar de as formulações *pour-on* serem projetadas para a administração transdérmica de fármacos, a degradação no local da aplicação, a biotransformação cutânea e a ligação da IVM ao pelo e/ou sebo são fatores que provavelmente contribuem para sua biodisponibilidade relativamente menor (Gokbolut *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o OE_{Ca} atua como um intensificador transdérmico, facilitando a absorção do fármaco (Santos; Gonzatto 2023). Esse efeito ocorre devido à interação do OE com os lipídios do estrato córneo, promovendo alterações na solubilidade dessas estruturas e aumentando a partição da droga para camadas mais profundas da pele. Como consequência, há um potencial aumento da biodisponibilidade sistêmica, favorecendo a eficácia do tratamento. Além disso, uma absorção mais eficiente pode contribuir para um efeito biológico mais prolongado, reduzindo a necessidade de doses elevadas e minimizando impactos ambientais associados à persistência do fármaco no ambiente (De Matos *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia da formulação *pour on* contendo a associação do óleo essencial de *Citrus aurantium* var. amara com ivermectina em bovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrointestinais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a composição química do óleo essencial de *C. aurantium* var. amara por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);
- Avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* do óleo essencial de *C. aurantium* var. amara e da ivermectina, individualmente e em combinação, contra *Haemonchus contortus* por meio do teste de desenvolvimento larvar (TDL);
- Verificar a estabilidade da formulação *pour on* da associação do óleo essencial de *C. aurantium* var amara com ivermectina;
- Avaliar *in vivo* a eficácia da formulação *pour on* da associação do óleo essencial de *C. aurantium* var amara com ivermectina;
- Identificar os gêneros de nematódeos presentes nos bovinos tratados, por meio da obtenção e análise de larvas de terceiro estágio (L₃), após o tratamento com a formulação da combinação do óleo essencial de *C. aurantium* var. amara e ivermectina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE QUÍMICA

O óleo de *Citrus aurantium* var amara foi adquirido da Ferquima Ind. e Com. Ltda. (Vargem Grande, São Paulo). O seu grau de pureza foi avaliado em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) em sistema Shimadzu QP 2010 ultra, com a injeção de 1 µL de solução 3:500 de óleo em hexano (Auto injetor AOC-20i), foi utilizado uma coluna capilar de sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno revestido com 5%- difenil/95%-dimetil-polisiloxano (0,25 µm de espessura do filme). A temperatura do forno do CG foi programa de 60 °C a 240 °C (10 min) a 3 °C/min, as temperaturas do injetor (split 1:20), linha de transferência e câmara de ionização foram de 250, 250 e 200 °C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV com scans automáticos (varredura) na faixa de 35 a 400 daltons a 0,30 scans/s. A identificação dos componentes foi baseada no tempo e índice de retenção linear (série de n-alcanos C8-C40), na interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas Adams 2006, Nist 2011 e FFNSC 2 (Adams, 2017).

4.2 TESTE *IN VITRO*

O uso de animais para fins de doação e infecções experimentais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Maranhão, Brasil (Protocolo nº 23115.002637/2023-43).

O ensaio *in vitro* foi realizado utilizando *Haemonchus contortus* como modelo para nematódeos parasitas de ruminantes. A cepa de *H. contortus* foi isolada a partir de vermes adultos coletados de abomasos de cabras em matadouros no Maranhão, Brasil. Os vermes foram macerados e misturados com fezes de cabras não infectadas (Silva et al., 2020). Ensaios anteriores de eclosão de ovos *in vitro* confirmaram resistência aos benzimidazóis.

Três cordeiros mestiços da raça Santa Inês foram infectados oralmente com 2.000 larvas de terceiro estágio (L₃). Fezes frescas desses animais foram utilizadas para o teste de desenvolvimento larval.

4.2.1 Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL)

O teste de desenvolvimento larvar foi realizado conforme descrito por Demeler *et al.* (2010). Os ovos de *H. contortus* foram coletados de animais artificialmente infectados. Fezes frescas foram maceradas e processadas através de uma série de peneiras (500 µm, 105 µm, 55 µm e 25 µm), retraindo os ovos na malha de menor tamanho. Em seguida, os ovos foram suspensos em solução salina saturada e lavados com água destilada.

Uma suspensão contendo 100 µL de ovos foi adicionada a cada poço de uma placa de 96 poços, que foi incubada a 27 °C e 80% de umidade relativa em uma câmara B.O.D. Após 24 horas, foi adicionado um meio de cultura [LC1], composto por uma mistura 2:2:1 de levedura/extrato de Earle, anfotericina B (0,5 mg/mL) e *Escherichia coli* K12 liofilizada (3,8 mg/mL, suspensa em água destilada estéril). O meio continha 12 concentrações do OECa (variando de 10 a 0,005 mg/mL), diluído em 1% de DMSO. Todas as concentrações foram testadas em triplicata.

A IVM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada em concentrações variando de 100 a 0,04 ng/mL. As placas foram incubadas por mais cinco dias a 27 °C e 80% de umidade relativa na câmara B.O.D.

A proporção de larvas L₁ e L₃ foi determinada por meio de um microscópio invertido. Os dados foram transformados logaritmicamente, normalizados e analisados por regressão não linear para estimar a concentração inibitória média (IC₅₀), utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Inc., San Diego, EUA)

4.2.2 Combinação de doses

Os valores de IC₅₀ para OECa (0,554 mg/mL) e para a IVM (2,432 µM) foram determinados conforme descrito anteriormente. Com base nesses valores, foram preparadas 10 doses (três acima e seis abaixo da IC₅₀) por meio de diluições seriadas.

As doses utilizadas para o OECa foram: 0,009, 0,017, 0,035, 0,069, 0,139, 0,278, 0,555, 1,11, 2,22 e 4,44 mg/mL. Para a ivermectina, as doses foram: 0,038, 0,076, 0,152, 0,304, 0,608, 1,217, 2,432, 1,866 e 0,732 ng/mL. Essas doses foram combinadas para criar uma matriz de 10 concentrações, incluindo um controle com 1% de DMSO.

O efeito da combinação foi avaliado pelo modelo *Highest Single Agent* (HSA), que prevê o efeito combinado com base no agente individual mais eficaz na dose utilizada. Escores de sinergia (*Synergy Scores* – SS) superiores a 5 indicaram forte sinergismo, enquanto escores inferiores a 5 indicaram antagonismo.

O *Combination Sensitivity Score* (CSS) foi calculado com base na área sob as curvas dose-resposta $\log_{10}$ IC₅₀ (Malyutina *et al.*, 2019). Todos os cálculos foram realizados utilizando o software SynergyFinder Plus (Zheng *et al.*, 2022).

4.3 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE

O OECa é classificado como de baixo risco de fototoxicidade e, quando testado em uma concentração de 10%, não causou irritação ou sensibilização em 25 voluntários humanos. Além disso, os principais compostos presentes no óleo pertencem à categoria de toxicidade grau III, com DL₅₀ entre 500 mg/kg e 5000 mg/kg (Dosoky e Setzer, 2018).

Foi preparada uma formulação *pour on* (100 mL) contendo 5 g do OECa e 0,5 g de IVM. O óleo de girassol, escolhido por não apresentar atividade anti-helmíntica, foi utilizado como excipiente principal para completar o volume da formulação para 100 mL.

A formulação foi submetida a um estudo de estabilidade acelerada conforme as diretrizes da ANVISA (2004). Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 1 hora para avaliação da estabilidade macroscópica, sendo a separação de fases classificada em quatro categorias: (1) ausência de separação de fases, (2) leve separação de fases, (3) 50% de separação de fases e (4) mais de 50% de separação de fases, conforme os critérios de LABA (1993).

Em seguida, as amostras foram armazenadas em tubos de centrífuga de 15 mL sob três condições: temperatura ambiente (20–25 °C), refrigeração (3–8 °C) e incubação em câmara (40 ± 2 °C). As avaliações de aparência, cor, odor, pH e viscosidade foram realizadas após 24 horas, 30 dias e 90 dias, com análise de três amostras por condição.

4.4 TESTE *IN VIVO*

O ensaio *in vivo* foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA-UFMA, Protocolo nº 23115.002630/2023-21) e conduzido em uma fazenda de gado na Amazônia brasileira (-4,31, -46,23) durante a estação seca. O estudo utilizou bovinos da raça Nelore, naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais (NGI) e sem nenhum tratamento prévio. Os animais eram machos, com idade entre 10 e 12 meses e peso médio de 267 kg.

Para a avaliação da eficácia dos tratamentos, foi realizado um teste padronizado de redução da contagem de ovos fecais (RCOF), conforme descrito por Coles *et al.* (2006). No dia 0, os bovinos foram pesados e amostras fecais foram coletadas direto da ampola retal para agrupamento dos animais com base no peso e na contagem de ovos fecais, utilizando a técnica de McMaster modificada (Paras *et al.*, 2018). Para a contagem de ovos, 4 g de fezes foram macerados com 25 mL de cloreto de sódio saturado (NaCl) com densidade específica superior a 1,2. A solução resultante foi utilizada para preencher duas câmaras de McMaster distintas, permitindo a contagem de ovos em até três quadrantes. Esse método tem sensibilidade de 16 ovos por grama de fezes (OPG).

Além disso, foi realizada cultura fecal para identificação das larvas de terceiro estágio (L₃), seguindo a metodologia de Roberts e O'Sullivan (1950), com a identificação do gênero dos nematódeos baseada nos critérios descritos por Van Wyk e Mayhew (2013).

Os animais foram divididos em três grupos (n = 28 por grupo). Grupo 1: Tratado com a formulação *pour on* contendo OECa e IVM (1 mL por 10 kg de peso corporal, fornecendo 50 mg/kg de OECa e 5 mg/kg de IVM). Grupo 2: Tratado com a formulação contendo apenas OECa (1 mL por 10 g de peso corporal). Grupo 3: Tratado com a formulação contendo apenas IVM (1 mL por 10 kg de peso corporal). Os animais tratados foram separados para evitar contaminação cruzada por lambedura. Reações adversas na pele ou outros sinais clínicos foram monitorados nas primeiras duas horas após o tratamento e diariamente no final do estudo. No dia 15, amostras fecais foram coletadas e a contagem de ovos fecais e a cultura fecal também foram realizadas. Os dados *in vivo* foram expressos como médias ou médias $\pm$ desvios-padrão. O RCOF (%) foi calculado usando a fórmula: $RCOF (\%) = 100 \times (1 - T2/T1)$, onde T2 é o EPG médio 15 dias após o tratamento e T1 é o EPG médio no dia 0. Os cálculos foram realizados usando a plataforma shiny-eggCounts, que fornece uma interface web intuitiva para analisar dados de contagem de ovos fecais com base no pacote R eggCounts. A plataforma permite a modelagem de resistência e eficácia anti-helmíntica usando dados de nível individual. A metodologia segue a abordagem descrita por Wang *et al.* (2018).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUÍMICA

A composição química do OECA está apresentada na Tabela 1. A análise por GC-MS identificou o limoneno como o constituinte principal, correspondendo a 59,94% do óleo, seguido pela carvona, com 4,93%. Outros compostos, com média de 0,51%, foram identificados em baixas porcentagens (<4%).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Citrus aurantium* var. amara

Composto	RI ^a	Área %
a-pineno	5.827	0.49
Sabineno	6.906	0.20
b-pineno	7.024	0.35
Mirceno	7.382	0.09
Octanal <n->	7.733	0.03
Limoneno	8.729	59.94
Para-cimeno	10.854	0.08
Linalol	11.232	0.04
trans-para Mentha-2,8-dien-1-ol	12.072	0.84
Limona ketone	12.494	0.08
cis-oxido limoneno	12.788	3.04
Cis-para-mentha-2,8-dien1-ol	14.698	0.57
Trans-oxide-limoneno	12.788	3.04
Acetofenona	14.698	0.10
Trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	14.853	0.27
Alpha-terpineol	14.990	0.06
Octanol acetate	15.881	0.08
Carveol trans	16.190	3.15
Menta-1(7),8-dien-2-ol<cis-p>	16.553	0.14
Carveol cis	16.681	0.99
Carvone	17.245	4.93
Linalol acetate	17.733	0.19
Carvone oxide<cis>	18.133	0.31
Perilla aldehyde	18.526	0.23
Carvone oxide<trans>	18.704	0.49
Limonen-10-ol	19.220	0.06
Perilla alcohol	19.589	0.40
NI	-	19,81
		100

NI – Compostos não identificados. RI^a – Índice de retenção linear

5.2 TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR (TDL)

O OECa demonstrou eficácia *in vitro*, com um IC_{50} de $0,554 \pm 0,006$ mg/mL no TDL (Tabela 2). A IC_{50} média para a IVM foi de $2,432 \pm 0,053$ ng/mL (Tabela 2). A eficácia da combinação do OECa com a IVM também foi avaliada utilizando o TDL. Os mapas de sinergia e os escores de sensibilidade estão apresentados na Figura 1.

A combinação do OECa com a IVM apresentou sinergismo, com um *Synergy Score* (SS) de 14,71 e um *Combination Sensitivity Score* (CSS) de 65,58. Concentrações sinérgicas (em vermelho) foram observadas predominantemente em doses do OECa a partir de 0,304 mg, especialmente em combinação com concentrações de IVM entre 0,152 mg e 2,433 mg. Por outro lado, interações antagônicas (em verde) foram identificadas em doses mais baixas de OECa (0 a 0,152 mg), combinadas com ivermectina em diversas concentrações, incluindo 2,433 mg e acima.

Tabela 2. A média e o desvio padrão das concentrações de inibição necessárias para atingir 50% (IC_{50}) do desenvolvimento larval de *H. contortus in vitro*, com respectivos intervalos de confiança de 95% ($IC_{95\%}$).

Composto	$IC_{50} \pm SD$	$IC_{95\%}$	R^2
<i>C. aurantium var amara</i>	$0,554 \pm 0,006$ mg/mL	0,515-0,597	0,99
Ivermectina	$2,432 \pm 0,053$ ng/mL	2,174-2,731	0,96

R^2 = coeficiente de regressão. O valor de R^2 quantifica a qualidade do ajuste não-linear da curva de regressão realizada para estimar a IC_{50} .

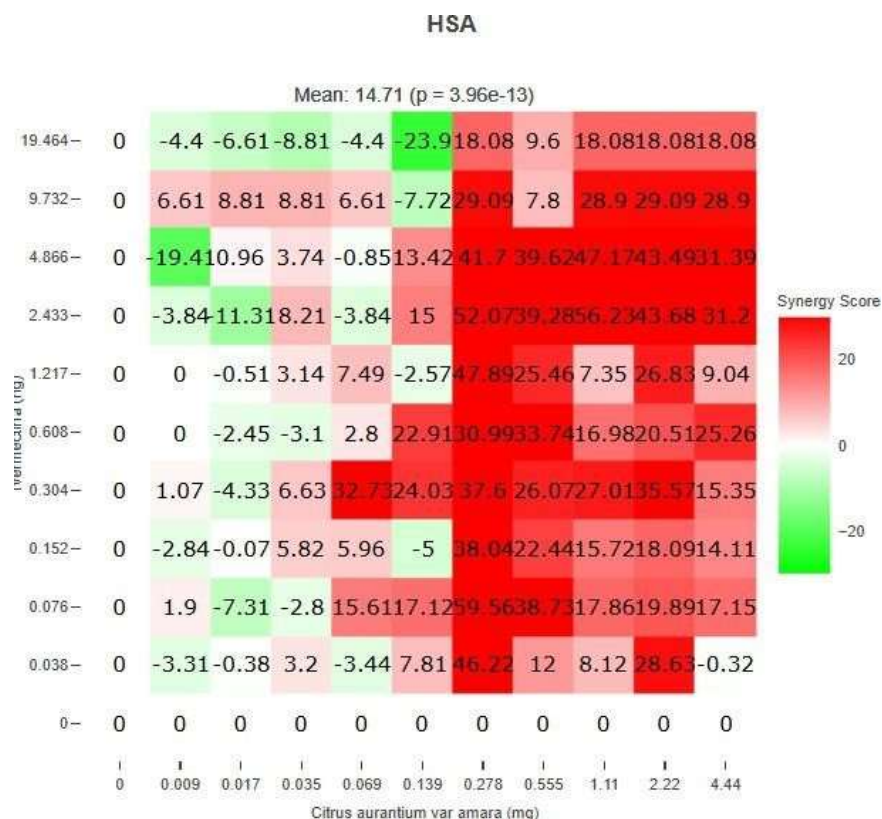


Figura 4. Mapa de calor com pontuações de sinergismo da combinação do OEca com IVM de acordo com o modelo matemático HSA. A cor vermelha indica sinergismo e a verde antagonismo.

5.3 TESTE DE ESTABILIDADE

Todas as formulações mantiveram uma aparência homogênea, caracterizada por um líquido claro e de cor amarelo-claro, com um odor distinto de laranja. A textura permaneceu oleosa e ligeiramente viscosa, sem separação de fases ou cristalização observadas. Não foram detectados sinais de degradação ou instabilidade sob diferentes condições de armazenamento (5 °C, 25 °C e 37 °C) ao longo de um período de 3 meses. O pH das formulações foi consistentemente mantido em 5,0. Após centrifugação, não foi observada separação de fases.

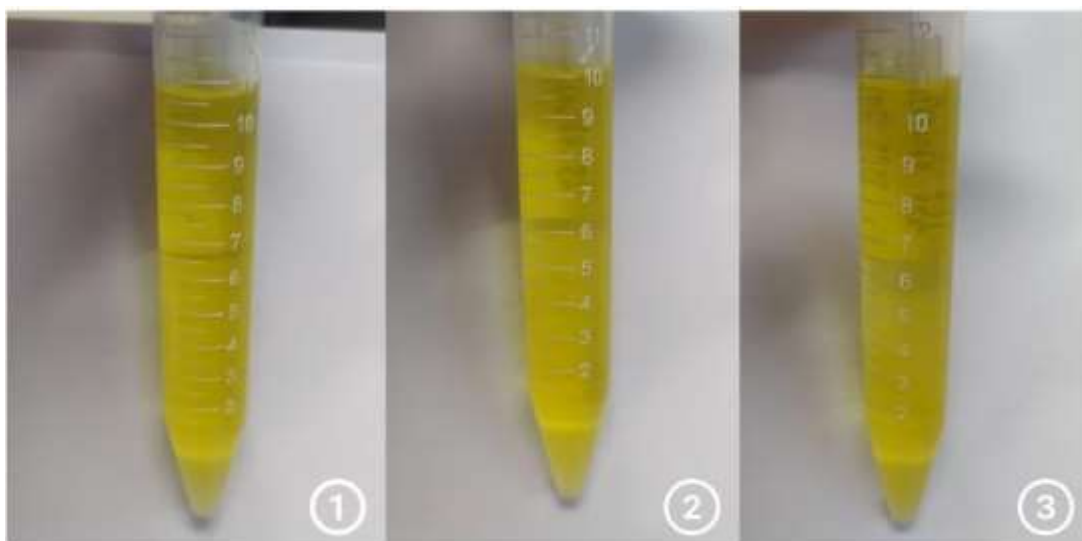


Figura 5. Tubos do tipo Falcon contendo 1° mL da formulação. 1 – Armazenado a 5°C. 2 – Armazenado a 25°C. Armazenado a 37°C.

5.4 TESTE IN VIVO

A Tabela 3 apresenta a porcentagem de RCOF para diferentes espécies de nematoides gastrointestinais tratadas com ivermectina, óleo essencial de *Citrus aurantium* var. *amara* e a combinação desses compostos. Para *Haemonchus* spp., o tratamento com OECa isolado (G2) resultou na maior redução da carga parasitária (93%, IC 95%: 90–96), seguido pela combinação de OECa e IVM (G1), que mostrou um RCOF de 88% (IC 95%: 84–93). Em contraste, o grupo tratado com IVM isolado (G3) mostrou um aumento relativo na carga parasitária, com um RCOF negativo de -44% (IC 95%: -46 a -42).

Para *Cooperia* spp., o grupo tratado com a combinação (G1) apresentou uma redução de 20% (IC 95%: 14–27). O tratamento com OECa isolado (G2) resultou em um aumento na carga parasitária (-16%, IC 95%: -31 a -2), enquanto IVM isolado (G3) levou a uma redução de 40% (IC 95%: 29–51). Quanto a *Oesophagostomum* spp., a combinação (G1) reduziu a carga parasitária em 9% (IC 95%: 6–11), enquanto OECa isolado (G2) levou a um aumento relativo na contagem de ovos (-19%, IC 95%: -20 a -17). Por outro lado, IVM isolado (G3) foi a estratégia mais eficaz, com uma redução de 51% (IC 95%: 48–55).

Por fim, considerando a redução geral da carga parasitária sem especificação de espécie (redução não especificada de RCOF), a combinação (G1) resultou em uma redução de 40% (IC 95%: 30–49). O tratamento com OECa isolado (G2) teve um efeito quase nulo (0,7%, IC 95%: 0,2–1), enquanto IVM isolado (G3) levou a uma redução de 33% (IC 95%: 22–42).

Tabela 3. Porcentagem de RCOF (IC 95% inferior e superior) para diferentes espécies de nematódeos gastrintestinais tratados com ivermectina (IVM), óleo essencial de *C. aurantium* var. *amara* (OECa) e a combinação de OECa com IVM in vivo.

Espécies de nematódeos	G1	G2	G3
<i>Haemonchus spp.</i>	88% (84 – 93)	93% (90 – 96)	-44% (-46 – -42)
<i>Cooperia spp.</i>	20% (14 – 27)	-16% (-31 – -2)	40% (29 - 51)
<i>Oesophagostomum spp.</i>	9% (6 – 11)	-19% (-20 – -17)	51% (48 - 55)
Redução de RCOF não especificada	40% (30 – 49)	0,7% (0,2 – 1)	33 (22 – 42)

G1 – Associação. G2 – OECa. G3 – IVM.

6. DISCUSSÃO

O limoneno é um terpeno presente em óleos essenciais de diversas plantas, sendo predominante nas cascas de frutas cítricas como laranja e limão (Anandakumar et al., 2020). Esse composto destaca-se por suas múltiplas bioatividades, incluindo ação inseticida e antiparasitária (Moungthipmalai et al., 2023; Moreno et al., 2018). No OECa, o limoneno corresponde a 59,94%, sendo o constituinte majoritário.

Apesar de sua ampla distribuição e bioatividade, o limoneno apresenta baixa eficácia na inibição da eclosão de ovos e na redução da motilidade larval de *Haemonchus contortus* (Katiki et al., 2014; Bortoluzzi et al., 2021).

No entanto, o OECa demonstrou potencial na inibição do desenvolvimento larvar, com um IC₅₀ de 0,55 mg/mL. De maneira semelhante, o óleo essencial de *Citrus sinensis*, composto por 96,0% de limoneno, também apresentou atividade, com IC₅₀ de 0,97 mg/mL. Esses resultados sugerem que a atuação do limoneno está associada ao comprometimento do desenvolvimento larvar de nematódeos (Gainza et al., 2015).

Diante de um possível mecanismo de ação do limoneno, a combinação de um óleo essencial com um fármaco amplamente utilizado, mas que apresenta altas taxas de resistência, pode representar uma estratégia promissora (Lanusse et al., 2018). Nesse contexto, a associação do óleo essencial de *C. aurantium* var. *amara* (OECa) com ivermectina (IVM) demonstrou efeito sinérgico em determinadas concentrações. A análise detalhada das doses revelou que o sinergismo ocorre quando OECa é administrado a partir de 0,304 mg, em combinação com IVM em concentrações entre 0,152 mg e 2,433 mg. Em contrapartida, interações antagônicas foram observadas em doses mais baixas de OECa (0 a 0,152 mg), quando combinadas com diferentes concentrações de ivermectina, incluindo as mais elevadas.

A interação sinérgica observada entre concentrações mais elevadas de OECa e diferentes doses de IVM pode estar relacionada a diversos fatores. O limoneno, principal componente desse óleo essencial, pode potencializar a ação da ivermectina ao modular proteínas de transporte associadas à resistência parasitária (Pacheco et al., 2022). Esse efeito pode aumentar a permeabilidade celular ou inibir mecanismos de defesa dos parasitas, tornando-os mais suscetíveis à ação do fármaco. Além disso, a administração de limoneno (200 mg/kg/dia) em associação com IVM em cordeiros infectados por *H. contortus* reduziu em 96,29% a eliminação de ovos nas fezes (Katiki et al., 2023), reforçando o potencial dessa combinação no controle da infecção.

A escolha da administração *pour-on* baseou-se na sua praticidade e segurança, minimizando estresse e risco de ferimentos nos animais (Santos e Gonzatto, 2013). No entanto, a biodisponibilidade de drogas em formulações *pour-on* pode ser limitada (Leathwick *et al.*, 2016). A ivermectina é uma substância lipofílica, diluindo muito bem em óleo. Assim, a formulação foi preparada apenas com a o OE de laranja e OE de girassol como principal excipiente. O produto manteve estável no período de 3 meses sob diferentes tipos de condições de armazenamento. Além disso, permaneceu dentro da faixa de pH considerada normal para a pele, não sendo observada nenhuma alteração significativa nas propriedades organolépticas iniciais.

Na avaliação *in vivo* do produto, os resultados obtidos demonstram diferenças na eficácia dos tratamentos contra os principais gêneros de nematódeos gastrointestinais em bovinos. Para *Haemonchus* spp., o OECa isolado (G2) foi o tratamento mais eficaz, reduzindo a carga parasitária em 93% (IC 95%: 90–96). Esse achado sugere uma atividade antiparasitária promissora do OECa contra essa espécie, possivelmente devido à presença de compostos bioativos como o limoneno com ação larvívora. O comportamento hematófago de *Haemonchus* spp. contribuiu para sua maior suscetibilidade aos tratamentos testados neste estudo.

Em contraste, a IVM isolada (G3) mostrou aumento relativo da carga parasitária (-44%, IC 95%: -46 a -42), possivelmente refletindo resistência pré-existente dos *Haemonchus* spp. à IVM (Felippelli *et al.*, 2014). Embora não seja o gênero mais prevalente no rebanho, *Haemonchus* spp. pode causar surtos letais devido ao seu comportamento hematófago, levando a anemia, hipoproteïnemia, perda excessiva de ferro, edema submandibular, anorexia e lesões na mucosa abomasal (Lopes *et al.*, 2017).

Além de sua relevância no gado, *Haemonchus* spp. serve como um modelo importante para outros hospedeiros, particularmente pequenos ruminantes, onde *Haemonchus contortus* é a espécie mais prevalente e patogênica (Besier *et al.*, 2016). A alta suscetibilidade de *Haemonchus* spp. para tratamento neste estudo alinha-se com descobertas em ovelhas, onde comportamento alimentar hematófago semelhante torna *H. contortus* um dos alvos primários de intervenções anti-helmínticas. Portanto, a eficácia do OECa na redução da contagem de ovos fecais de *Haemonchus* spp. sugere potencial aplicabilidade cruzada para ovelhas e cabras, apoiando ainda mais a necessidade de tratamentos alternativos para controlar nematoides gastrointestinais em várias espécies de gado.

Para *Cooperia spp.*, a IVM isolada (G3) apresentou a maior eficácia (40%, IC 95%: 29–51), enquanto a combinação com OECa (G1) mostrou redução de apenas 20% (IC 95%: 14–27). O OECa isolado (G2) resultou em aumento da carga parasitária (-16%, IC 95%: -31 a -2), indicando ausência de atividade significativa contra esse gênero ou possível interferência do OECa na biodisponibilidade da IVM. No caso de *Oesophagostomum spp.*, a IVM isolada (G3) teve a maior eficiência (51%, IC 95%: 48–55), enquanto a combinação (G1) apresentou redução menor (9%, IC 95%: 6–11). O OECa isolado (G2) levou a aumento na carga parasitária (-19%, IC 95%: -20 a -17), reforçando a falta de atividade contra esse gênero.

Na redução da contagem de ovos sem especificação de gênero, a combinação OECa+IVM foi mais eficaz que a IVM isolada, mas sem diferença estatisticamente significativa quando comparada ao OECa isolado. Esses resultados indicam que, embora o OECa sozinho não possa ser considerado um anti-helmíntico efetivo, sua maior vantagem está na capacidade de melhorar a absorção e biodisponibilidade da IVM, atuando como um intensificador de penetração na formulação. No entanto, a ausência de diferença estatisticamente significativa entre o tratamento combinado e o tratamento com apenas IVM sugere a influência de fatores como oxidação e volatilização, que podem reduzir a concentração efetiva do OECa. Esses fatores podem ter limitado a eficácia in vivo do tratamento combinado.

7. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *C. aurantium* var. *amara*, cujo composto majoritário é o limoneno, apresentou atividade *in vitro* sobre larvas de *Haemonchus contortus*. Sua combinação com ivermectina demonstrou sinergismo em concentrações mais elevadas do óleo e antagonismo em doses mais baixas. Nos ensaios *in vivo*, a associação entre OECa e ivermectina exibiu eficácia semelhante à do fármaco isolado, sem diferenças significativas. No entanto, ao considerar os gêneros separadamente, a maior atividade foi observada contra *Haemonchus spp.*, indicando um potencial direcionado para essa espécie.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. **Gruver, TX USA: Texensis Publishing**, p. 46-52, 2017
- ADRAR, N.; OUKIL, N.; BEDJOU, F.. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 112-119, 2016.
- ALI-SHTAYEH, M. S. *et al.* Biological properties and bioactive components of *Mentha Spicata L.* essential oil: Focus on potential benefits in the treatment of obesity, Alzheimer's disease, dermatophytosis, and drug-resistant infections. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J. *et al.* Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021.
- ANANDAKUMAR, Pandi; KAMARAJ, Sattu; VANITHA, Manickam Kalappan. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. **Journal of food biochemistry**, v. 45, n. 1, p. e13566, 2021.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Citrus By-Products: Valuable Source of Bioactive Compounds for Food Applications. **Antioxidants**, v. 12, n. 1, p. 38, 2022.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004
- AUMEERUDDY-ELALFI, Z. *et al.* Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties in vitro. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 1, p. 232-243, 2018.
- BESIER, R. B. *et al.* The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. **Advances in parasitology**, v. 93, p. 95-143, 2016.
- BHAT, A. H. *et al.* Trichostrongylosis: a zoonotic disease of small ruminants. **Journal of Helminthology**, v. 97, p. e26, 2023.
- BORTOLUZZI, Bruno Batista *et al.* *Mentha villosa* Hubs., *M. x piperita* and their bioactives against gastrointestinal nematodes of ruminants and the potential as drug enhancers. **Veterinary Parasitology**, v. 289, p. 109317, 2021.
- BUSHRA, M. *et al.* Efficacy of closantel, fenbendazole and ivermectin against GI helminths of cattle in central Kashmir. **Journal of parasitic diseases**, v. 43, n. 2, p. 289-293, 2019.
- CALVETE, C. *et al.* Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. **Veterinary Parasitology**, v. 277, p. 109018, 2020.
- CANGA, Aránzazu González *et al.* The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 25-37, 2009.
- CHARLIER, J. *et al.* Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 182, p. 105103, 2020.
- CHIU, S.H.L., *et al.* Metabolic disposition of ivermectin in tissues of cattle, sheep, and rats. **Drug. Metabolism Disposition**, 1986, 14(5), 590-600.
- CHOPRA, Bhawna; DHINGRA, Ashwani Kumar. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, 2021.
- COLES, G. C. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

- CRAIG, T. M. Gastrointestinal nematodes, diagnosis and control. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 34, n. 1, p. 185-199, 2018.
- DE MATOS, S. P. *et al.* Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: A review. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, p. 138, 2019.
- DEL CARMEN RAZOLA-DÍAZ, María *et al.* Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil. **Food Chemistry**, v. 354, p. 129575, 2021.
- DEMELER, J. *et al.* Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 58-64, 2010.
- DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Biological activities and safety of *Citrus spp.* essential oils. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 1966, 2018.
- ERRECALDE, J. *et al.* Safety and pharmacokinetic assessments of a novel ivermectin nasal spray formulation in a pig model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 6, p. 2501-2507, 2021.
- FASCIO, M. L.; ERREA, M. I.; D'ACCORSO, Norma Beatriz. Imidazothiazole and related heterocyclic systems. Synthesis, chemical and biological properties. **European journal of medicinal chemistry**, v. 90, p. 666-683, 2015.
- FELIPPELLI, Gustavo *et al.* Nematode resistance to ivermectin (630 and 700 µg/kg) in cattle from the Southeast and South of Brazil. **Parasitology international**, v. 63, n. 6, p. 835-840, 2014.
- FERREIRA, L. E. *et al.* Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and *Lavandula officinalis*: *in vitro* anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2018.
- FERREIRA, Luis E. *et al.* Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary parasitology**, v. 228, p. 70-76, 2016.
- FISSIHA, W.; KINDE, M. Z. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 5403, 2021.
- FLAY, Kate J.; HILL, Fraser I.; MUGUIRO, Daniela Hernandez. A Review: *Haemonchus contortus* infection in pasture-based sheep production systems, with a focus on the pathogenesis of anaemia and changes in haematological parameters. **Animals**, v. 12, n. 10, p. 1238, 2022.
- GAÍNZA, Yousmel Aleman *et al.* Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 647-652, 2015.
- GARBIN, V. P. *et al.* Chemical characterization and *in vitro* anthelmintic activity of *Citrus bergamia* Risso and *Citrus X paradisi* Macfad essential oil against *Haemonchus contortus* Kirby isolate. **Acta Tropica**, v. 217, p. 105869, 2021.
- GIWA, S. O.; MUHAMMAD, M.; GIWA, A. Utilizing orange peels for essential oil production. **Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 13, n. 1, p. 17-27, 2018.
- GOKBULUT, Cengiz *et al.* Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 120-126, 2010.
- GRISI, Laerte *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- HENNESSY, D.R Modificando a formulação ou mecanismo de entrega para aumentar a atividade de compostos anti-helmínticos. *Parasitologia Veterinária* , v. 72, n. 3-4, pág. 367-390, 1997

HERATH, H. M. P. *et al.* Advances in the discovery and development of anthelmintics by harnessing natural product scaffolds. **Advances in parasitology**, v. 111, p. 203-251, 2021.

JANKE, C.; MAGIERA, M. M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 6, p. 307-326, 2020.

KAPLAN, R. M. Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. The Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 17-30, 2020.

KATIKI, L. *et al.* Anthelmintic activity of anethole, carvone, carvacrol, thymol, linalool, limonene, eucalyptol, vanillin, cinnamaldehyde and eugenol in in vitro tests. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. P1L14, 2014.

KATIKI, L. M. *et al.* Combined effects of Limonene and Ivermectin on P-glycoprotein-9 gene expression of lambs Infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 324, p. 110069, 2023.

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

KENEALY, Jessica Scare. **Anthelmintic resistance in equine parasites: mechanisms and treatment approaches**. [theses and dissertations] Veterinary Science, degree of Doctor of Philosophy in the College of Agriculture, Food and Environment, University of Kentucky University of Kentucky Unknown; 2019:288.
KOTZE, A. C. *et al.* Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 164-184, 2014.

LABA, D. (Ed.). **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. CRC Press, 1993.

LAFFONT, C. M. *et al.* Licking behaviour and environmental contamination arising from pour-on ivermectin for cattle. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 14, p. 1687-1692, 2001.

LANUSSE, Carlos *et al.* Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 8, p. 664-682, 2018.

LAVY, Eran *et al.* Aspects in controlled drug delivery for topical applications in veterinary medicine. **Veterinary and Animal Science**, v. 15, p. 100235, 2022.

LEATHWICK, D. M. *et al.* The efficacy and plasma profiles of abamectin plus levamisole combination anthelmintics administered as oral and *pour-on* formulations to cattle. **Veterinary parasitology**, v. 227, p. 85-92, 2016.

LEATHWICK, D. M.; MILLER, C. M. Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 3-4, p. 293-300, 2013.

LEATHWICK, D.M. *et al.* The route of administration affects the efficacy of moxidectin against *Ostertagia* nematodes in farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Veterinary Parasitology**, v. 298, p. 109525, 2021.

LEKIMME, M. *et al.* Failure of injectable ivermectin to control psoroptic mange in cattle. **The Veterinary Record**, v. 167, n. 15, p. 575, 2010.

LESPINE, Anne *et al.* P-glycoproteins in anthelmintic safety, efficacy, and resistance. **Trends in Parasitology**, 2024.

LOPES, W. D. Z. *et al.* Nematódeos de ruminantes domésticos. **Endoparasitoses de Ruminantes**. Editora UFG, Goiânia, p. 47-72, 2017.

MAKSOU, Sawssan *et al.* Citrus aurantium L. active constituents, biological effects and extraction methods. an updated review. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5832, 2021.

MALYUTINA, Alina *et al.* Drug combination sensitivity scoring facilitates the discovery of synergistic and efficacious drug combinations in cancer. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 5, p. e1006752, 2019.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; CHOUDHARY, S. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 1, p. 48-64, 2021.

MESQUITA-SOUSA, Dauana *et al.* Evaluation of a combination of Citrus aurantium var. Dulcis essential oil and albendazole for the treatment of sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 318, p. 109929, 2023.

MICKIEWICZ, M. *et al.* Prevalence of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in Polish goat herds assessed by the larval development test. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2021.

MOHSIN, Ali *et al.* Advances in sustainable approaches utilizing orange peel waste to produce highly value-added bioproducts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1284-1303, 2022.

MORENO, Érika Marcela *et al.* Induction of programmed cell death in Trypanosoma cruzi by Lippia alba essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, p. 1-16, 2018.

MORENO, L.; AIVAREZ, L.; CEBALLOS, L.; SÁNCHEZ B. S.; LANUSSE, C. Pattern of ivermectin (sheep) and doramectin (cattle) residues in muscular tissue from various anatomical locations **Food additives and contaminants**, 2007, 25(4), 406-412.

MORENO, Yovany; GEARY, Timothy G.; TRITTEN, Lucienne. When secretomes meet anthelmintics: lessons for therapeutic interventions. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 468-475, 2021.

MOUNGTHIPMALAI, Tanapoom *et al.* Ovicidal toxicity of plant essential oils and their major constituents against two mosquito vectors and their non-target aquatic predators. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2119, 2023.

NEVES, M. F. *et al.* Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 166-174, 2020.

OCDE-FAO. **Perspectivas Agrícolas 2021–2030**. 2021. Disponível online: <https://www.fao.org/3/cb5332en/Meat.pdf> (acessado em 22 de maio de 2023).

PACHECO, P. A. *et al.* Phytochemical modulation of P-Glycoprotein and its gene expression in an ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* isolate in vitro. **Veterinary parasitology**, v. 305, p. 109713, 2022.

PANWAR, D.; PANESAR, P. S.; CHOPRA, H. K. Recent trends on the valorization strategies for the management of citrus by-products. **Food Reviews International**, v. 37, n. 1, p. 91-120, 2021.

PARAS, Kelsey L. *et al.* Comparison of fecal egg counting methods in four livestock species. **Veterinary parasitology**, v. 257, p. 21-27, 2018.

PATEL, V. P.; LAKKAD, H. A.; ASHARA, K. C. Formulation studies of solid self-emulsifying drug delivery system of ivermectin. **Folia medica**, v. 60, n. 4, p. 580-593, 2018.

PAWAR, Rajendra-Prasad *et al.* Determination of albendazole and ivermectin residues in cattle and poultry-derived samples from India by micellar liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 103, p. 104111, 2021.

POTÂRNICHE, A. V. *et al.* First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats in Romania. **Animals**, v. 11, n. 10, p. 2761, 2021.

RASHED, A. *et al.* Antifungal properties of essential oils and their compounds for application in skin fungal infections: Conventional and nonconventional approaches. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1093, 2021.

RASHID, M. H. *et al.* Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of alpacas (*Vicugna pacos*) in Australia. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1-12, 2018.

REHBORG, Elena G.; WHEELER, Nicolas J.; ZAMANIAN, Mostafa. Mapping resistance-associated anthelmintic interactions in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 10, p. e0011705, 2023.

REYES-GUERRERO, D. E. *et al.* Comparative study of transcription profiles of the P-glycoprotein transporters of two *Haemonchus contortus* isolates: Susceptible and resistant to ivermectin. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 238, p. 111281, 2020.

RIAZ, Aayesha *et al.* Anthelmintic Resistance. **Antiparasitic Drug Resistance in Veterinary Practice**, p. 41- 57, 2024.

ROBERTS, F.H.S., O'Sullivan, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting. **Australian Journal Agricultural Research**, 1, 99–102, 1950

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.

SANTOS, J. S.; GONZATTO, M. P. Citrus Essential Oils and Nanosystems towards Skin Delivery. In: **Citrus Research-Horticultural and Human Health Aspects**. IntechOpen, 2023.

SILVA, Carolina Rocha *et al.* Associação de anti-helmínticos sintéticos e monoterpenos no controle de *Haemonchus contortus*. 2020.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

SHARMA, M. *et al.* Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112514, 2022.

SHETTY, N. S.; KHAZI, I. Ahmed M.; AHN, Chul-Jin. Synthesis, anthelmintic and anti-inflammatory activities of some novel imidazothiazole sulfides and sulfones. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 8, p. 2337-2340, 2010.

SON, D. S. *et al.* The antitumor potentials of benzimidazole anthelmintics as repurposing drugs. **Immune network**, v. 20, n. 4, 2020.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 360-364, 2007.

STEPHANE, Fongang Fotsing Yannick; JULES, Bankeu Kezetas Jean. Terpenoids as important bioactive constituents of essential oils. **Essential oils-bioactive compounds, new perspectives and applications**, p. 1-15, 2020.

STRYDOM, Tom *et al.* The economic impact of parasitism from nematodes, trematodes and ticks on beef cattle production. **Animals**, v. 13, n. 10, p. 1599, 2023.

SUVARNA, Vasanti. Ivermectin: A Critical Review on Characteristics, Properties, and Analytical Methods. **Journal of AOAC International**, v. 106, n. 3, p. 534-557, 2023.

SWAN, G. E. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 70, n. 2, p. 61-70, 1999.

VAN WYK, Jan A.; MAYHEW, Estelle. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 2013.

VUKIC, M. D.; Brankovic, J.; Ristic, M. S. Análise de GC, GC/MS e efeitos biológicos do óleo essencial de *Citrus aurantium amara*. 2023.

XU, Y. *et al.* Pharmacokinetics of extended-release ivermectin microspheres after oral administration to healthy pigs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, n. 5, p. 485-490, 2020.

YANG, W. *et al.* Advances in pharmacological activities of terpenoids. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 3, p. 1934578X20903555, 2020.

WANG, Craig *et al.* Modelling anthelmintic resistance by extending eggCounts package to allow individual efficacy. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 386-393, 2018.

ZAJAC, Anne M.; GARZA, Javier. Biology, epidemiology, and control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 73-87, 2020.

ZAJÍČKOVÁ, Markéta *et al.* Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 2, p. 430-437, 2020.

ZHENG, Shuyu *et al.* SynergyFinder plus: toward better interpretation and annotation of drug combination screening datasets. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 20, n. 3, p. 587-596, 2022.