

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARCOS JAVIER ESPINO UREÑA**

**EXTRATOS BIOATIVOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS ENDÊMICAS DA  
REPÚBLICA DOMINICANA NO CONTROLE DE NEMATOIDES  
GASTROINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**MARCOS JAVIER ESPINO UREÑA**

**EXTRATOS BIOATIVOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS ENDÊMICAS DA  
REPÚBLICA DOMINICANA NO CONTROLE DE NEMATÓIDES  
GASTROINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques  
Coorientador: Dr. Wesley L. Correia Ribeiro  
Coorientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Jr.

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Espino Ureña, Marcos Javier .

Extratos bioativos e óleos essenciais de plantas endêmicas da República Dominicana no controle de nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes / Marcos Javier Espino Ureña. - Alfenas, MG, 2024.

162 f. : il. -

Orientador(a): Marcos José Marques.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Caprinos. 2. Fenólicos. 3. Haemonchus contortus. 4. Terpenoides . 5. Quassinoides. I. Marques, Marcos José, orient. II. Título.

MARCOS JAVIER ESPINO UREÑA

"EXTRATOS BIOATIVOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS ENDÊMICAS DA REPÚBLICA DOMINICANA NO CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES"

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 19 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Marcos José Marques  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro  
Coorientador  
Instituição: Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua  
Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela  
Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 23/11/2024, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).





A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1393244** e o código CRC **5BA0EAF2**.

---

**Este trabalho é dedicado a:**

Meus pais, Miguel Ángel Espino Abreu e minha mãe, Mirian Margarita Ureña de Espino, por sempre acreditarem em mim e por confiarem que eu poderia realizar este sonho;

Meus irmãos, Karina Mercedes Espino Ureña e Carlos José Espino Ureña, pela confiança e pelo apoio incondicional;

Meus professores e colegas da Universidade Autônoma de Santo Domingo pelo apoio; de forma especial, aos professores que me incentivaram a aprimorar meus conhecimentos, como o Prof. Elvin Odilon Muse e a Profa. Argentina Figueroa;

Meus colegas pesquisadores do Instituto Dominicano de Investigações Agropecuárias e Florestais, em especial Alexander Benitez Trinidad, pelo grande apoio e confiança;

Meus alunos da Universidade Autônoma de Santo Domingo e da Universidade Nacional Evangélica, com o desejo de inspirá-los a lutar para alcançar seus sonhos;

Os produtores de pequenos ruminantes de todo o mundo, em especial os da minha querida República Dominicana, para incentivá-los a integrar produtos naturais no controle das infecções causadas por helmintos e para que acreditem no potencial medicinal das plantas endêmicas e nativas de seu país. Ademais, incentivar que os produtores e criadores confiem na formação dos médicos veterinários originários da República Dominicana.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, por me dar a vida, a saúde, a força e o desejo de realizar este sonho de cursar um doutorado fora da República Dominicana. Obrigado Pai, obrigado Jesus e obrigado Espírito Santo por nunca me abandonarem ao longo deste caminho.

À Nossa Senhora e Mãe Santíssima Maria e a São José, por serem meus pais espirituais, por me segurarem pelas mãos e me ajudarem a não desistir, mesmo nos momentos de solidão e fraqueza.

Aos meus pais, Mirian Margarita Ureña de Espino e Miguel Ángel Espino Abreu, por seu inestimável apoio, que desde antes de meu nascimento vêm me ajudando a alcançar todas as minhas metas e sonhos. Agradeço por cada ligação, por cada conselho, pelo amor abnegado que me impulsiona, pelo exemplo de esforço e trabalho e pelo apoio espiritual com suas orações. Este título é tanto meu quanto de vocês.

Aos meus irmãos, Karina Espino e Carlos Espino, pelo grande apoio para realizar este projeto, por acreditarem em mim e por serem fonte de força e inspiração.

A Mariana da Cruz e Leticia Custódio, missionárias da comunidade Aliança de Misericórdia, que foram as primeiras a me sugerirem estudar no Brasil e que estabeleceram contatos com professores e produtores brasileiros para facilitar meus estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos José Marques, pela extraordinária acolhida, pela inestimável ajuda e colaboração desde os primeiros contatos por e-mail, em 2018. Muito obrigado, professor. Palavras não são suficientes para agradecer sua paciência, dedicação e confiança em mim. Obrigado por ser um verdadeiro orientador, protetor e até provedor em algumas ocasiões, por ser amigo e por me ensinar a ser um professor e orientador melhor para meus alunos. Que Deus lhe retribua tudo o que fez por mim e por tantos outros alunos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Claudio Viegas Jr., que, com paciência e dedicação, se reunia comigo em seu laboratório para compartilhar ideias para o meu projeto, me ensinar a trabalhar com extratos e a realizar fracionamentos com solventes. Muito obrigado pelas suas valiosas contribuições para este projeto.

Ao meu coorientador, Dr. Wesley L. Ribeiro, por ser um amigo próximo e acolhedor em Fortaleza, ajudando-me imensamente nos trabalhos iniciais no Laboratório de Doenças Parasitárias da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Estadual do Ceará. Suas contribuições para o projeto foram essenciais.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia M. L. Bevilaqua, pelo convite para ir a Fortaleza aprender técnicas de avaliação de atividade anti-helmíntica *in vitro*, no seu antigo laboratório. Por ser a ponte que me permitiu contatar a Prof<sup>ª</sup>. Lorena, e por todas as suas valiosas contribuições para o meu trabalho. Foi uma honra conhecê-la e aprender um pouco sobre seu trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lorena Mayana B. de Oliveira, pela abertura e acolhida que me permitiram trabalhar no seu Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Estadual do Ceará, onde ficaria inicialmente 45 dias, dias estes que se transformaram em meses, necessitando retornar várias vezes para realizar grande parte dos meus experimentos.

Obrigado pelo carinho e por suas contribuições durante minha qualificação.

Ao Prof. Dr. Vilemar de Araújo Filho, na época doutorando da Profa. Claudia, que me acolheu e, com muita dedicação, me ensinou a realizar os testes de avaliação de atividades nematocidas *in vitro*, acompanhando-me no laboratório até em finais de semana e feriados. Obrigado também por procurar carneiros em seu próprio carro para meus experimentos. Serei eternamente grato, amigo.

Ao Matheus Luiggi F. Barbosa, doutorando da Profa. Lorena, por me acolher em Fortaleza, por dividir o apartamento comigo e por toda a ajuda no laboratório com minhas atividades de pesquisa.

Ao Francisco Cardoso (Chiquinho), pela acolhida quando cheguei em Alfenas em setembro de 2020, permitindo-me morar alguns dias em sua casa até eu encontrar um apartamento e pela amizade.

À Joana D'Arc da Silva Cruz e José Francisco da Cruz, pais de Josiane (Mariana), pela acolhida desde minha primeira vez em Alfenas (2018), por serem como pais para mim, sempre presentes quando precisei e pelo cuidado em tudo. De modo especial, agradeço profundamente a Joana por me ajudar a treinar minha apresentação de projeto para ingressar na UNIFAL como doutorando, pelo incentivo e por suas valiosas orientações.

Ao Roberto Silvério (Beto), à Maria de Fátima da Silva Silvério e família por serem outros pais para mim, oferecendo sempre sua ajuda e sua casa com amor verdadeiro, sempre prontos a me socorrer em qualquer necessidade. Vocês permanecerão para sempre no meu coração.

Ao Franklin V. Mota, ao Rodrigo Loes da Silva, ao Vanderlei Moreira, e aos outros membros da Comunidade Aliança de Misericórdia, por me permitirem levar os carneiros dos meus experimentos ao Sítio Rainha da Paz e por todo o apoio oferecido.

À dona Cida (Maria Aparecida Maciel), outra mãe e irmã, pelo carinho e cuidado constantes, e por cuidar com tanto amor dos carneiros Igor e Julieta, cujos nomes ela escolheu.

Ao Márcio Luiz Ribeiro, pela colaboração tão importante, visitando fazendas para encontrar os carneiros adequados para meus experimentos, disponibilizando seu carro para transportá-los de Fama ao Sítio da Aliança de Misericórdia e pelo apoio em tudo.

À Roseli Lion e ao Jorge Toledo Lion, meus queridos locadores e vizinhos, obrigado pelo carinho, cuidado e acolhida desde que pisei em sua casa. Obrigado por me receberem sempre que eu retornava para morar em uma de suas kitnets e pelo apoio constante. Vocês ficarão no meu coração.

Ao Diego José, por me apresentar a Roseli, possibilitando assim que eu aluga-se meu primeiro apartamento e pela amizade desde que cheguei em Alfenas.

Ao Januário Tomás Ernesto, o moçambicano, pela acolhida, amizade e por me ajudar a realizar minhas atividades no laboratório do Prof. Cláudio Viegas.

Aos companheiros doutorandos, mestrandos e de iniciação científica do Laboratório de Doenças Parasitárias da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Estadual do Ceará, como o Raphael Ferreira Oliveira, a Andreza Braga, a Karin Vitória Maia, entre outros que colaboraram com os meus experimentos, em especial com o teste de motilidade do nematoide adulto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Chagas e aos colegas doutorandos e mestrandos do Laboratório de Fitoquímica, Química Medicinal e Metabolômica, como Miller Ferreira, Paula Salem, Matheus Fernandes Alves, Mario Santos e outros, pelo apoio na secagem e preparação de extratos e nas análises químicas realizadas.

Ao Albert Katchborian Neto, doutorando da Universidade Federal de Alfenas, pela valiosíssima ajuda nas análises químicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de óleos essenciais, pelas anotações de compostos químicos nas análises cromatográficas de extratos, e pela inestimável assistência na redação dos meus manuscritos. Muito obrigado, amigo.

Ao Prof. Eduardo Costa de Figueiredo e aos seus alunos de doutorado Luiz Paulo e Luiz Felipe, pelo trabalho com as amostras de óleos essenciais no equipamento de CG-EM do Laboratório de Análises Clínicas de Toxicantes e Fármacos.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro e aos analistas Dênis Gomes de Melo (mestrando) e Dr<sup>a</sup>. Lorena Mara Alexandre e Silva, pela colaboração nas análises químicas de CG-EM de amostras de óleos essenciais de *Lippia domingensis*, *Pimenta ozua* e *Pimenta haitiensis*, na Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Lúcia Cardoso e ao Mestre Vitor Eduardo Narciso dos Reis, do Departamento de Química da Universidade de São Paulo, pela realização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de extratos e frações.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Maia de Moraes pela importante colaboração, permitindo que fossem realizadas as análises de quantificação de fenóis, taninos e flavonoides totais e outros testes fitoquímicos em seu Laboratório de Química de Produtos Naturais, disponibilizando alunos de pós-graduação e de iniciação científica, além de equipamentos, reagentes e insumos para colaborar com o meu projeto.

Aos colegas doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica, como Flávio Lopes, Lucas Soares Frota, Renato Almeida Montes e Garcez Neto, pela ajuda no preparo de extratos e nas quantificações de fenóis totais, taninos e flavonoides totais de extratos e frações.

À Dra. Daniela Alves e à aluna Sara Ingrid Rodrigues, pela colaboração nos testes de atividades antioxidantes e outras análises químicas na Universidade Estadual do Ceará.

À Marisa Lopes, pela constante ajuda, desde o início do projeto, nas correções de redação em português e pela amizade e apoio durante o doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal, como a Dr<sup>a</sup>. Vanessa Gontijo, Dr<sup>a</sup>. Graziela Franco e outros, pelas orientações e pela colaboração no fracionamento de extratos.

Aos alunos de iniciação científica, Camila Carrara e Raphael Copeiro, pela valiosa ajuda no meu projeto, coletando amostras de fezes e colaborando nos testes de eclosão de ovos desenvolvidos na Universidade Federal de Alfenas.

Aos professores Dr. Fabio Antônio Colombo e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Rosa Faria, por disponibilizarem as instalações, os materiais e os equipamentos do Laboratório de Parasitologia Clínica da Universidade Federal de Alfenas, possibilitando o desenvolvimento de alguns dos meus experimentos e pela disposição constante em me auxiliar e esclarecer dúvidas. Muito obrigado, professores.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Pereira, pela disposição sempre em ajudar, esclarecer dúvidas e também pela valiosa contribuição no cálculo das concentrações efetivas 50% nos resultados dos testes de eclosão de ovos e de motilidade de nematoides adultos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Leilismara Sousa Nogueira, pela colaboração na contagem de leucócitos em esfregaços de caprinos e pela constante disponibilidade em esclarecer dúvidas.

Ao Prof. Dr. José Antônio Garcia e sua esposa Dr<sup>a</sup>. Erika Garcia, pela acolhida em Alfenas e apoio oferecido.

Ao Prof. Dr. Isaac Neto, por me acolher alguns dias na sua casa quando cheguei pela primeira vez em Fortaleza.

Aos colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas orientados pelo Prof. Dr. Marcos: Patrícia Espuri, Luiz Felipe Cunha e Lais Castro, pelo apoio em diversas atividades de pesquisa na Universidade Federal de Alfenas. Agradeço também aos doutores Juliana Nunes e Matheus P. de Araújo pelo auxílio em várias atividades e, especialmente, a Luiz Felipe Cunha, por sua ajuda no desenvolvimento de um dos testes de toxicidade oral aguda em camundongos e em algumas análises estatísticas no software GraphPad Prism.

Ao Alexander Benítez Trinidad, meu colega de trabalho no Instituto Dominicano de Investigações Agropecuárias e Florestais (IDIAF), por conduzir inúmeras atividades de pesquisa na República Dominicana e por me acompanhar na maioria das viagens de coleta de plantas, sendo um apoio essencial no meu projeto de doutorado. Muito obrigado pela amizade e por suas inestimáveis contribuições.

Ao Rafael Pérez Duvergé, ex-diretor executivo do IDIAF, por autorizar meus estudos no Brasil e por continuar colaborando com o instituto.

Aos meus companheiros de projeto José Choque Lopez, Martin Canals Martin e Orlando Diaz Cordero, pelo apoio oferecido desde o IDIAF, para que as minhas atividades de pesquisa na República Dominicana fossem realizadas de forma adequada.

Ao Dr. Eladio Arnaud Santana, atual diretor executivo do IDIAF, pela extensão do prazo para a conclusão de meus estudos no Brasil e por todo o apoio oferecido em sua posição de diretor.

Ao Dr. Julio Borbón, decano da Faculdade de Ciências Agronômicas e Veterinárias da UASD, pelo apoio desde o início para que eu pudesse obter a licença de estudos na UASD,

assim como às Dras. Argentina Figueroa e Teresa Peguero, por suas colaborações e motivações, possibilitando a realização deste doutorado e incentivando-me a retornar ao país com uma melhor qualificação como professor da instituição.

Ao Arthur Leite e a seus pais, Pedro Paulo Leite e Cleyde Maria Leite, da Fazenda CAPRIVAMA pela disposição em permitir a coleta de amostras de fezes de pequenos ruminantes, possibilitando o início das atividades de pesquisa em Alfenas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas e a suas coordenadoras, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Borges de A. Paula e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, pelo apoio oferecido sempre que necessitei de alguma declaração para renovação de visto ou para responder aos requerimentos de instituições na República Dominicana. Agradeço de forma especial à secretária do programa, Fabiana da Silva, por sua constante disposição em esclarecer dúvidas e colaborar no que lhe solicitei ao longo deste período.

A todos os professores do PPGCF e dos demais programas de Pós-Graduação da Universidade Federal de Alfenas por suas valiosas contribuições nas aulas, palestras e conversas informais, que enriqueceram meus conhecimentos e aprimoraram minha formação como pesquisador e profissional.

Aos inúmeros colegas do IDIAF que colaboraram de uma forma ou de outra para facilitar algum processo ou atividade do meu projeto de pesquisa, com destaque especial ao apoio de Greiby Medina, Orlando Feliz Espírito, José Santana, Pedro Aguasanta, Henry Beltré, Atilés Peguero, Benito Ciriaco, Gregorio García Lagombra, Joaquín Caridad, Ana Mateo, María Cuevas, Marlene Cortorreal, Johanny Pereira, Yailin Mercedes e Fany Báez.

Agradeço também aos amigos Igor e Paulo pela ajuda na construção do curral dos carneiros em Alfenas, assim como a Fernando López Collado, Rafael López, Clemente López e Adirano López Rodríguez, pela construção das gaiolas metabólicas para caprinos e ovinos, utilizadas em vários experimentos do meu projeto.

Ao Daniel Pérez e Kironny Beltré, pela ajuda cuidando e alimentando os ruminantes do meu experimento, especialmente nos dias feriados.

Ao Wallison B. Pacheco e Gaby Quispe, pela grande colaboração nas microscópias de fluorescência em ovos e larvas de *Haemonchus contortus*.

Ao Licenciado Teodoro García, por sua importante assistência na coleta e identificação das plantas estudadas neste projeto.

Ao Licenciado Manuel Vázquez Tineo e à Licenciada Maritza Ramírez, pelas orientações na obtenção de extratos e óleos essenciais, bem como na preparação desses derivados vegetais no Laboratório de Investigação de Substâncias Naturais (LABISNAT), para que fossem transportados adequadamente até o Brasil.

Aos alunos de graduação que colaboraram em várias atividades do meu projeto de pesquisa na República Dominicana, especialmente Juamelis Brito, pela valiosa contribuição nos testes de avaliação do efeito anti-helmíntico *in vivo*, e ao Jose Peguero, Ethauris Espinal e Merana Liranzo, por seu apoio. Agradeço também a Emmanuel Almonte e Giovanni

Almanzar, por suas contribuições nos testes de avaliação de toxicidade oral aguda.

Para não excluir ninguém, agradeço a todas as pessoas que, de forma simples, contribuíram para que este projeto fosse executado com sucesso. Muito obrigado.

Não menos importante, agradeço a todas as instituições que apoiaram economicamente este projeto, tais como o Ministério de Educação Superior, Ciência e Tecnologia (MESCYT) da República Dominicana, o Instituto Dominicano de Investigações Agropecuárias e Florestais (IDIAF), a Universidade Autônoma de Santo Domingo (UASD). Agradeço também as agências brasileiras de fomento, que contribuíram de maneira direta ou indireta com este projeto, disponibilizando e/ou fornecendo equipamentos, materiais e/ou reagentes para a realização de testes ou análises químicas, tais como o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-PROEM). Da mesma forma, agradecemos o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) código de Financiamento 001.



*“O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato não os despreza.  
Uma espécie de madeira não adoçou o amargor da água? Essa virtude chegou ao  
conhecimento dos homens. O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em  
suas maravilhas.”*

(Eclesiástico 38, 4-6, 2019, Associação Cultural Nossa Senhora de Fátima,  
disponível em <https://salvaimerainha.org.br/noticias/elesiastico-38/>)

## RESUMO

A produção de pequenos ruminantes enfrenta perdas econômicas significativas devido às doenças causadas por nematoides gastrointestinais (NGI) que desenvolvem rapidamente resistência anti-helmíntica. A fitoterapia é uma alternativa promissora para controlar esses parasitos. Este estudo teve como objetivo avaliar extratos, frações e óleos essenciais de plantas endêmicas da Hispaniola tais como: *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Po), *Pimenta haitiensis* (Ph), *Croton coronatus*, *Croton poitaie*, *Simarouba berteroana* (Sb) e *Lippia dominguensis* (Ld), no controle *in vitro* de *Haemonchus contortus* (kokstad) e *in vivo* de NGI de pequenos ruminantes. Foram realizadas análises químicas espectrofotométricas e cromatográficas para determinar o perfil químico dos derivados vegetais, sendo também avaliada a toxicidade aguda *in vivo* dos mais promissores. No teste de inibição da eclosão de ovos, foi observado que os óleos essenciais foram mais ativos do que os extratos e as frações, apresentando concentrações inibitórias de 50% (IC<sub>50</sub>) de 0,294 mg/mL (óleo essencial de Ph: OEPH), 0,313 mg/mL (óleo essencial de Ld 2º coleta: OELd2), e 0,8 – 1,38 mg/mL (óleos essenciais de Po). A fração hexânica da 2º coleta do extrato da Po (IC<sub>50</sub> = 0,65 mg/mL) e a fração hidroalcolica 1º coleta de *S. berteroana* (IC<sub>50</sub> = 0,925 mg/mL) também apresentaram potentes efeitos de inibição da eclosão de ovos. A maioria dos extratos e frações inibiram o processo de desembainhamento larval de *H. contortus* a 300 µg/mL, com a exceção das frações hexânicas. No teste de motilidade do nematoide adulto, após 3h de exposição, os óleos essenciais de *L. dominguensis* 1º coleta (OELd1) e da Po 1º coleta (OEPo1), a 1 mg/mL, inibiram a motilidade > 95%. Estes óleos causaram alterações na cutícula de nematoides adultos, observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas indicou que os compostos majoritários do OELd1 foram: linalol (33,85%) e 1,8-cineol (30,88%), do OEPo1: 1,8-cineol (93,7%), e do OEPH: estragol (66,32%) e mentatrieno <1,3,8-ρ-> (17,66%). As frações isobutanol e acetato de etila da *S. berteroana* foram as que apresentaram maiores teores de fenóis, flavonoides e taninos totais, por espectrofotometria. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas mostrou que os extratos brutos e frações de *S. berteroana* possuíam quassinoides, quinonas terpenoides, lipídios de fitosteróis, alcaloides e a naftoquinona javanicina D. No teste de toxicidade oral aguda em camundongos, foi observado que o OELd1 e o óleo essencial de Po 2º coleta (OEPo2) e o do extrato bruto de Po2 apresentaram baixa toxicidade (DL<sub>50</sub> > 2.000 mg/kg), e a DL<sub>50</sub> do OELd2, OEPH e do extrato bruto de Sb 2º coleta (Sb2) foi entre 1.100 – 2.000 mg/kg. Nos experimentos com caprinos, foi observado que 350 mg/kg de Sb2 diminuindo a carga parasitária em 71% no dia 14, apresentando uma eficácia concentração-dependente. Portanto, o extrato bruto Sb2, contendo quassinoides e um teor significativo de fenólicos, foi o derivado vegetal mais promissor de *S. berteroana*. Da mesma forma, os óleos essenciais de Ld (contendo linalol e piperitenona) e de Ph (contendo estragol), podem ser considerados para o desenvolvimento de agentes anti-helmínticos para pequenos ruminantes.

Palavras-chave: caprinos; fenólicos; *Haemonchus contortus*; terpenoides; quassinoides.

## ABSTRACT

Small ruminant production faces significant economic losses due to diseases caused by gastrointestinal nematodes (GIN), which are capable of rapidly developing anthelmintic resistance. Phytotherapy emerges as a promising alternative for controlling these diseases. This study aimed to evaluate extracts, fractions, and essential oils from endemic plants of Hispaniola, including *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Po), *Pimenta haitiensis* (Ph), *Croton coronatus*, *Croton poitaie*, *Simarouba berteroana* (Sb), and *Lippia dominguisis* (Ld), considering their *in vitro* and *in vivo* effects on GIN control in small ruminants. Spectrophotometric and chromatographic chemical analyses were conducted to determine the chemical profiles of the plant derivatives, along with an *in vivo* acute toxicity assessment of the most promising derivatives. In the egg hatching test, essential oils were found to be more active than extracts and fractions, with 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of 0,294 mg/mL (Ph essential oil: OEPH). However, the hexane fraction from the second collection of the Po extract (IC<sub>50</sub> = 0,65 mg/mL) and the hydroalcoholic fraction from the first collection of *S. berteroana* (IC<sub>50</sub> = 0,925 mg/mL) also demonstrated potent egg hatching inhibition. In the larval artificial exsheathment assay, most of the extracts and fractions inhibited the exsheathment process of *H. contortus* larvae at 300 µg/mL, with the exception of the hexane fractions. In the adult nematode motility test, after 3h of exposure, the essential oils of *L. dominguisis* 1<sup>st</sup> collection (OELd1) and *P. racemosa* var. *ozua* 1<sup>st</sup> collection (OEPo1), at 1 mg/mL, inhibited motility by > 95%. These oils caused changes in the cuticle of adult nematodes, as observed using scanning electron microscopy. Gas chromatography coupled with mass spectrometry indicated that the majority compounds of OELd1 were: linalool (33,85%) and 1,8-cineole (30,88%), of OEPo1: 1,8-cineole (93,7%), and of OEPH: estragole (66,32%) and menthatriene <1,3,8-p-> (17,66%). *S. berteroana*'s isobutanol and ethyl acetate fractions showed the highest levels of phenols, flavonoids and total tannins by spectrophotometry. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry showed that the crude extracts and fractions of *S. berteroana* have quassinoids, terpenoid quinones, phytosterol lipids, alkaloids and the naphthoquinone javanicin D, also present in other species of the family. In the acute oral toxicity test on mice, it was observed that OELd1 and the essential oil of *P. racemosa* var. *ozua* (2<sup>nd</sup> collection) and the crude extract of Po 2<sup>nd</sup> collection (Po2) showed low toxicity (LD<sub>50</sub> > 2.000 mg/kg), and the LD<sub>50</sub> of OELd2, OEPH and the crude extract of *S. berteroana* 2<sup>nd</sup> collection (Sb2) was between 1.100 – 2.000 mg/kg. In the experiments with goats, it was observed that 350mg/kg of Sb2 decreased the parasite burden by 71% on day 14, showing a concentration-dependent efficacy. Therefore, the crude extract Sb2, containing quassinoids and a significant phenolic content, was the most promising plant derivative from *S. berteroana*. Similarly, the essential oils from Ld (containing linalool and piperitenone) and Ph (containing estragole) could be considered for the development of anthelmintic agents for small ruminants.

Keywords: fractions; goats; *Haemonchus contortus*; terpenoids; phenolics; quassinoids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa político da República Dominicana com as 3 regiões com maior população de pequenos ruminantes .....	27
Figura 2 -	Rebanhos de caprinos na Província Peravia, República Dominicana ...	28
Figura 3 -	Diferenças morfológicas entre espécimes machos e fêmeas de <i>Haemonchus contortus</i> .....	30
Figura 4 -	Esquema do ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> em pequenos ruminantes .....	31
Figura 5 -	Esquema das datas de aprovação de fármacos anti-helmínticos e data de primeiro reporte de resistência em cabras e ovelhas .....	33
Figura 6 -	Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários de plantas ..	39
Figura 7 -	Taninos hidrolisáveis simples e estrutura básica (A) e taninos condensados e estrutura básica (B) .....	44
Figura 8 -	Subunidades de flavan-3-ol utilizadas como blocos de construção para a formação de taninos .....	45
Figura 9 -	Representação do arranjo de ligações de hidrogênio envolvidas na complexação tanino condensado (CT)-proteína .....	47
Figura 10 -	Estruturas químicas de terpenos (terpenoides, isoprenoides) .....	50
Figura 11 -	Derivados de prenila (terpenoides lineais e terpenoides) .....	51
Figura 12 -	Estrutura química de sapogeninas detectadas em extratos de <i>Medicago</i> spp. com atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i> sobre strongilídeos gastrointestinais de asnos .....	53
Figura 13 -	Fotografias de <i>Pimenta racemosa</i> var. <i>ozua</i> e sua distribuição geográfica na República Dominicana .....	55
Figura 14 -	Imagens de <i>Pimenta haitiensis</i> no seu ambiente natural em Pedernales, Parque Nacional Sierra de Bahoruco .....	56
Figura 15 -	Fotografia de <i>Lippia dominguensis</i> com flores e frutos em seu ambiente natural e sua distribuição geográfica na República Dominicana .....	56
Figura 16 -	Fotografia de <i>Croton poitaei</i> no seu habitat natural e sua distribuição geográfica na República Dominicana .....	59

Figura 17 -	<i>Croton coronatus</i> em seu habitat natural em Hoyo de Pelempito, Pedernales e sua distribuição geográfica na República Dominicana .....	59
Figura 18 -	Fotografias de <i>Simarouba berteriana</i> em diferentes estádios fenológicos .....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Hematócrito (PCV) e FAMACHA® (média e desvio padrão) de cabras tratadas com extrato de <i>Simarouba berteriana</i> da 2ª coleta (junho 2021) .....	143
Gráfico 2 - Ovos por grama de fezes (média e erro padrão) de nematoides gastrointestinais de cabras tratadas com extrato de <i>Simarouba berteriana</i> da 2ª coleta (junho 2021) durante 27 dias .....	144
Gráfico 3 - Peso corporal e escore de condição corporal (média e desvio padrão) de cabras tratadas com extrato de <i>Simarouba berteriana</i> da 2ª coleta (junho 2021) .....	146
Gráfico 4 - Hematócrito (PCV) e FAMACHA® (média e desvio padrão) de cabras tratadas com extrato de <i>Simarouba berteriana</i> da 2ª coleta (junho 2021) .....	147
Gráfico 5 - Ovos por grama de fezes (média e erro padrão) de nematoides gastrointestinais de cabras tratadas com extrato de <i>Simarouba berteriana</i> da 2ª coleta (junho 2021) durante 28 dias .....	149
Gráfico 6 - Teor de taninos totais (média e desvio padrão) de extratos de <i>Pimenta racemosa</i> var. <i>ozua</i> das coletas de março de 2020 e julho de 2021 expressados em mg de equivalentes de ácido tânico/g de extrato .....	151
Gráfico 7 - Teor de flavonoides (média e desvio padrão) de extratos de <i>Pimenta racemosa</i> var. <i>ozua</i> das coletas de março de 2020 e julho de 2021 expressados em mg de equivalentes de quercetina /g de extrato .....	151
Gráfico 8 - Cromatogramas de CG-MS das amostras de óleos essenciais .....	152

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem de nematoides gastrointestinais recuperados em coproculturas de cabras tratadas com extrato bruto de <i>Simarouba berteriana</i> da 1º coleta (fevereiro 2020) em um período de 27 dias ....	145
Tabela 2 -	Parâmetros hematológicos (média e desvio padrão) de cabras tratadas com o extrato bruto de <i>Simarouba berteriana</i> da 2º coleta (junho 2021) .....	148
Tabela 3 -	Porcentagem de nematoides gastrointestinais (média e desvio padrão) recuperados em coproculturas de cabras tratadas com extrato bruto de <i>Simarouba berteriana</i> da 2º coleta (junho 2021) por 28 dias .....	150
Tabela 4 -	Perfil químico de amostras de óleos essenciais de várias plantas obtidos por CG-EM .....	153
Tabela 5 -	Concentração efetiva (média e desvio padrão) de extratos, frações e óleos essenciais de <i>Pimenta racemosa var. ozua</i> para inibir 50 e 90% a eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> .....	154
Tabela 6 -	Concentração efetiva (média e desvio padrão) de extratos e óleos essenciais de <i>Lippia domingensis</i> para inibir 50 e 90% a eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> Kokstad .....	155
Tabela 7 -	Concentração efetiva (e intercalo de confiança de 95%) de extratos de espécies de <i>Croton</i> para inibir 50 e 90% (IC <sub>50</sub> e IC <sub>90</sub> ) a eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> Kokstad .....	155
Tabela 8 -	Porcentagens de inibição da eclosão de ovos (media ± desvio padrão) e concentração efetiva do óleo essencial de <i>Pimenta haitiensis</i> para inibir 50 e 90% da eclosão de ovos (e intercalo de confiança 95%) .....	156

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABS	Absorbância
AH	Anti-helmíntico
ATP	Adenosina Trifosfato
AWMT	<i>Adult Worm Motility Test</i> ou Teste de motilidade do nematoide adulto
BCS	<i>Body Condition Scoring</i> / score ou pontuação de condição corporal
BW	Peso corporal ou <i>Body weight</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Cc / C.c.	<i>Croton coronatus</i> Urb.
Cp / C.p.	<i>Croton poitaie</i> Urb.
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CoTs	Taninos complexos
CTs	Taninos condensados
Da	Dalton (unidade de peso molecular)
DD (óleo E.)	Óleo essencial de <i>P. racemosa</i> var. <i>ozua</i> obtido por destilação doméstica
DDCo	Óleo essencial de <i>P. racemosa</i> var. <i>ozua</i> obtido por destilação doméstica no município de Cotuí, Provincia de Santiago Rodríguez, República Dominicana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EA	Ácido elágico
EHT	<i>Egg Hatch Test</i> ou Teste de eclosão larvar
ETs	Elagitaninos
EtOH	Etanol
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto férrico
Fr.	Fração de extrato
FrAcEt	Fração obtida com Acetato de Etila como solvente
FrHex	Fração obtida com hexano como solvente
FrIsob	Fração obtida com Isobutanol como solvente



FrHalc / FrHaq	Fração residual ou hidroalcoólica final após das extrações sucessivas com diferentes solventes
GA / GAE	Ácido gálico / equivalentes de ácido gálico
GC-MS / CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GTs	Galotaninos
HPLC	Cromatografia líquida alta eficiência
HTs	Taninos hidrolisáveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC <sub>50</sub> e IC <sub>90</sub>	Concentração inibitória do 50% e 90%
IDIAF	Instituto Dominicano de Investigações Agropecuárias e Florestais
JBN	Jardim Botânico Nacional (República Dominicana)
KI / IK	Índice de Kovats
LABISNAT	Laboratório de Pesquisa de Substâncias Naturais (Rep. Dominicana)
LAEA	<i>Larval artificial exsheathment assay</i> ou teste de desembainhamento larvar
Lev / LEV	Levamisol
Ld / L.d.	<i>Lippia dominguensis</i> Mold.
L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> e L <sub>3</sub>	Larvas de nematoides de primeiro (L <sub>1</sub> ), segundo (L <sub>2</sub> ) e terceiro estágio (L <sub>3</sub> )
MeOH	Metanol
MESCYT	Ministério de Educação Superior Ciência e Tecnologia (República Dominicana)
MEV / SEM	Microscopia eletrônica de varredoura
MF	Fórmula molecular
Mon	Monepantel (anti-helmíntico comercial)
Msnm	Metros sobre o nível do mar
mPD	Grau de polimerização média
NGI	Nematoides Gastrointestinais
NIST08	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (versão 08 da biblioteca)
OE / OEs / EOs	Óleo essencial / Óleos essenciais / <i>Essential oils</i>
OEPH	Óleo essencial de <i>P. haitiensis</i>
OELd1 / OELd2	Óleo essencial de <i>L. dominguensis</i> primeira ou segunda coleta
OEPo1 / OEPo2	Óleo essencial de <i>P. racemosa</i> var. <i>ozua</i> da primeira ou segunda coleta
OPG / opg	Ovo per grama de fezes
PAs	Proantocianidinas
PCs	Procianidinas

PDs	Prodelfinidinas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI / IP	Iodeto de propídio / <i>propidium iodide</i>
Ph / P.h.	<i>Pimenta haitiensis</i>
Po / P.o.	<i>Pimenta racemosa</i> var. <i>ozua</i>
Po1 / Po2	Extrato bruto obtido em 2020 (1ª coleta) e extrato bruto obtido em 2021 ou (2ª coleta), respectivamente
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
PVC	<i>Packet cell volume</i> (Volumem de células compactadas ou hematócrito)
QE	Equivalentes de quercetina
RCOF	Redução da contagem de ovos nas fezes
RD / Rep. Dom.	República Dominicana
RI / IR	Índice de Retenção
RT / TR	Tempo de retenção nas análises de cromatografia
Sb / S.b.	<i>Simarouba berteroana</i>
Sb1 / Sb2	Extrato bruto de <i>S. berteroana</i> obtido em 2020 (1ª coleta) / extrato bruto de <i>S. berteroana</i> obtido em 2021 (2ª coleta), respectivamente
Sb2_100	Extrato bruto de <i>S. berteroana</i> da 2ª coleta administrado na dose de 100 mg/kg
Sb2_350	Extrato bruto de <i>S. berteroana</i> da 2ª coleta administrado na dose de 350 mg/kg
SI	Índice de similaridade
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeos únicos
TA / TAE	Ácido tânico / equivalentes de ácido tânico
Tween 80	Polisorbato 80 / <i>Polysorbate</i> 80
TBZ	Thiabendazol
UASD	Universidade Autónoma de Santo Domingo
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
UV-Vis	Luz ultravioleta visível em espectrofotômetro
VO	Via oral
Vol.	Volumem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
3.1	CAPITULO I: CHEMICAL COMPOSITION, ANTHELMINTIC ACTIVITY, AND MECHANISM OF ACTION OF <i>LIPPIA</i> <i>DOMINGUENSIS</i> MOLD. ESSENTIAL OIL ON <i>HAEMONCHUS</i> <i>CONTORTUS</i> .....	64
3.2	CAPITULO II: ANTHELMINTIC POTENTIAL OF <i>SIMAROUBA</i> <i>BERTEROANA</i> KRUG & URB. EXTRACTS AND FRACTIONS AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .	75
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>124</b>
4.1	ETAPAS FUTURAS.....	126
	<b>REFENRÊCIAS.....</b>	<b>127</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>140</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>160</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A criação de pequenos ruminantes vem representando, ao longo dos anos, uma atividade econômica e social de suma importância para muitos países do mundo, constituindo assim um dos meios de subsistência de diversas famílias (De Araújo *et al.*, 2010; Sargison, 2020). No Brasil, esse setor pecuário também é relevante, e apresentou um aumento de 9,11% no número de cabeças de caprinos entre os anos 2019 a 2023 (IBGE, 2024), e também de 10,78 % no número de cabeças de ovinos no mesmo período de tempo (IBGE, 2024).

No entanto, as doenças parasitárias causadas por nematoides gastrointestinais (NGIs) são o principal problema de saúde responsável por perdas econômicas e pela diminuição da produtividade destes sistemas produtivos (André *et al.*, 2018; Beleckè *et al.*, 2021). A espécie de NGI mais patogênica e que afeta diretamente a produção de pequenos ruminantes no mundo é *Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae) (Arsenopoulos *et al.*, 2021), sendo também a mais prevalente em países tropicais e subtropicais (Niciura *et al.*, 2020). *Haemonchus contortus*, é um nematoide hematófago que adere-se à mucosa do abomaso, alimentando-se de uma grande quantidade de sangue, causando assim uma anemia grave em elevadas infecções, capazes de matar um número significativo de animais do rebanho (Aguilar-Caballero *et al.*, 2011; Sanders *et al.*, 2020).

Além disto, o controle das infecções por *H. contortus* se torna dificultado devido a sua capacidade de desenvolver resistência anti-helmíntica (RAH) de maneira rápida às moléculas anti-helmínticas (Kotze; Prichard, 2016). Existem relatos de isolados de *H. contortus* resistentes a todas as moléculas sintéticas disponíveis no mercado (multirresistentes). O monepantel, um derivado do amino acetonitrila lançado ao mercado em 2008, teve seu primeiro relato de eficácia reduzida devido ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica em 2013, e o derquantel (espiroindol), lançado em 2010, teve seu primeiro relato de ineficácia em 2016 (Liu; Panda; Luyten, 2020). No Brasil, foi reportada a resistência ao monepantel em ovinos em 2016, sendo que anteriormente, já existiam reportes de resistência a benzimidazóis, lactonas macrocíclicas, e imidazotiazóis (Salgado; Santos, 2016).

Diante desse panorama, torna-se urgente o desenvolvimento e a implementação de novas alternativas de controle dessas verminoses (Sanders *et al.*, 2020). A fitoterapia, uma prática ancestral, tem se tornado nos últimos anos uma opção interessante para o tratamento de diversas doenças em pessoas e animais, devido a seus custos mais acessíveis em algumas regiões, além de serem produtos biodegradáveis e menos prejudiciais para o ambiente (Cañigueral, 2002; Chávez; Moctezuma; Herrera, 2017). Em nível global, o conhecimento

sobre etnomedicina e etnobotânica é considerado uma prioridade por instituições como: Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Internacional da Propriedade Intelectual (OMPI), Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) (Chávez; Moctezuma; Herrera, 2017).

As atividades biológicas e medicinais das plantas são atribuídas à síntese de metabólitos secundários presentes em seus órgãos (folhas, caules, frutos raízes, sementes, etc.) e incluem: compostos fenólicos, taninos, flavonoides, saponinas, alcaloides, terpenos, ácidos graxos, entre outros (Hadi *et al.*, 2021). Estes metabólicos são produzidos por essas plantas para se protegerem ou defenderem de agressores como insetos, vírus, bactérias, fungos e inclusive de predadores herbívoros (Bakkali *et al.*, 2008). Isto explica o grande potencial das plantas medicinais como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade sobre vários agentes infecciosos (de Melo *et al.*, 2020).

A República Dominicana possui uma ampla flora, e a tradição popular atribui inúmeras propriedades medicinais a diversas espécies (Liogier, 2000), assim como acontece no Brasil. Por tanto, vale a pena explorar plantas pouco estudadas que possuam potencial como fonte de medicamentos. Considerando os critérios quimiotaxonômicos e etnomedicinais, foram selecionadas seis plantas endêmicas da República Dominicana: *Pimenta racemosa* var. *ozua*, *Pimenta haitiensis* (Myrtaceae), *Lippia dominguensis* (Verbenaceae), *Simarouba berteriana* (Simaroubaceae), *Croton coronatus* e *Croton poitaie* (Euphorbiaceae), com o intuito de avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre vários estágios evolutivos de *H. contortus*. Procurou-se também determinar a composição química de extratos, frações e óleos essenciais e determinar a sua toxicidade aguda, incluindo duas avaliações *in vivo* com o extrato bruto de *S. berteriana* da 2ª coleta (o derivado vegetal mais promissor) em caprinos infectados naturalmente com NGI. Resumidamente, este projeto consta com dois capítulos, sendo o primeiro um artigo publicado sobre efeito anti-helmíntico *in vitro* e a toxicidade do óleo essencial de *L. dominguensis*. O segundo capítulo corresponde ao manuscrito a ser submetido, abordando o efeito anti-helmíntico *in vitro* de extratos e frações de *S. berteriana*. Os apêndices apresentam os resultados da atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo*, bem como a toxicidade dos derivados vegetais avaliados que não foram incluídos nos capítulos anteriores. Desta forma, este projeto apresenta informações relevantes e inéditas sobre o potencial dessas plantas como fonte de anti-helmínticos, evidenciando os derivados vegetais que podem ser considerados alternativas naturais promissoras para seu uso como vermífugos herbais por produtores de pequenos ruminantes

## 2 REVISÃO LITERATURA

### 2.1 RELEVÂNCIA DA PRODUÇÃO DE PEQUENOS RUMINANTES

O setor pecuário apoia aproximadamente um bilhão de pequenos agricultores em países de baixa e média renda (Alders *et al.*, 2021). Esse setor representa 40% do produto interno bruto agrícola e sua contribuição para a renda familiar nos países de baixa e média renda varia de 2% a mais de 33% (Alders *et al.*, 2021). A pecuária, especialmente de pequenos ruminantes, contribui para a sociedade humana fornecendo alimentos como leite e carne, fibras (lã), pele e outros benefícios. Os pequenos ruminantes desempenham um papel fundamental na subsistência agrícola nos países de baixa e média renda, com cerca de 80% da população global de pequenos ruminantes localizada nessas regiões (Anim-Jnr *et al.*, 2023).

A produção de pequenos ruminantes é um componente muito significativo da produção pecuária em todo o mundo, pois os ovinos e caprinos representam aproximadamente 56% da população mundial de ruminantes (Monteiro *et al.*, 2018).

Os pequenos ruminantes têm se tornado cada vez mais importantes na produção pecuária das famílias rurais devido aos agricultores reconhecerem que os pequenos ruminantes oferecem oportunidades alternativas para aumentar sua renda (Wodajo *et al.*, 2020). Embora os sistemas de produção de gado e de pequenos ruminantes sejam quase igualmente eficientes, se o capital para a produção for limitado, a criação de pequenos ruminantes é viável para muitos pequenos agricultores (Wodajo *et al.*, 2020). Além do menor investimento de capital, as cabras e ovelhas apresentam outros benefícios comparado com a criação de gado: têm ciclos de reprodução e tempos de engorda mais curtos e podem produzir vários filhotes por ano, proporcionando um retorno mais rápido do investimento, significando fluxos de caixa de prazo mais curtos (Jemberu *et al.*, 2022).

A criação de pequenos ruminantes é amplamente considerada como capaz de atender às necessidades globais de segurança alimentar sustentável em diversos sistemas agrícolas, principalmente em ambientes ecológicos sazonalmente limitados (semiáridos ou úmidos) que caracterizam muitos países de baixa e média renda (Sargison, 2020). Da mesma forma, os ovinos e caprinos têm capacidade de adaptação para sobreviver e produzir em ambientes difíceis, sejam eles áridos, de altitude elevada ou extremamente frios (Timon, 1985). Mais de 50% da população mundial de pequenos ruminantes está localizada em regiões áridas, o que indica a adaptabilidade desses animais a essas condições ambientais e sua futura adequação a regiões com previsão de aumento de temperatura (Monteiro *et al.*, 2018). Além disso, as

cabras e ovelhas são ainda mais adequadas para melhorar os meios de subsistência dos pobres devido ao seu tamanho manejável e com requerimentos nutricionais relativamente baixos para o crescimento e/ou a produção de carne (Assouma *et al.*, 2018).

### 2.1.2 Produção de pequenos ruminantes no Brasil

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), entre 2006 e 2017, o rebanho de cabras aumentou 16% (8,26 milhões de cabeças), enquanto o rebanho de ovelhas diminuiu ligeiramente, 2,8%. Neste tempo, destacou-se a importância da região Nordeste, onde se localizaram 92,8% das cabeças de caprinos e 65,5% das cabeças de ovinos, com um aumento de 18% para caprinos e 16% para ovinos desde 2006, compensando as reduções observadas em outras regiões do país (Guimarães *et al.*, 2022).

O número de fazendas seguiu a mesma tendência entre 2006 e 2017, com um aumento do número de fazendas de caprinos em uma taxa semelhante (16,4%), de 286.000 a 333.600 fazendas, aumentando também o número de fazendas de ovinos em 20%, de 430.000 para 526.000 unidades de forma geral no país, ainda que com predominância da região Nordeste, compensando assim as diminuições de fazendas observadas nas regiões de Minas Gerais e São Paulo, sudeste do país. Da mesma forma, em 2017, o número de animais comercializados (5,2 milhões de cabeças) gerou um valor comercial de cerca de US\$284 milhões, representando um aumento significativo comparado com 2006 (Guimarães *et al.*, 2022).

No último censo agropecuário realizado no Brasil (2023), foi também observado um aumento do número de cabeças de cabras, que evoluiu de 11.637.329 em 2019 para 12.891.493 em 2023 (incremento de 10,78%). Com relação as cabeças de ovinos também observou-se um aumento do número de cabeças de 19.971.802 em 2019 para 21.792.139 em 2023 (incremento de 9,11%), sendo a Bahia o maior estado produtor de ambas espécies (IBGE, 2024a; IBGEb, 2024). Depois da Bahia, os três maiores estados produtores de ovinos em ordem decrescente foram Pernambuco, Rio Grande do Sul e Ceará. O estado de Minas Gerais ficou na 17ª posição. Os três maiores estados produtores de caprinos em ordem decrescente, depois da Bahia, foram Pernambuco, Piauí e Ceará, com o estado de Minas Gerais ficando no oitavo lugar (IBGE, 2024a; IBGE, 2024b).

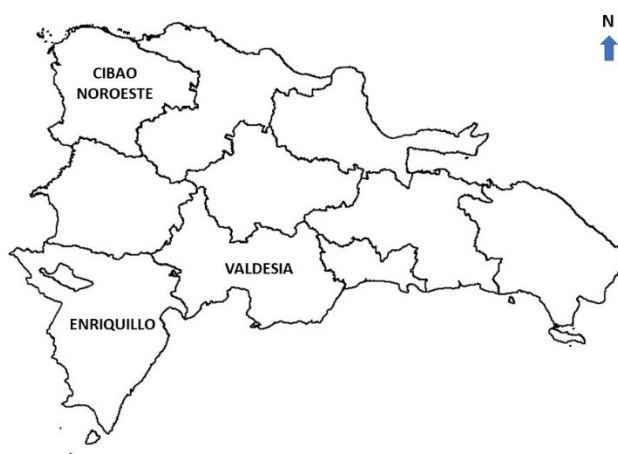
Esse aumento da produção de pequenos ruminantes e do volume de vendas é um bom indicador da profissionalização da atividade, pois mostra que a demanda pelo setor de carne ovina e caprina tem aumentado e, que ademais desses fatores, a criação de ovinos e caprinos se tornou numa fonte de renda monetária e não apenas uma atividade de subsistência

(Guimarães *et al.*, 2022).

### 2.1.3 Produção de pequenos ruminantes na República Dominicana

A produção de ovinos e caprinos na República Dominicana está concentrada nas regiões noroeste, sudoeste e central, onde mais do 60% dos animais e dos produtores de cabra e de ovelha estão concentrados (Valerio Cabrera, 2012), (Figura 1).

Figura 1 - Mapa político da República Dominicana com as 3 regiões com maior população de pequenos ruminantes



Fonte: Adaptado de: [www.johan-rosa.com](http://www.johan-rosa.com) (2019).

Estes sistemas pecuários são voltados principalmente para a produção de carne, e estão localizados em áreas econômica e socialmente vulneráveis, sendo a produção de caráter familiar, com baixo nível tecnológico e manejo tradicional, mantendo os animais no livre pastoreio (Angón *et al.*, 2013; Valerio Cabrera, 2012). Apesar do baixo nível tecnológico, esses sistemas de produção representam uma renda econômica de vital importância para os produtores dessas regiões marginais e de extrema pobreza (Figura 2).



Figura 2 - Rebanhos de caprinos na Província Peravia, República Dominicana



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Notas: A imagem à esquerda apresenta um rebanho de cabras sem estruturas para manejo e alojamento de animais; à direita um rebanho de cabras com estruturas para alojamento aceitáveis; ambos os rebanhos pertencem à cidade de Baní, com clima semiárido.

Por outro lado, a produção de carne de ovinos e caprinos na República Dominicana representa algo em torno de 4.000 toneladas/ano, vendidas no mercado local, cuja produção é insuficiente para suprir a demanda nacional (Valerio, 2012). Por essa razão, nos últimos anos vêm-se importando mais carne de ovinos e caprinos, destinadas principalmente aos hotéis, restaurantes e supermercados. Neste sentido, a criação de cabras e ovelhas oferece um mercado seguro para pequenos produtores (Quezada Delgado, 2016).

## 2.2 IMPACTO DE HELMINTÍASE NA SAÚDE E NA PRODUÇÃO ANIMAL

Os helmintos parasitos tem uma distribuição mundial, causando um impacto global na saúde humana e na produção agrícola e pecuária, sendo os países em desenvolvimento os mais afetados por estas infecções (Jayawardene; Palombo; Boag, 2021). Nos sistemas de produção de ovinos e caprinos, foi demonstrado que as infecções causadas por nematoides gastrointestinais (NGI) são responsáveis por uma redução de 30-50% no ganho de peso em animais em crescimento, nível de mortalidade geral de até 50%, uma redução de cerca de 20% na produção de leite e diminuição da produção de lã (Aguilar-Caballero *et al.*, 2013; Fthenakis; Papadopoulos, 2018). Dessa forma, conhecer o impacto econômico das infecções por helmintos, contribui para a realização e implementação de políticas públicas para seu controle a nível nacional e internacional.

As infecções por nematoides gastrointestinais provocam perdas econômicas significativas na indústria pecuária, porém são escassos os estudos que avaliem e demonstrem o impacto econômico dessas infecções (Charlier *et al.*, 2020). Em um estudo que avaliou as

perdas econômicas associadas a infecções por NGI em 30 países europeus, observou-se que, em ovelhas de corte, as perdas anuais foram estimadas em €372 milhões, e, em cabras leiteiras, em €86 milhões (Mavrot, 2016). Por outro lado, Charlier *et al.* (2020), estimaram o impacto econômico em um conjunto de três tipos de infecções de helmintos relevantes: nematoides gastrointestinais, *Fasciola hepatica* e *Dictyocaulus viviparus* em 18 países europeus, reportando um custo anual de € 1.8 bilhões (€ 1.0 – 2.7 bilhões). Além disso, 81% desses custos foi devido à perda de produção e 19% foi atribuído a custos por tratamento anti-helmíntico, com destaque do custo das infecções por nematoides gastrointestinais com resistência a lactonas macrocíclicas, estimado em cerca de €38 milhões anualmente. Segundo Charlier *et al.* (2020), a estimativa dos custos por setor pecuário por país e por ano das infecções por helmintos foram de €941 milhões em gado leiteiro, €423 milhões em gado de corte, €151 milhões em ovinos leiteiros, €206 milhões em ovinos de corte e €86 milhões em cabras leiteiras.

Desta forma, fica evidenciado que, sendo as helmintíases uma das condições limitantes mais importantes da produtividade do setor pecuário, a busca por alternativas de controle integrado dessas infecções resultasse-se extremamente necessária, principalmente considerando os apelos atuais não somente da economia da República Dominicana, mas também de diversos outros países para uma maior intensificação sustentável da produção pecuária capaz de atender às demandas de consumo de alimentos da população mundial crescente (Charlier *et al.*, 2014; Herrero; Thornton, 2013).

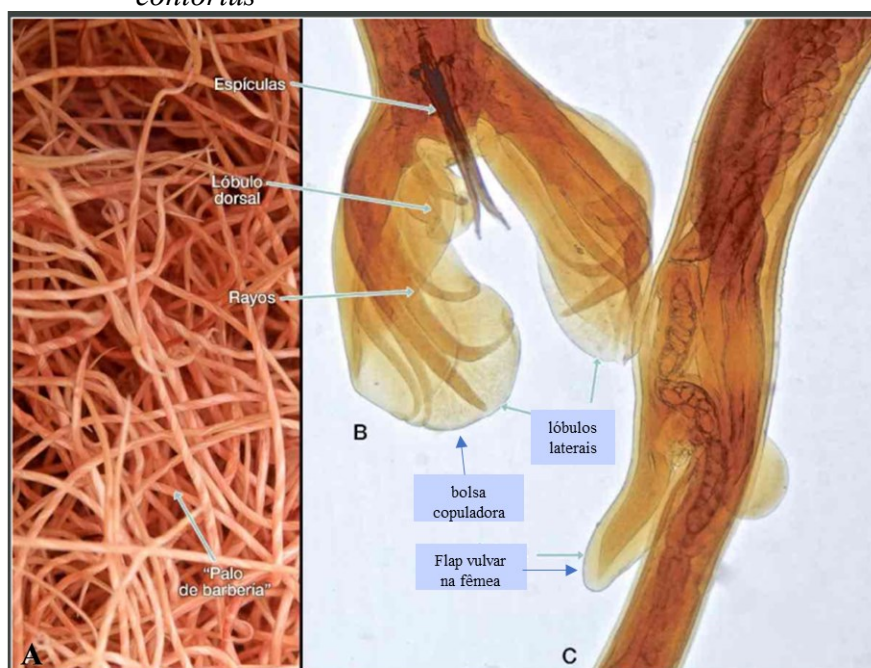
### 2.3 NEMATODÍASE INTESTINAL E HEMONCOSE

A hemoncose é uma doença causada por nematoides da espécie *Haemonchus contortus*, pertencentes à família Trichostrongylidae, afetando principalmente pequenos ruminantes (ovinos e caprinos). Outros gêneros de trichostrongylídeos são: *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Marshallagia*, *Cooperia* (Cepeda Martínez, 2017; Urquhart *et al.*, 2001). *Haemonchus* spp. e *Teladorsagia* spp. são os gêneros de helmintos parasitos mais patogênicos em pequenos ruminantes em todo o mundo (Arsenopoulos *et al.*, 2021). *Haemonchus* spp. é o mais frequente em países tropicais e subtropicais, com prevalência muito elevada em ovinos principalmente aqueles em livre pastoreio (Cordero del Campillo *et al.*, 2001; Niciura *et al.*, 2020). Por outro lado, *Teladorsagia* spp., um nematoide não hematófago, é mais prevalente em regiões de clima temperado (Arsenopoulos *et al.*, 2021; Craig, 2009).

As infecções por NGI geralmente são mistas, ou seja, com a participação de dois ou mais gêneros, afetando assim ruminantes domésticos, principalmente animais jovens e imunodeprimidos (López-Rodríguez *et al.*, 2023). Dentre todas as espécies, *H. contortus* se destaca por ser um nematoide que causa o maior impacto econômico por sua rápida forma de alimentar-se de sangue dos animais, causando anemia e morte de forma relativamente rápida (Sanders *et al.*, 2020). Outro aspecto importante que agrava sua patogenicidade é a capacidade de desenvolver resistência aos anti-helmínticos, qualidade esta que o tem convertido numa espécie de nematoide modelo para estudo da resistência anti-helmíntica (Geary; Sakanari; Caffrey, 2015; Herath *et al.*, 2021).

*Haemonchus contortus* tem cerca de 20 – 35 cm de comprimento quando adulto (fêmeas de 25 – 34 mm e machos de 19-22 mm) e de coloração vermelha devido ao conteúdo de sangue no seu interior (Figura 3). Seu órgão de predileção é o abomaso dos ruminantes (estômago verdadeiro), onde se adere à mucosa e a perfura para se alimentar de sangue. Na sua fase adulta, é capaz de extrair até 0,05 mL de sangue em 24 h (Cepeda Martínez, 2017; Urquhart *et al.*, 2001). Na figura 3 são apresentadas as características morfológicas de fêmeas e machos de *Haemonchus* spp. As fêmeas adultas possuem uma alta prolificidade sendo capazes de produzir de 5.000 – 10.000 ovos/dia/fêmea, os quais são expelidos pelas fezes (Cordero del Campillo *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2020).

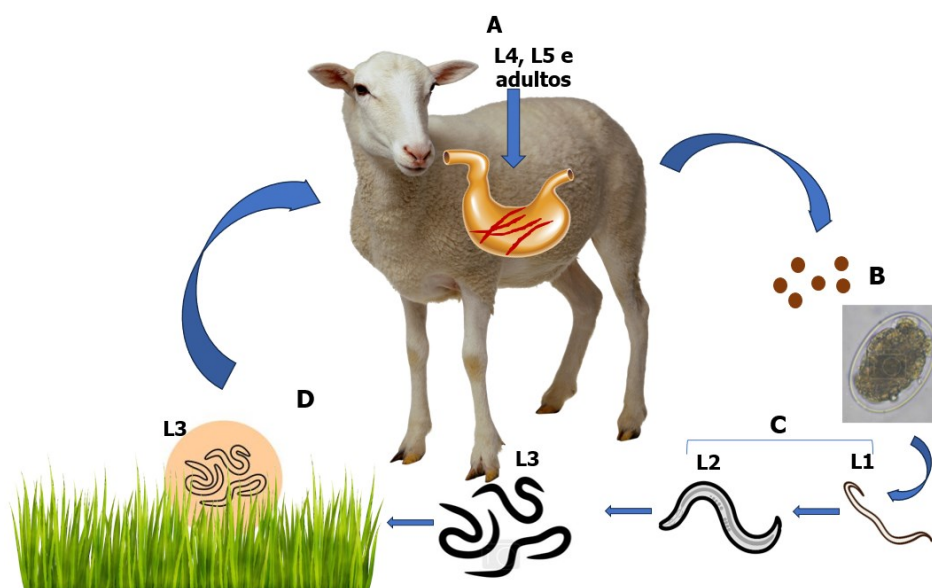
Figura 3 – Diferenças morfológicas entre espécimes machos e fêmeas de *Haemonchus contortus*



Fonte: Adaptado de Alcalá Canto *et al.* (2019).

De forma resumida, o ciclo biológico de *H. contortus* é o seguinte: os ovos são eliminados nas fezes dos animais parasitados, e dentro das primeiras 24 a 48 horas, dependendo da temperatura, umidade e oxigênio, os ovos liberam a larva de primeiro estágio (L<sub>1</sub>). Posteriormente, a L<sub>1</sub> muda para larva de segundo estágio (L<sub>2</sub>) dentro de 1 - 2 dias e depois a L<sub>2</sub> muda para larva de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) ou larva infectante em até cinco dias. As larvas permanecem na pastagem até serem ingeridas e assim, infectarem os animais. Elas podem sobreviver e permanecer ocultas no pasto por vários meses (Cordero del Campillo *et al.*, 2001). Cerca de 30 minutos após serem ingeridas, elas perdem a bainha no aparelho digestório do ruminante, mudam para o estágio 4 (L<sub>4</sub>) em 4 – 5 dias; esse período ocorre dentro da mucosa, especialmente na mucosa da região fúndica. Após esse período, as larvas entram no estágio 5 (L<sub>5</sub>) ou pré-adulta, até que a maturação sexual aconteça, chegando a assim à fase adulta dos nematoides. Após a cópula dos adultos, a fêmea inicia a postura de ovos fechando assim o ciclo. O tempo de pré-patência até a manifestação dos sintomas dura em média 17 - 21 dias, dependendo de vários fatores, incluído o estado imunológico do hospedador (Arsenopoulos *et al.*, 2021; Cordero del Campillo *et al.*, 2001) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema do ciclo biológico de *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes



Fonte: Criado pelo autor com imagens de várias fontes: <https://www.pngwing.com/es/free-png-bvuzw> (o ovino); <https://doi.org/10.7875/togopic.2022.526> (L<sub>2</sub>).

Legenda: A- Estádios de vida parasitária dentro do hospedeiro. B- Ovo do parasito liberado nas fezes do ovino; C- ovo, larva 1 e larva 2 no ambiente; D- Larva 3 na pastagem passível de ser ingerida e iniciar o ciclo.

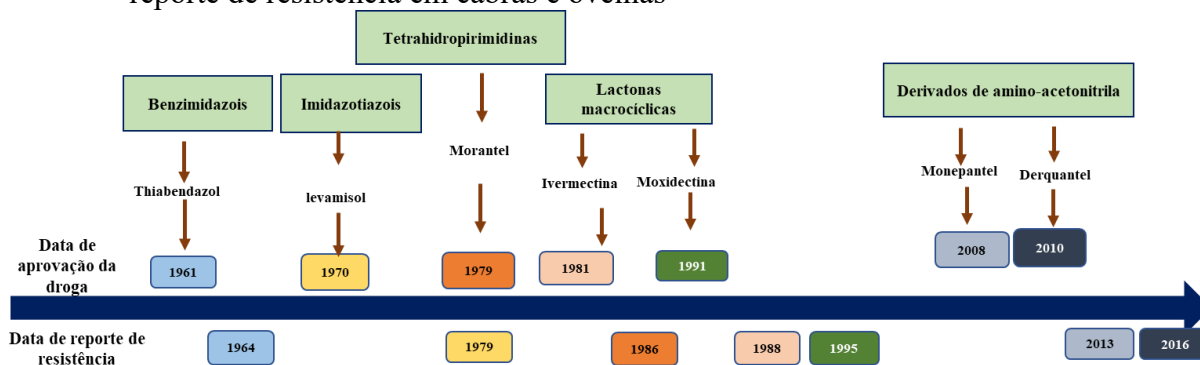
Por outro lado, é importante destacar que *H. contortus* possui algumas habilidades que facilitam sua sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis. *Haemonchus contortus* pode entrar em hipobiose devido às condições ambientais adversas de forma que as larvas de quarto estágio (L<sub>4</sub>) presentes nas mucosas possam sobreviver durante a longa estação seca em ovinos e caprinos, esperando que as condições climáticas sejam mais favoráveis (Arsenopoulos *et al.*, 2021). Além disso, *H. contortus* também pode entrar em hipobiose quando existem temperaturas muito frias (< 9° C), como nos invernos mais rigorosos, como no Norte dos EUA e Canadá, Nova Zelândia, sudeste da Austrália, norte da Europa, entre outros, ou até mesmo em condições de altas temperaturas ou de baixa umidade (< 70%) (Arsenopoulos *et al.*, 2021).

#### 2.4 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA (RAH)

A resistência a um fármaco ou composto antiparasitário é definida como a capacidade de uma população de parasitos em tolerar doses deste fármaco que seriam letais para a maioria dos indivíduos em uma população normal (suscetível) da mesma espécie (Nari *et al.*, 2003). Da mesma forma, a resistência é uma habilidade fundamental dos seres vivos de evoluir nas mudanças das condições ambientais para sobreviver em novas circunstâncias (Nari *et al.*, 2003). Em relação à resistência anti-helmíntica, esta pode ser compreendida como uma mudança na resposta a uma droga ou medicamento, de modo que a eficácia do tratamento é reduzida em relação ao obtido quando a droga foi liberada para seu uso (Kotze; Prichard, 2016-).

Os helmintos desenvolvem resistência aos anti-helmínticos (AH) sintéticos e semissintéticos e esse problema vêm aumentando devido aos resíduos desses compostos no ambiente e alimentos de origem animal (Salgado; Santos, 2016), ameaçando assim, de uma forma ou de outra, a saúde das pessoas. Essa situação se torna cada vez mais evidente à medida que a resistência continua se espalhando entre as populações de parasitos em todo o mundo. Por exemplo, a resistência ao mebendazol foi reportada apenas com três anos após sua introdução no mercado, e já existem relatos em vários países de resistência aos últimos fármacos anti-helmínticos desenvolvidos como o monepantel e derquantel (Liu; Panda; Luyten, 2020). Na figura 5, se mostram vários anti-helmínticos comerciais de uso veterinário, e o tempo em que foram reportados casos isolados de nematoides resistentes a estes medicamentos.

Figura 5 – Esquema das datas de aprovação de fármacos anti-helmínticos e data de primeiro reporte de resistência em cabras e ovelhas



Fonte: Adaptado de Liu; Panda; Luyten, (2020) e Jayawardene *et al.*, (2021). A resistência foi reportada 3 – 9 anos após a introdução dos fármacos no mercado.

Durante as duas últimas décadas, vários fatores causaram o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, dentre os mais destacados estão o uso inadequado de medicamentos disponíveis, e de forma indireta, a falta de desenvolvimento de novos fármacos (Keller; Lissarrague; Fiel, 2018). Por outro lado, resulta interessante ressaltar que, embora haja resistência de nematoides de bovinos e outras espécies, a maior prevalência de resistência no mundo é encontrada em ovinos e caprinos (Rodríguez Diego *et al.*, 2015).

Num estudo de revisão sistemática e metanálise, foi verificado o desenvolvimento de RHA de NGIs em muitos países de vários continentes como na Europa, na Oceania, na América do Norte e na América do Sul (Baiak; Lehnen; da Rocha, 2018). Entre estes países, o Brasil também possui vários estudos que confirmam a resistência de helmintos a várias classes de anti-helmínticos (Araújo-Filho *et al.*, 2021; Chagas *et al.*, 2016; Salgado; Santos, 2016).

O desenvolvimento de resistência é um processo complexo e inclui a possibilidade de alguns helmintos se tornarem resistentes a várias classes/grupos de anti-helmínticos (multirresistência). Para citar um exemplo, existem algumas cepas ou isolados multirresistentes de *H. contortus* (trichostrongylidae), como o isolado Kokstad, com resistência às três principais classes de anti-helmínticos: benzimidazois, lactonas macrocíclicas e imidazotiazóis (Charvet *et al.*, 2018). A multirresistência de NGIs é uma realidade preocupante e tem sido confirmada e/ou diagnosticada em vários países (Babják *et al.*, 2023; Bernuci *et al.*, 2016; Chagas *et al.*, 2016; Charvet *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2014).

Os helmintos conseguem resistir ao efeito dos anti-helmínticos por vários mecanismos



de ação, sendo eles:

- a) reduzindo o número de receptores;
- b) por deleção ou mutação de aminoácidos nos genes que codificam alvos de fármacos;
- c) por ausência de enzimas biotivadoras dos fármacos;
- d) expressão de transportadores de efluxo dos fármacos;
- e) incremento da metabolização dos fármacos; e
- f) incrementos na taxa de reparação celular/tissular (Kotze; Prichard, 2016-; Liu; Panda; Luyten, 2020).

A resistência anti-helmíntica pode ser diagnosticada por meio de características fenotípicas dos nematoides (por meio de testes de eficácia anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo*) (Coles *et al.*, 1992). Um dos testes mais utilizados para determinar RAH fenotípica é o método da redução da porcentagem de ovos nas fezes (FECRT) em pequenos ruminantes, conforme descrito por Coles e colaboradores (1992 e 2006). No entanto, este método detecta resistência somente quando pelo menos 25% da população de animais possui helmintos resistentes.

Outra forma de detecção de resistência anti-helmíntica é a utilização de testes moleculares para resistência genotípica, com o intuito de detectar mutações presentes (detecção de fragmentos de genes associados a resistência por meio de testes de reação em cadeia da polimerase – PCR alelo-específicas) ainda com baixa frequência na população, contribuindo para uma detecção precoce, e facilitando a monitorização da resistência (Chagas *et al.*, 2016; Mickiewicz *et al.*, 2020). Por exemplo, a resistência aos imidazotiazóis pode ser detectada por meio da expressão de um transcrito truncado (Hco-acr-8b) e com um indel de 63pb em um dos genes dos receptores de acetilcolina sensíveis ao levamisol (L-AchR1) (Hco-acr-8) (Chagas *et al.*, 2016). Por outro lado, a resistência de *Trichostrongylus colubriformis* aos benzimidazóis pode ser detectada por polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição da variante-1 do gene da  $\beta$ -tubulina (Mickiewicz *et al.*, 2020). Da mesma forma, a resistência de *H. contortus* aos benzimidazóis é diagnosticada por testes de PCR, de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no gene do isótipo da  $\beta$ -tubulina, sendo estes já bem conhecidos: F167Y, F200Y e E198A (Santos, J. M. L. *et al.*, 2017). Estes métodos moleculares tem sido utilizados em vários países do mundo, incluindo o Brasil, para detectar RAH, podendo-se detectar helmintos com resistência a várias classes de anti-helmínticos ao mesmo tempo (multirresistentes).

Considerando o número limitado de anti-helmínticos disponíveis, e o rápido

desenvolvimento de resistência dos helmintos, é evidente que existe uma urgente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos anti-helmínticos, em especial, aqueles com novos mecanismos de ação aos anti-helmínticos disponíveis (Abongwa; Martin; Robertson, 2017; Liu; Panda; Luyten, 2020).

## 2.5 REPORTES DE RESISTENCIA ANTI-HELMÍNTICA EM REPÚBLICA DOMINICANA

Na República Dominicana, não se tem realizado um estudo generalizado ou por regiões completas que mostrem a prevalência da RAH. Porém, existem alguns estudos sobre a resistência anti-helmíntica *in vivo* realizados em rebanhos específicos (em cidades de algumas províncias), que demonstram a mesma situação de resistência observadas no Brasil e em outros países do mundo.

Num estudo realizado com o rebanho de caprinos da estação experimental de Pedro Brand, São Domingos, do Instituto Dominicano de Investigações Agropecuárias e Florestais (IDIAF) foi detectada a resistência dos nematoides das cabras a fenbendazol (benzimidazol) e a ivermectina (latona macrocíclica), obtendo-se reduções de ovos de NGI nas fezes (RCOF) de 72,3% e 0%, e de 59,1% e 0%, respectivamente, após 7 e 14 dias de administração dos tratamentos. No mesmo estudo, o único anti-helmíntico eficaz foi o levamisol (imidazotiazol) com valores de RCOF de 100 e 97,1% nos dias 7 e 14 pós-tratamento (Medina; Figueroa; Espino-Ureña, 2017).

Da mesma forma, em outro experimento realizado com ovinos do rebanho da Estação Experimental de *Las Tablas*, Baní, do mesmo instituto (IDIAF) se avaliou a eficácia anti-helmíntica das mesmas classes de antiparasitários e foi observado que os ovinos tratados com ivermectina e fenbendazol tiveram reduções de ovos nas fezes menores a 77%, mostrando resistência para latonas macrocíclicas e benzimidazois (Solano; Díaz; Espino-Ureña, 2018). Neste estudo, levamisol apresentou uma redução de 84%.

O terceiro estudo foi realizado num grupo de cabras também da Estação Experimental de *Las Tablas*, realizados em dois momentos (verão e outono), administrando as mesmas classes de anti-helmínticos (Mejía; De Jesus Mosquea; Espino-Ureña, 2019). No verão, nos dias 7 e 14 após administrados os tratamentos, as RCOF foram: com ivermectina 14,8% e 61,5%, com fenbendazol 0% e 63,1% e com levamisol 27,3% e 73,5% respectivamente. No outono, as RCOF foram de 0% e 73,8% com ivermectina, 0% e 39,9% com fenbendazol e 52,3% e 53% com levamisol, sendo novamente realizada a avaliação nos dias 7 e 14 após



administrados os tratamentos, respectivamente. Desta forma, a situação de RAH nesses rebanhos resultou alarmante, considerando o método de determinação de resistência *in vivo* estabelecido por Coles *et al.*, (1992), sendo estes, aqueles que afirmam que um anti-helmíntico deve reduzir 95% ou mais a carga parasitária, de forma que não se considere que há resistência a dito produto.

Recentemente, em janeiro de 2024, no mesmo rebanho localizado em Pedro Brand, onde foi realizado o estudo de Medina e Figueroa sete anos atrás (2017), foi observado que as cabras tratadas com ivermectina não diminuem a carga parasitaria de NGI, indicando que a resistência a este fármaco ainda permanece.

Os principais problemas da criação de ovinos e caprinos são as baixas taxas de produção e altas taxas de mortalidade nos rebanhos. As doenças parasitárias são responsáveis pela diminuição crônica da produtividade sem que muitas vezes o produtor perceba seu efeito, até que o impacto negativo seja evidente (por exemplo, aumento na taxa de mortalidade). Quando falamos de infecções por *H. contortus*, podem observar grande número de mortes mesmo após poucos dias após o início das manifestações clínicas, devido à anemia grave (Sanders *et al.*, 2020).

## 2.6 PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS

Desde tempos imemoriais o homem tem desenvolvido conhecimentos sobre o uso de elementos dos reinos animal, vegetal e mineral com o intuito de preservar ou recuperar a saúde, tanto de humanos como de animais, e estes conhecimentos têm sido transmitidos por meio de gerações ao longo dos séculos (Trujillo Mascia, 2013). No entanto, o reino vegetal se destaca sobre os outros por sua grande riqueza, principalmente no desenvolvimento de diversos fármacos para o tratamento de doenças (Jayawardene; Palombo; Boag, 2021; Trujillo Mascia, 2013).

Os produtos naturais formam recentemente reconsiderados como um valioso recurso para a descoberta de fármacos, uma vez que possuem uma grande gama de propriedades químicas que muitas vezes os tornam bons candidatos para esta descoberta em comparação com compostos sintéticos (Herath *et al.*, 2021).

Considerando o número limitado de anti-helmínticos disponíveis e o rápido desenvolvimento de resistência dos helmintos, é evidente que existe uma urgente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos anti-helmínticos, em especial, aqueles com novos mecanismos de ação aos anti-helmínticos comerciais (Abongwa; Martin; Robertson, 2017;

Liu; Panda; Luyten, 2020).

### **2.6.1 Derivados vegetais como fontes de anti-helmínticos**

Atualmente, o uso de plantas medicinais tornou-se uma alternativa para o tratamento e controle de doenças tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. Estima-se que 80% da população mundial ainda depende de plantas para a atenção primária à saúde, e inclusive ainda hoje na medicina ocidental, apesar do progresso na química sintética, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos são derivados direta ou indiretamente de plantas (Romero-Benavides *et al.*, 2017). Com relação às infecções por helmintos, a medicina tradicional conta com múltiplas espécies de plantas catalogadas como eficazes, por tanto, no que respeita ao desenvolvimento de fármacos anti-helmínticos, as plantas representam uma fonte importante para continuar sendo investigada (Romero-Benavides *et al.*, 2017). É de se esperar que aumente a atenção em extratos de plantas para identificação de novos anti-helmínticos de forma significativa no futuro, à medida que a resistência anti-helmíntica aos medicamentos atuais aumente, como pode ser observado no aumento do número de publicações sobre estes temas nas últimas duas décadas (Jayawardene; Palombo; Boag, 2021). Da mesma forma, alguns extratos vegetais tem sido propostos como parte da alimentação de animais, por causa de seus efeitos em melhorar os parâmetros produtivos e reprodutivos (Hernandez-Alvarado *et al.*, 2018).

Ahmed *et al.*, (2023), num trabalho de revisão desde 2003 até 2022, reportaram 259 espécies de plantas de 36 países do todo o mundo, como fontes potenciais de fármacos anti-helmínticos, focado principalmente em helmintos gastrointestinais. Estes autores reportaram que tanto os extratos, frações de extratos, como óleos essenciais obtidos de diversas partes destas plantas (folhas, raízes, flores, frutos, caule/córtex, sementes, casca de sementes, assim como da planta completa), mostraram atividade anti-helmíntica, sendo testados principalmente *in vitro*, sobre um ou vários estágios dos parasitos (ovos, larvas e/ou nematoides adultos) (Ahmed *et al.*, 2023). Além disso, Ahmed *et al.* (2023) relataram os compostos químicos presentes nos extratos/frações e óleos essenciais das plantas testadas, aos quais foi atribuído seu efeito anti-helmíntico. Estes compostos com atividade biológica, neste caso atividade anti-helmíntica, podem ser conhecidos como metabólitos secundários.

### **2.6.2 Metabólitos secundários de plantas com atividade antiparasitária**

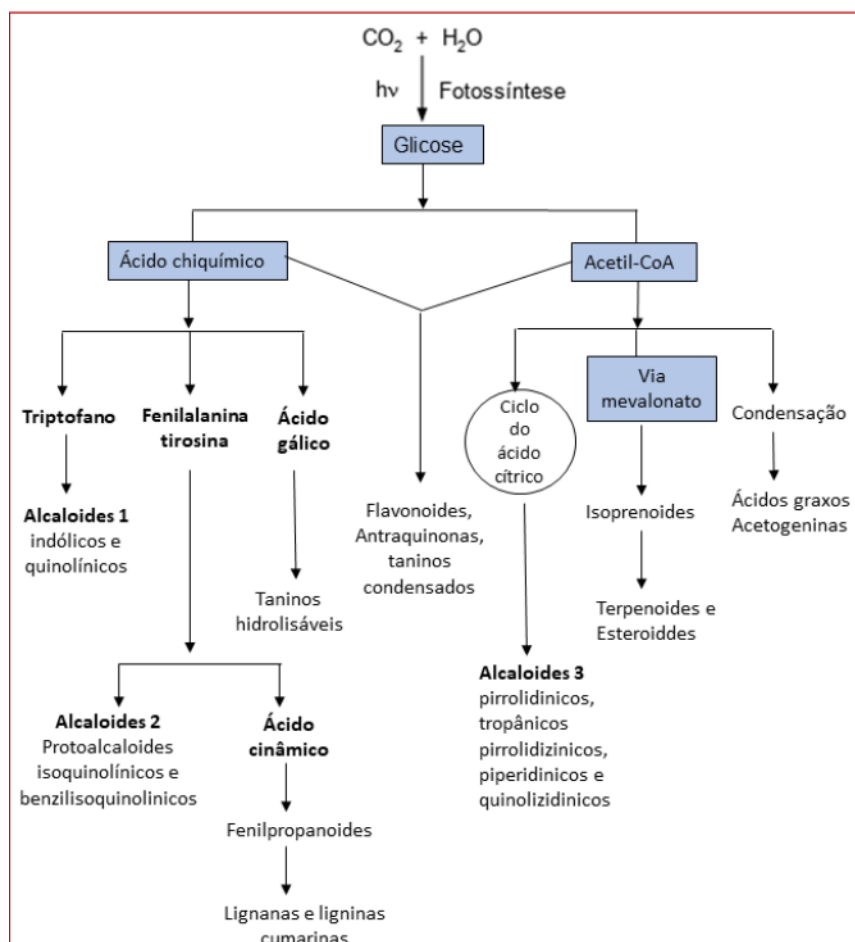
É importante explicar que todos os efeitos biológicos de uma planta (ou seus derivados vegetais) se devem à presença e concentração de substâncias químicas nos seus tecidos, chamados também de ativos vegetais ou fitoconstituintes, que são produtos oriundos de seu metabolismo. O metabolismo é o conjunto de reações químicas que acontecem no organismo, que fazem com que a vida seja possível (Morais; Pinto, 2021).

Nas plantas, o metabolismo pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. As reações químicas (de síntese e degradação de compostos) relacionadas com as funções básicas como a produção de energia, crescimento, desenvolvimento, reprodução são conhecida como metabolismo primário (Mayara Kloster, 2024).

Por outro lado, as reações metabólicas relacionadas à interação das plantas com o seu ambiente, assim como à proteção contra estresses bióticos e abióticos constituem o metabolismo secundário (Mayara Kloster, 2024). Assim, metabólitos secundários são todos aqueles compostos sintetizados por outras vias e que aparentam não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies (Morais; Pinto, 2021). De forma geral, são originados do metabolismo dos carboidratos que são formados no processo de fotossíntese, tendo como principais precursores o ácido chiquímico (chimidato) e acetyl-CoA (acetato) (Morais; Pinto, 2021) (Figura 6).

Os metabólitos secundários presentes na maioria das plantas podem apresentar atividade biológica variada: bactericida ou bacteriostática, anti-helmíntica (taninos, polifenóis e saponinas), anticancerígena, antioxidante e imunoestimulante (compostos fenólicos, saponinas, alcaloides e terpenos) (Jayawardene; Palombo; Boag, 2021; Mukherjee *et al.*, 2016).

Figura 6 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários de plantas



Fonte: Morais e Pinto (2021).

Ahmed *et al.*, (2023), relataram um grande grupo de compostos químicos presentes nos extratos/frações e óleos essenciais das plantas que estudaram, aos quais foi atribuído seu efeito anti-helmíntico; entre os compostos e metabólitos secundários identificados se encontraram: glucosídeos, tetrahydroharmina, taninos, galocatequinas, monômeros de epigalocatequinas, fitohemaglutininas, proteinases de cisteína, ácido ursólico, lipídeos (galactolipídios), aporfinas, hexilresorcinol, policarpol, 3-O-acetil ácido aleuritólico, concavalina A (lectina de feijão de porco) e plumbagina.

De forma geral, os principais grupos químicos comumente associados a atividade anti-helmíntica de derivados vegetais incluem: compostos fenólicos (que incluem os taninos e os flavonoides), terpenos, lipídeos, saponinas, alcalóides, cumarinas, lignoides (Liu; Panda; Luyten, 2020; Oliveira Santos *et al.*, 2019). Dentre todos estes compostos, destacam-se os taninos com relação a atividade anti-helmíntica sobre nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes, sendo descrito por meio de vários mecanismos de ação para esta subclasse química (Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2019). Embora a atividade anti-

helmíntica de várias espécies de plantas seja atribuída a metabólitos secundários que pertencem a alguma destas classes químicas, é importante apontar que podem existir variações na presença (concentração) destes compostos, entre plantas da mesma espécie, em dependência de condições ambientais e edafoclimáticas, na hora de coleta, e do estado fenológico da planta no momento de coleta (Mukherjee *et al.*, 2016).

Na sequência será feita uma breve descrição das principais classes químicas de metabólitos secundários derivados de plantas, com atividade anti-helmíntica descrita na literatura.

### 2.6.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem uma ampla classe química contendo diferentes tipos de constituintes com atividade anti-helmíntica reportada (Liu; Panda; Luyten, 2020; Mukherjee *et al.*, 2016). Os fenólicos incluem monofenóis ou terpenoides (timóis, cresóis e carvacrol), dióis de benzeno (catecois e resorcinóis), flavonóides (ex. quercetina) substitutos do ácido benzóico (ácido gálico e ácidos vanílicos) e ácidos cinâmicos (Garcia-Bustos; Sleeb; Gasser, 2019).

Os compostos fenólicos têm potente atividade antioxidante, a qual está relacionada à presença de anéis fenólicos em sua estrutura química e este efeito aumenta com o grau de polimerização (Fraga-Corral *et al.*, 2021; Molino *et al.*, 2020). Provavelmente, a atividade antioxidante dos fenólicos seja responsável por outras atividades biológicas relatadas dos compostos dessa classe (Garcia-Bustos; Sleeb; Gasser, 2019). A propriedade antioxidante é resultado da capacidade do grupo fenol de formar um radical fenoxi ao doar um átomo de hidrogênio, formando um ânion fenoxi capaz de eliminar/sequestrar radicais livres e participar de reações de quelação de metais (Garcia-Bustos; Sleeb; Gasser, 2019).

É importante apontar que desde o ponto de vista nutricional, os fenólicos podem ser classificados como solúveis (fenóis simples, flavonoides e taninos com baixo e médio peso molecular) e insolúveis (taninos condensados, ácidos fenólicos e outros polissacarídeos da parede celular ou compostos fenólicos de baixo peso molecular ligados a proteínas) (Mukherjee *et al.*, 2016). Desta forma, os fenólicos têm diferentes graus de absorção dependendo de sua solubilidade e, desta forma, podem apresentar diferentes atividades biológicas. Neste sentido, os fenólicos insolúveis não são digeridos e podem ser parcialmente metabolizados pela microbiota e, posteriormente, ser parcialmente absorvidos para exercer seu efeito, enquanto os fenólicos solúveis podem passar pelo intestino e serem absorvidos em

sua forma intacta ou podem ser metabolizados antes de exercer seu efeito biológico (Molino, 2021).

Faizi *et al.* (2011), avaliaram a atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre *Heterodera zae* de vários compostos fenólicos isolados de extratos de flores da *Tagetes patula* L. Estes autores observaram a relação da estrutura com a atividade anti-helmíntica, e apontaram que o efeito anti-helmíntico incrementava conforme aumentava o número de grupos hidroxila nos ácidos fenólicos (Faizi *et al.*, 2011). Resultados similares foram observados por Lima *et al.* (2021) ao avaliar o efeito anti-helmíntico de extratos e compostos isolados de *Pterogyne nitens* sobre ovos e larvas de *Haemonchus contortus*, eles apontaram que a adição do grupo hidroxila à estrutura flavonoide aumentou a atividade ovicida e larvicida inibindo assim a eclosão de ovos e o desenvolvimento larvar, respectivamente.

#### 2.6.3.1 Derivados de cinâmoil, cafeoil, galoil e polifenóis (flavonoides e isoflavonas)

O ácido cinâmico é um intermediário na biossíntese de outros compostos fenólicos, como os cumaratos, flavonoides e taninos. Vários derivados do ácido cinâmico têm sido reportados com atividade anti-helmíntica (Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019). Extratos obtidos de folhas de *Acacia cochliacantha* (México) com alta porcentagem de ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido p-coumárico e seus respectivos ésteres (similares a derivados do ácido cinâmico) apresentaram atividade anti-helmíntica *in vitro*, inibindo a eclosão larvar de *H. contortus* a 1 mg/mL, com 71 - 98% de inibição (Castillo-Mitre *et al.*, 2017).

Em outro estudo, foi testada a atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos etanólicos de folhas e frutos, assim como de compostos fenólicos isolados da *Pterogyne nitens*, sobre ovos e larvas de estágio 3 de *H. contortus*. Foi observado que entre os compostos avaliados, as flavonas (sorbifolina, pedalitina e a crisina) não apresentaram efeitos inibitórios sobre a eclosão larvar, embora apresentaram alguma atividade sobre o desenvolvimento larvar (Lima *et al.*, 2021). Em contraste, os flavonóis (quercetina, rutina e morina) apresentaram um potente efeito de inibição da eclosão larvar, e um efeito nulo sobre o desenvolvimento larvar. Adicionalmente, os ácidos fenólicos: cafeico, ferúlico e gálico apresentaram o efeito anti-helmíntico mais potente, com valores de EC<sub>50</sub> de 1,48, 0,56 e 4,93 µg/mL no teste de eclosão larval, e de 31, 22 e 33 µg/mL no teste de desenvolvimento larval, por tanto, estes ácidos fenólicos se apresentaram como os compostos mais promissores da planta *P. nitens* (Lima *et al.*, 2021). No mesmo estudo, Lima *et al.* (2021) analisando possíveis relações entre as estruturas químicas destes compostos e sua atividade anti-helmíntica, apontaram que a adição

de grupos hidroxila e grupos de rutina à estrutura flavonoide, aumenta a atividade ovicida e larvicida, respectivamente.

Por outro lado, alguns análogos do ácido gálico, como o ácido elágico e o ácido gentísico, isolados da *Anogeissus carpus*, apresentaram atividade anti-helmíntica sobre *C. elegans* (resistente ao levamisol) e sobre o nematoide filarial bovino *Onchocerca ochengi* (Ndjonka *et al.*, 2014). O ácido elágico foi o composto que apresentou o maior efeito anti-helmíntico sobre *C. elegans* resistente ( $IC_{50} = 90 \mu M$ ) e sobre *O. ochengi* ( $IC_{50} = 30 \mu M$ ). Além disso, os autores observaram que o ácido elágico apresentou um bom perfil de segurança em ratos, e em consequência, apontaram que o ácido elágico poderia representar um ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos anti-helmínticos.

Os isoflavonoides deguelina e rotenona comumente isolado de plantas da família Leguminosae, têm sido reportados como compostos com atividade anti-helmíntica sobre larvas (L<sub>3</sub>) de *H. contortus*, e por mostrar várias atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, apoptótica e inseticida (Garcia-Bustos; Sleeb; Gasser, 2019). Como a deguelina é mais benigna ou segura para células de mamíferos quando comparado com a rotenona, a deguelina tem sido mais estudada. Num estudo foi observado que a deguelina apresentou  $IC_{50}$  de  $14 \mu M$  e  $0.004 \mu M$  sobre larvas L<sub>3</sub> desembainhadas e sobre L<sub>4</sub> de *H. contortus* no teste de motilidade as 72 horas (Dilrukshi Herath *et al.*, 2017).

#### 2.6.3.2 Taninos

Dentre os fenólicos, os taninos representam o subgrupo mais estudado no que diz respeito ao seu efeito ou modo de ação sobre NGIs de pequenos ruminantes (Oliveira Santos *et al.*, 2019). Os taninos são um subgrupo de polifenóis com uma grande diversidade estrutural, possuindo alta afinidade por proteínas e polissacarídeos (Hoste *et al.*, 2006) e, geralmente, possuem peso molecular entre 500 e 20.000 Da. (Fraga-Corral *et al.*, 2021).

Estes compostos são metabólitos secundários muito importantes para as plantas, servindo de proteção contra o ataque de insetos, fungos, bactérias, assim como de predadores animais, além disso, também agem protegendo as plantas contra a radiação UV e radicais livres (de Araújo *et al.*, 2021). Estes compostos podem estar presentes em diferentes partes da planta como por exemplo nas cascas, na madeira, nas folhas, nas raízes, nas sementes, e nos frutos (Molino, 2021). Da mesma forma que os fenólicos, os taninos tem uma grande importância na indústria farmacêutica e alimentícia por possuir atividade antioxidante; estes compostos também tem a capacidade de formar complexos com várias macromoléculas como

proteínas, polissacarídeos (amido), fibras e outras moléculas (de Araújo *et al.*, 2021; Molino, 2021).

Com relação à estrutura química, os taninos se caracterizam por possuir vários grupos de hidroxila, o que lhes confere propriedades hidrofílicas, e solubilidade em solventes aquosos, por outro lado, possuem de 12 a 16 grupos fenólicos, de forma geral (de Araújo *et al.*, 2021). Os taninos podem ser divididos de forma clássica em dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis (HTs) e os taninos condensados (CTs) ou não hidrolisáveis (Figura 7) ou também chamados de proantocianidinas (PAs), dos quais, as PAs estão espalhadas de forma mais ampla na natureza do que os HTs (Nollet L; Guitierrez-Urbe, 2018). Porém, foi realizada nos últimos anos outra subclassificação considerando características químicas e propriedades estruturais, considerando que os taninos hidrolisáveis podem ser subdivididos em galotaninos e elagitaninos, ademais de outras duas classes de taninos, os taninos complexos e os florotaninos (Fraga-Corral *et al.*, 2021).

Os taninos hidrolisáveis (HTs) foram o primeiro grupo de fenólicos de plantas submetidos a estudos analíticos há mais de 200 anos (Arpista, 2012 *apud* Nollet L; Guitierrez-Urbe, 2018). Estes taninos obtiveram seu nome devido a serem solubilizados ou extraídos com água ou solventes orgânicos aquosos ou polares como o etanol, o metanol ou a acetona (Nollet L; Guitierrez-Urbe, 2018). Também os HTs podem ser hidrolisados empregando ácidos e bases fracas, produzindo dessa forma carboidratos e ácidos fenólicos dependendo da reação. Assim, são formados por unidades de ácido gálico glicosilados que podem ser ácido elágico (EA) ou ácido gálico (GA), desta forma, originam os elagitaninos (ETs) e galotaninos (GTs) respectivamente, sendo de forma geral, oligômeros de peso molecular relativamente baixo (500 – 3.000 Da) (Shirmohammadli; Efhamisi; Pizzi, 2018 *apud* Fraga-Corral *et al.*, 2021).

Os taninos condensados (CTs) ou não hidrolisáveis (proantocianidinas) representam >90% dos taninos comercializados e quimicamente são considerados polímeros ou oligômeros formados pela união de 3 a 8 unidades dos precursores flavan-3-ol (catequina) ou flavan-3,4-diol (leucoantocianidina) (Fraga-Corral *et al.*, 2021; Molino, 2021).

O grau de polimerização dos CTs pode variar entre duas a mais de cinquenta unidades, já os oligômeros e polímeros estão formados de duas a dez unidades de catequinas, constituindo assim uma ampla variedade de taninos condensados (Molino, 2021). As unidades monoméricas que representam os blocos de construção dos principais grupos de taninos condensados estão representadas na Figura 8.

Os taninos complexos (CoTs) são taninos com alto peso molecular e são formados pela

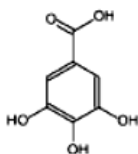


união entre flavan-3-óis com GTs ou ETs (taninos hidrolisáveis), e podem ser obtidos de espécies de plantas arbóreas como *Castanea sativa* (Okuda, 2011 *apud* Fraga-Corral *et al.*, 2021).

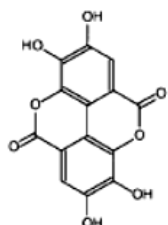
É importante relatar que, além de sua atividade anti-helmíntica e imunomoduladora indireta, os taninos podem atuar como potentes antioxidantes. Seu efeito antioxidante é exercido por vários mecanismos: atuando como antioxidantes primários, ou seja, sequestrando radicais livres (nos grupos hidroxila específicos), como antioxidantes secundários ou preventivos, atuando como agentes co-antioxidantes (regenerando ou impulsionando o sistema de defesa antioxidante) e inibindo/suprimindo catalizadores de oxidação, seja quelando ou inativando metais de transição ou inibindo enzimas pro-oxidantes (Molino, 2021).

Figura 7 - Taninos hidrolisáveis simples e estrutura básica (A) e taninos condensados e estrutura básica (B)

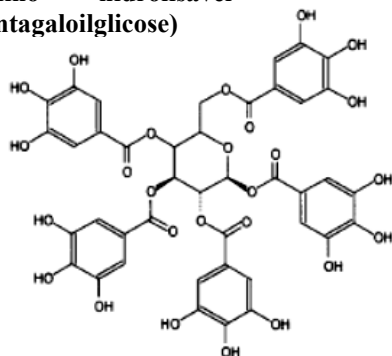
**A** Ácido gálico



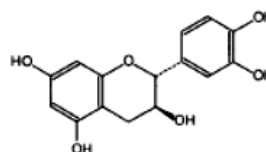
Ácido elágico



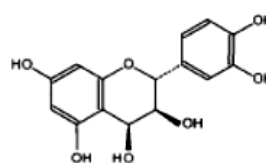
**Tanino hidrolisável (pentagaloliglicose)**



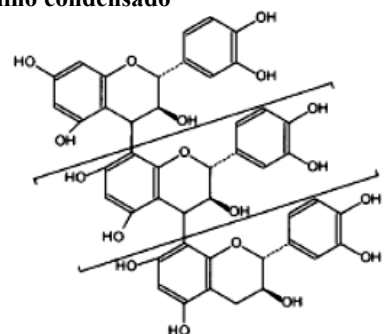
**B** Flavan-3-ol (catequina)



Flavan-3,4-diol

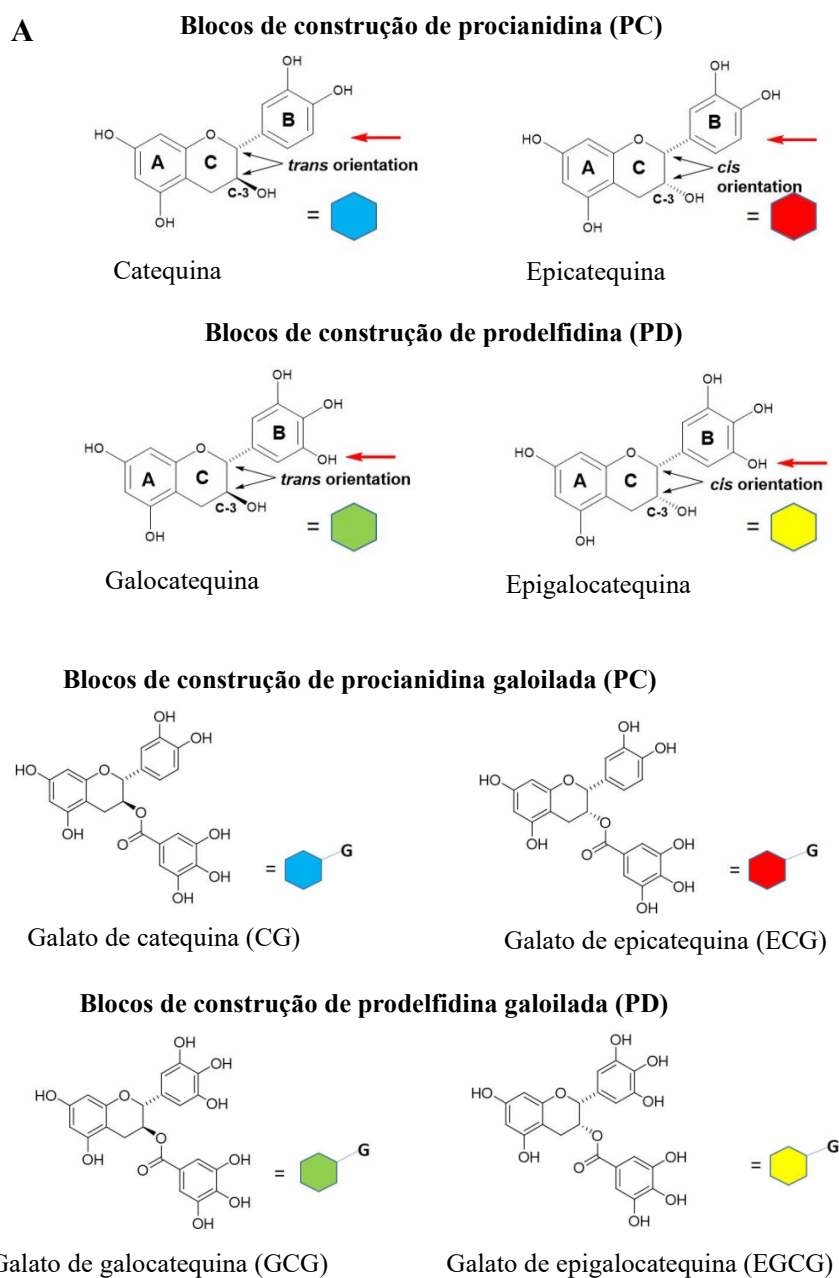


**Tanino condensado**



Fonte: adaptado de Tontini *et al.*, (2021).

Figura 8 - Subunidades de flavan-3-ol utilizadas como blocos de construção para a formação de taninos



Fonte: Adaptado de Zeller *et al.*, (2019).

Legenda: A) subunidades de flavan-3-ol utilizadas como blocos de construção para a formação de taninos condensados,

B) subunidades de construção de TC com grupos galoil (G), encontrados comumente em foragens e alguns alimentos.

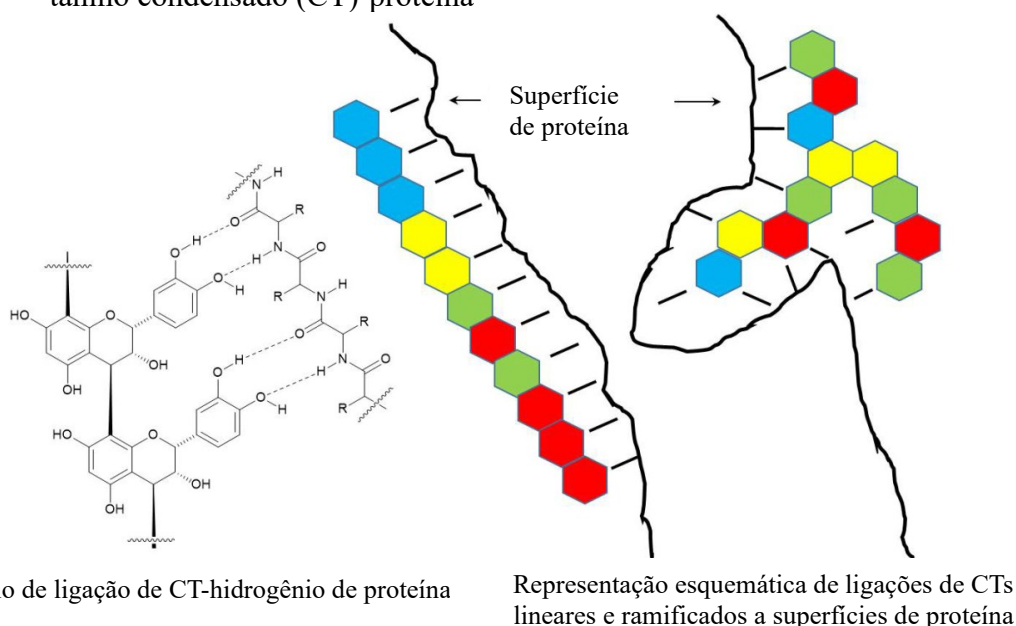
#### 2.6.3.2.1 Modo de ação de taninos sobre helmintos parasitos

Tem sido relatados dois mecanismos por meio dos quais os taninos exercem seu efeito anti-helmíntico, um indireto e outro direto. O mecanismo indireto consiste no melhoramento

da resposta do hospedeiro contra as infecções de parasitos. Isto pode ser explicado pelo fato de que os taninos se ligam a proteínas, e desta forma, protegem as proteínas da degradação no rúmen, incrementando o fluxo de proteínas ao estômago verdadeiro (abomaso) e ao intestino, facilitando a absorção de aminoácidos (Hoste *et al.*, 2006). Em consequência, o incremento no suprimento de proteína no intestino e de outros nutrientes é conhecido por melhorar a homeostase do hospedeiro e sua resposta imune contra agressores, incluídos os nematoides, contribuindo para sua resistência/resiliência para este tipo de infecções (Hoste *et al.*, 2006). Além disso, alguns estudos *in vitro* também indicam que os taninos condensados (CTs) podem atuar diretamente e modular a atividades de células do sistema imune como os linfócitos T $\gamma\delta$ , e células dendríticas, melhorando potencialmente a resposta imune inata do hospedeiro (Williams *et al.*, 2017).

O segundo mecanismo de ação dos taninos sobre nematoides parasitos é o mecanismo anti-helmíntico direto, que se relaciona com as características intrínsecas dos taninos que lhes conferem essa atividade anti-helmíntica. Essa hipótese tem sido demonstrada por vários estudos que tem avaliado este efeito anti-helmíntico em testes *in vitro* sobre ovos, larvas e nematoides adultos de várias espécies (Hoste *et al.*, 2006; Martínez-Ortiz-De-Montellano *et al.*, 2019; Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2013). A capacidade dos taninos condensados de se ligar a proteínas e mudar suas características físicas e químicas (mudanças de conformação proteica), produzem mudanças nas estruturas e nas funções das proteínas ligadas a estes taninos, e isto é causado porque estas ligações (proteína-tanino), que formam complexos insolúveis que precipitam (Pizzi, 2021). Estes tipos de complexos podem ser formados por ligações não covalentes, sendo então forças secundárias de interação entre taninos e proteínas como as interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (Figura 9) (Pizzi, 2021).

Figura 9 - Representação do arranjo de ligações de hidrogênio envolvidas na complexação tanino condensado (CT)-proteína



Fonte: Adaptado de Zeller *et al.*, (2019).

Notas: diferenças potenciais na capacidade de ligação de CTs lineares vs. TC ramificados. As linhas pretas entre as estruturas esquemáticas de CT e proteínas indicam potenciais interações intermoleculares responsáveis pelas ligações.

Considerando que a cutícula dos nematoides é uma estrutura proteica rica em aminoácidos prolina e hidroxiprolina, que cobre toda a superfície do nematoide, assim como a cavidade oral, o esôfago, a cloaca e a vulva desses parasitos, a capacidade dos taninos de se ligarem a estes aminoácidos presentes nestas regiões dos nematoides explica as alterações estruturais que tem sido observadas em algumas imagens de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia eletrônica de transmissão (Martínez-Ortiz-De-Montellano *et al.*, 2019; Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2013).

Por outro lado, o efeito anti-helmíntico direto de taninos sobre larvas de nematoides também têm sido estudado. Esta mesma capacidade de taninos, especialmente os condensados, de se ligarem formando assim complexos com proteínas da cutícula das larvas de nematoides (L<sub>3</sub>), explica que em vários testes *in vitro*, seja reportada uma inibição total ou um atraso no processo de desembainhamento das larvas L<sub>3</sub> de espécies como *H. contortus* e *T. colubriformis*, impedido sua evolução para a larva de estágio 4 e, portanto, causando a morte destas larvas (Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Quijada *et al.*, 2015). Da mesma forma, o efeito de taninos e outros fenólicos sobre a inibição da eclosão da primeira larva dos ovos têm sido atribuído a ligação destes compostos as cascas dos ovos, impedindo a eclosão das larvas de primeiro estágio já formadas, ou também por meio da penetração da cobertura (membranas e casca) dos ovos, causando danos no embrião, que desencadearão sua morte (Cortes-Morales

*et al.*, 2022).

Por último, também se associa a capacidade de ligação de taninos a proteínas à inibição da atividade de algumas enzimas dos nematoides, interferindo em sua secreção ou excreção ao meio exterior, ou interferindo com enzimas envolvidas em vias metabólicas importantes para determinadas funções vitais dos nematoides em uma ou várias fases de seu ciclo biológico (Cortes-Morales *et al.*, 2019; Hoste *et al.*, 2006). Um exemplo disso é a capacidade dos taninos condensados (CTs) de inibir enzimas glutationa-S-transferases, que cumprem um rol muito importante na detoxificação de compostos xenobióticos por parte dos nematoides, que tem sido confirmada em experimentos *in vitro* com larvas de *Ascaris suum* (Hansen *et al.*, 2016).

#### 2.6.3.2.2 Relação estrutura atividade biológica de taninos

As prodelfinidinas (PDs) tem mais grupos fenólicos capazes de formar pontes de hidrogênio com proteínas do que as procianidinas (PCs) (Zeller, 2019) (Figura 9), e isto pode ser explicado desde que as PDs, que geralmente possuem maior grau de polimerização média (mPD) do que as PCs, apresentem uma maior atividade anti-helmíntica comparado com as PCs (Mueller-Harvey *et al.*, 2019). O efeito anti-helmíntico de quatro monômeros de flavan-3-ol, dois derivados de galoil e 14 frações de taninos condensados foram avaliadas por Desrues *et al.*, (2016) para definir quais estruturas químicas determinam o efeito antiparasitário sobre larvas de primeiro estágio (L<sub>1</sub>) e nematoides adultos de *O. ostertagi* e *Cooperia oncophora* (principais nematoides de bovinos). Os autores observaram que o grau de polimerização (ex. o tamanho médio) dos CTs foi o fator estrutural mais importante, apontando que os CTs maiores reduziram mais a alimentação das L<sub>1</sub> do que os CTs menores, principalmente nas L<sub>1</sub> de *O. ostertagi*; os taninos flavan-3-óis do tipo prodelfidina (PD) (Figura 8B), tiveram uma influência maior no efeito anti-helmíntico do que a estereoquímica (ex. configurações *-cis* vs. *-trans*) (Figura 8A) ou do que a presença de grupo galato. Em contraste, com relação a *Cooperia oncophora*, foi observada uma redução maior da mortalidade de larvas e nematoides adultos com relação à porcentagem de PDs das frações de CTs e não teve muito efeito o tamanho dos CTs (Desrues *et al.*, 2016).

Têm-se observado que os taninos e outros fenólicos obtidos de algumas plantas causam alterações estruturais externas de nematoides assim como danos em tecidos subjacentes internos (células musculares e intestinais) observados por técnicas microscópicas com nematoides de *H. contortus* (Martínez-Ortiz-De-Montellano *et al.*, 2019) e com o

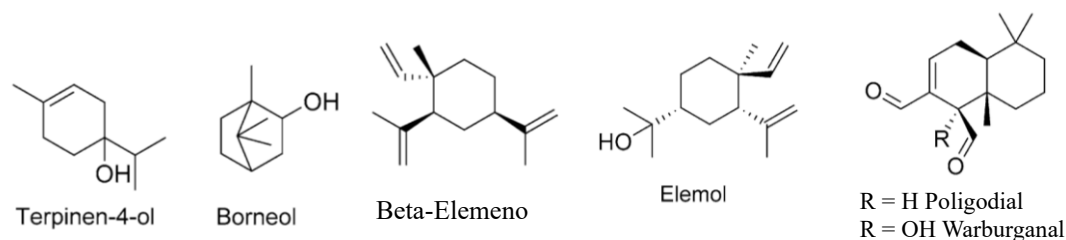
nematoide *Caenorhabditis elegans* (Ropiak *et al.*, 2016). Porém, ainda não se sabe se estas misturas de taninos condensados com compostos mais simples (quercetina, luteolina, cinnamaldeído, etc.) podem causar ambos os danos, internos e externos, ou se os danos internos podem ser resultado na interrupção do metabolismo do nematoide, causando necrose celular e tissular, considerando que os TCs são pouco absorvidos (baixa biodisponibilidade) em tecidos de mamíferos em comparação com outros compostos menores ou flavonoides monoméricos (Mueller-Harvey *et al.*, 2019). No entanto, TCs em conjunto com outros fenólicos menores: luteolina (flavona), a quercetina (flavonol) ou cinamaldeído, podem atuar de forma sinérgica sobre nematoides parasitos *in vitro* (Mueller-Harvey *et al.*, 2019; Ropiak *et al.*, 2016).

Ao respeito do efeito de CTs sobre a estimulação de células do sistema imune, a atividade imunomoduladora observada sobre células dendríticas e linfócitos T1 virgens dos TCs é altamente dependente do tamanho dos CTs assim como do mPD (grau de polimerização média), desde que TCs com mDP > 6, desencadeiam uma resposta imune mais forte do que os CTs com mDP < 6, e monômeros de flavan-3-ol tem reduzido ou nulo efeito (Williams *et al.*, 2017).

#### 2.6.4 Terpenos e terpenoides

Os terpenos são os produtos de condensação de pelo menos dois monômeros de isopreno (monoterpenos), sendo mais frequentes os de três (sesquiterpenos), quatro (diterpenos) ou seis (triperpenos) isoprenos (Garcia-Bustos; Sleeb; Gasser, 2019). Os terpenoides (isoprenoides) são terpenos modificados com mudanças de posição ou remoção de grupos metil, ou por adição de átomos de oxigênio (Mukherjee *et al.*, 2016). Os terpenoides (Figura 10) constituem o maior grupo de compostos naturais encontrados em plantas e algumas outras fontes, sendo estas substâncias voláteis e os principais responsáveis pelos odores de plantas e flores (Mukherjee *et al.*, 2016). Geralmente, os mono- e sesquiterpenos podem ser encontrados como os maiores constituintes de óleos essenciais de plantas (ex. Myrtaceae, Verbenaceae) e os di- e triterpenoides se encontram em resinas e goma de árvores, e os tetraterpenoides também conhecidos como “carotenoides” constituem um outro grupo de compostos (Mukherjee *et al.*, 2016).

Figura 10 - Estruturas químicas de terpenos (terpenoides, isoprenoides)



Fonte: Adaptado de Garcia-Bustos *et al.*, (2019).

Existem duas rotas principais de biossíntese de terpenos e terpenoides: uma é a utilização de ácido mevalônico (Figura 6) como um intermediário chave (via do mevalonato) e com uma via alternativa que resulta na produção de isopentil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato, que são os elementos de síntese principais, para a produção de terpenos de ordem superior (maiores), como os derivados prenil e triterpenóides (Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019). É importante destacar que os terpenos e terpenoides são susceptíveis de oxidação, originando os terpenoides oxigenados e, além disso, eventos de oxidação podem incluir a formação de lactonas, sesquiterpenos quinonas, hidroxil quinonas e epóxidos, sendo todos estes espécies reativas com atividade biológica no ambiente molecular adequado (Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019).

Tem sido relatado que vários terpenoides apresentam atividade anti-helmíntica, como o terpinen-4-ol presente no óleo essencial da *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), o qual mostrou atividade anti-helmíntica sobre *H. contortus*, inibindo a eclosão larvar *in vitro* com  $IC_{50} = 4,1$  mM e inibindo a migração de larvas L<sub>3</sub> em 83% a 22 mM (Grando *et al.*, 2016). Os terpenos borneol e  $\beta$ -elemeno, mostraram atividade anti-helmíntica sobre ovos e larvas de *H. contortus*, sendo o borneol mais ativo na inibição da eclosão de ovos, assim como na inibição do desenvolvimento e da migração larvar (Qi *et al.*, 2015).

Por outro lado, warburganal e poligodial, são dois sesquiterpenos estruturalmente relacionados, contendo duas metades aldeído (Figura 10), e estão presentes na planta *Warburgia ugandenses* (leste e sudeste de África). Foi realizado um estudo bioguiado com um extrato etanólico da planta por meio da detecção de atividade anti-helmíntica sobre um isolado de *C. elegans* resistente a anti-helmíntico, sendo warburganal e poligodial os constituintes com maior atividade anti-helmíntica (Liu *et al.*, 2018). Posteriormente, os autores testaram 18 análogos de poligodial para uma melhor compreensão dos elementos estruturais que tem impacto na sua atividade biológica, percebendo que a  $\alpha,\beta$ -insaturado 1,4-dialdeído do poligodial é essencial para uma atividade anti-helmíntica potente. Além disso, os

autores apontaram que o mecanismo de ação do poligodial é a inibição da síntese mitocondrial de ATP.

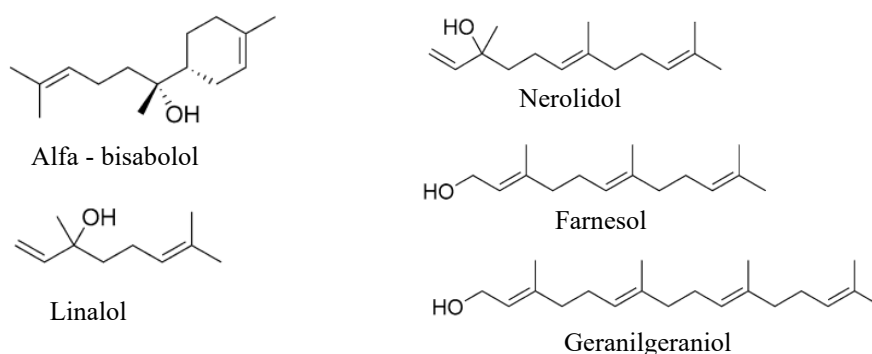
#### 2.6.4.1 Derivados de prenila

Os derivados de prenila são mono-, di- e sesquiterpenos lineares, e são produtos da biossíntese de isoprenóides da via não-mevalonato, estando presentes em algumas plantas. O álcool monoterpênico linalol (Figurar 11), presente em centenas de espécies vegetais, existe como uma mistura de dois enantiômeros aos quais se tem atribuído várias atividades biológicas (Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019).

O linalol, foi apresentado como ponto de partida químico para o desenvolvimento de medicamentos anti-helmínticos em conjunto com outros derivados vegetais (alfa-pineno, stricnina, vanilina, piperina, isoeugenol, curcumina, entre outros) (Azeez *et al.*, 2012; Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019). Todos estes compostos foram selecionados a partir de bases de dados de fitoquímicos e foram escolhidos considerando suas propriedades ADMET favoráveis, e posteriormente, foi realizado um *screening* computacional para confirmar se se ligavam com a estrutura química da enzima glutationa S-transferase (GST) do nematoide filarial *Brugia malayi*.

Posteriormente os compostos selecionados foram testados sobre uma preparação bruta de GST obtida do nematoide do coração *Dirofilaria immitis* na concentração de 1 µg/mL, obtendo-se uma inibição de 98% com o linalol, sugerido assim seu potencial como anti-helmíntico.

Figura 11 - Derivados de prenila (terpenoides lineais e terpenoides)



Fonte: Adaptado de Garcia-Bustos *et al.*, (2019).



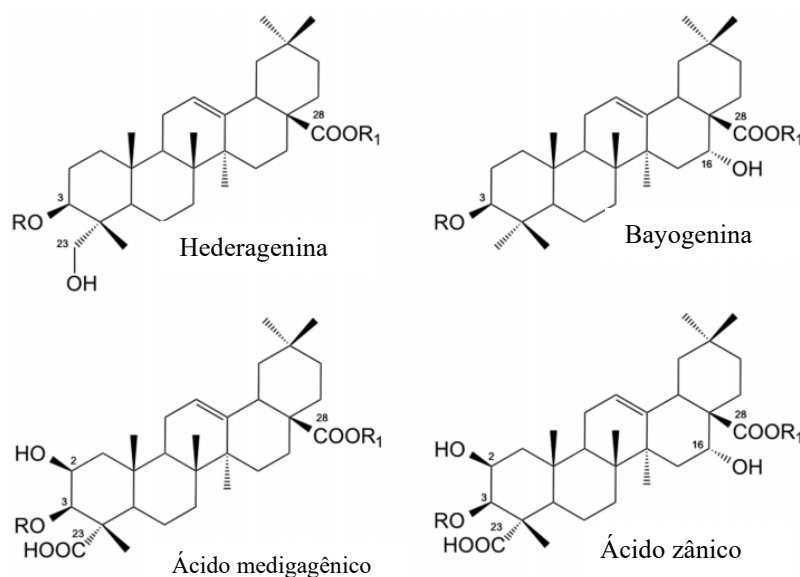
#### 2.6.4.2 Triterpenóides e glicosídeos triterpenóides (saponinas)

Os triterpenóides constituem uma grande classe de lipídeos naturais sintetizados a partir de um precursor de 30 carbonos, modificado por adição de heteroátomos (geralmente oxigênio) e ciclizações que geram tetracíclicos (ex. esteroides) ou pentacíclicos (ex. oleanatos). Sua conjugação com resíduos de açúcar produz glicosídeos anfifílicos, conhecidos como saponinas (Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019). Os triterpenóides tem grandes superfícies hidrofóbicas capazes de se ligar com afinidade relevante, com partes hidrofóbicas em proteínas, domínios de membrana ricos em esteróis e sítios de ligação de ligantes esteroides ou isoprenóides. Por tanto, os triterpenóides tem-se associado a inúmeras atividades biológicas (Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019). Por outro lado, enquanto as saponinas são solúveis em água e geralmente tóxicas, os triterpenóides não glicosilados livres tendem a ser menos tóxicos, mas são difíceis de se transformar em fármacos orais, principalmente por causa de sua pouca hidrosolubilidade (Garcia-Bustos; Sleebs; Gasser, 2019).

Existem alguns relatos sobre os efeitos anti-helmínticos de saponinas. Cavalcante *et al.* (2016) avaliaram o efeito anti-helmíntico *in vitro* de um extrato de acetato de etilo do látex de *Calotropis procera*, contendo três saponinas (urs-19(29)-en-3-yl acetato, (3 $\beta$ )-Urs-19(29)-en-3-ol, e 1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-glycerol) (Figura 12) e apontaram que possuía atividade de inibição da eclosão larvar, do desenvolvimento larvar e da motilidade de nematoides adultos de *H. contortus*. Porém, estes autores não testaram estas saponinas de forma isolada, e não foi determinado se o efeito anti-helmíntico observado foi devido a uma ou algumas destas saponinas ou até mesmo a outros dos componentes minoritários presentes no extrato da planta.

Em um outro estudo, foi demonstrado que várias saponinas obtidas de diferentes espécies de *Medicago*: *Medicago sativa*, *M. arbórea*, *M. polymorpha* do cultivar Santiago e *M. polymorpha* do cultivar Angola, apresentaram efeito anti-helmíntico *in vitro*, inibindo em mais de um 80% a eclosão larvar de nematoides gastrointestinais de asininos (jumentos) (Maestrini *et al.*, 2019).

Figura 12 - Estrutura química de saponinas detectadas em extratos de *Medicago* spp. com atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre estrogilídeos gastrointestinais de asininos



Fonte: Adaptado de Maestrini *et al.*, (2019).

Notas: Saponinas: R = açúcar ou cadeia açúcar, R1 = H: monodesmosídeos. R = R1 = açúcar ou cadeia carboidrato: bidesmosídeos.

Por outro lado, também é importante considerar que as saponinas apresentam toxicidade por via sistêmica (por efeitos hemolíticos), embora sua administração oral normalmente é segura (Liu; Panda; Luyten, 2020). Segundo Garcia-Bustos *et al.*, (2019), nenhum novo nematocida triterpenóide foi relatado nos últimos anos, e isto pode ser atribuído a sua efetividade relativamente baixa além de apresentar estreitas janelas de seletividade em testes *in vitro* anti-helmínticos.

## 2.6.5 Plantas medicinais da República Dominicana

A Hispaniola conta com muitas plantas as quais são atribuídas várias propriedades medicinais segundo a tradição popular (Liogier, 2000). Estima-se que aproximadamente um 32% das plantas de RD são endêmicas (MMARD, 2010) e que uma grande parte delas carece de estudos que demostrem suas atividades biológicas.

### 2.6.5.1 Potencial medicinal de plantas da família Myrtaceae

A família Myrtaceae Juss é considerada entre as angiospermas como uma das famílias mais numerosas do mundo, ocupando o oitavo lugar das plantas com flores, possuindo em

consequência uma importância ecológica e econômica relevante devido a sua produção de óleos essenciais (Contreras-Moreno, 2018). Desta forma, muitas das espécies vegetais que compõem esta família possuem propriedades medicinais comprovadas. O gênero *Pimenta* com 21 espécies é típico de América tropical e é um gênero que merecem destaque por possuir várias plantas com propriedades curativas. A maioria das espécies deste gênero são nativas da América Central, e podem ser arbustivas ou arbóreas. As propriedades farmacológicas são conferidas principalmente pelos óleos essenciais que possuem compostos que são, em sua maioria, derivados fenilpropanoides, monoterpenos, aldeídos monoterpênicos e álcoois monoterpênicos. Dentre as propriedades farmacológicas apresentadas por espécies desse gênero estão: anti-hipertensiva, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antioxidante (Paula *et al.*, 2010).

*Pimenta racemosa* var. *ozua* (Urb. e Ekm.) conhecida popularmente como Ozua é uma planta endêmica da ilha Hispaniola; a árvore pode chegar até 20 m (Figura 13). São cimosas de inflorescência, 3 flores ou 2 vezes tricótomas de até 9 flores (Germosen-Robineau, 2005). Esta planta se encontra principalmente em florestas da parte norte da cordilheira central, incluído a região de *San José de Las Matas*, *Monción* e *Loma de Cabrera* na República Dominicana. As folhas, por serem muito aromáticas são comumente utilizadas para os tisanas contra a gripe; além disso, também são utilizadas para líquidos desinfetantes (Liogier, 2000).

A decocção com sal de folhas da Ozua oralmente, é usada para dor abdominal, assim como para o controle de dores e inflamações articulares (Germosen-Robineau, 2005). De forma geral, os extratos das folhas da Ozua, são utilizados para as dores abdominais e indigestão (Germosen-Robineau, 2014). Por outro lado, extratos e óleos essenciais de plantas do gênero *Pimenta* incluindo os da Ozua foram testados para avaliar sua atividade inseticida *in vitro*, mostrando após os testes serem efetivos, indicando que estes óleos essenciais podem ser derivados vegetais promissores para seu uso como fitoterápicos em programas de manejo integrado de pragas de cultivos agrícolas (Mejía, 2017).

Figura 13 - Fotografias de *Pimenta racemosa* var. *ozua* e sua distribuição geográfica na República Dominicana



Fonte: Fotografias do arquivo pessoal (2021).

Notas: Da esquerda à direita, homem cortando caules para coleta de folhas de uma planta silvestre de *Pimenta racemosa* var. *ozua*; na imagem central: folhas com frutos de uma Ozua cultivada no Jardim botânico Nacional, localizado na República Dominicana e na imagem à direita: região onde pode ser encontrada Ozua de forma natural (La Leonor), na província Santiago Rodríguez, o mapa da Rep. Dominicana foi adaptado de mapasparacolorar.com (s.d.)

O terpeno lupeol está presente nas folhas da planta, e o extrato metanólico das folhas, apresentou atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva (Germosen-Robineau, 2005). Além disso, o óleo essencial da planta pode possuir monoterpenos como carvona, 1,8-cineol, citronelal, p-cimeno-8-ol, p-cimeno, geraniol, limoneno, linalol, oxido de cis-linalol, mirceno, nereal, trans-ocimeno, terpinen-4-ol, entre outros, assim como fenilpropanoides como o eugenol metil éter, iso-trans-eugenol metil éter (Germosen-Robineau, 2014).

*Pimenta haitiensis*, Urb., conhecida comumente como Canelilla, é outra árvore da Myrtales que produz óleos essenciais. *P. haitiensis* pode ser encontrada de forma natural exclusivamente em Oviedo, Pedernales (Clase, comunicação pessoal, fevereiro, 2020). A Canelilla é um arbusto que pode chegar a ter mais de cinco metros, folhas obovadas-oblongas de 3 – 6 cm, glandular, coriáceas, com poucas flores, lóbulos do cálice de 1 mm e baga de 8 mm de diâmetro (Liogier, 2000) (Figura 14). Suas folhas são muito procuradas pelos moradores da região para fazerem chás para os tratamentos de doenças respiratórias como gripe e dores de garganta, tendo um uso etnomedicinal semelhante a outras plantas do gênero *Pimenta*. Entretanto, existem poucos estudos sobre suas propriedades farmacológicas. Por outro lado, foi reportado que o óleo essencial da Canelilla possui 1,8-cineol (11,4 – 33,1%), Metil chavicol (11,7 – 41,4%), linalol (15,9 – 17,8%) e/ou metil eugenol (0 – 24,4%) como constituintes majoritários (Tucker *et al.*, 1991).

Figura 14 - Imagens de *Pimenta haitiensis* no seu ambiente natural em Pedernales, Parque Nacional Sierra de Bahoruco

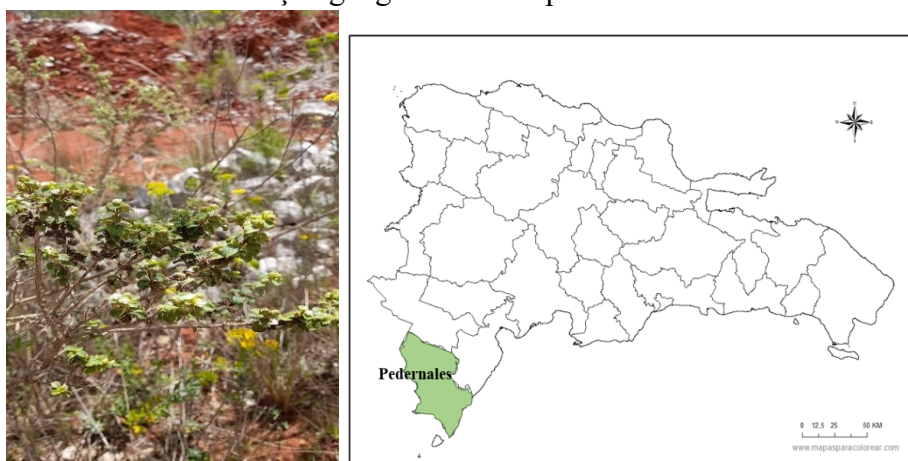


Fonte: A imagem da esquerda é do arquivo pessoal, (2020) durante a coleta de folhas; à imagem central é de López (2022) e o mapa da localização foi adaptado de mapasparacolorar.com (s.d.).

#### 2.6.5.2 Plantas da família Verbenaceae: *Lippia dominguensis*

*Lippia dominguensis* é uma planta da família Verbenaceae, endêmica na RD, localizada na região sudoeste do país, principalmente na província Pedernales (Figura 15), na reserva científica Sierra de Bahoruco. A *L. dominguensis* é um arbusto de porte baixo (1,3 metros) e muito aromático (Liogier, 1994).

Figura 15 - Fotografia de *Lippia dominguensis* com flores e frutos em seu ambiente natural e sua distribuição geográfica na República Dominicana



Fonte: fotografia do arquivo pessoal (2021); o mapa foi adaptado de: mapasparacolorar.com.

Embora não existam muitas informações publicadas sobre a atividade farmacológica nem sobre a composição química de *L. dominguensis* (Ld), o gênero *Lippia* tem muitas espécies bastante estudadas. Várias plantas do gênero *Lippia* tem apresentado atividade sobre doenças respiratórias e gastrointestinais, incluindo a diarreia e a disenteria (Nwanosike *et al.*,

2016). Essas propriedades biológicas relatadas são normalmente atribuídas aos principais compostos voláteis dos óleos essenciais, incluindo 1-8-cineol, terpineol, terpineno-4-ol, limoneno, timol, carvacrol e outros monoterpenoides relatados no gênero *Lippia* (Terblanché; Kornelius, 1996). Existe ainda na literatura vários estudos que demonstram que várias espécies do gênero *Lippia* possuem atividades anti-helmínticas ou antiparasitárias (André *et al.*, 2017; Dutra *et al.*, 2016; Katiki *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2020). Para citar alguns exemplos, o decocto de folhas e caules de *L. Berlandieri*, (comumente utilizada como expectorante) apresentou atividade antiprotozoária sobre *Giarida intestinales*. Além disso, a tintura da folha seca mostrou atividade antiparasitária *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum* e *Leishmania mexicana*, mas não sobre *Leishmania Brasilensis* (Germosen-Robineau, 2005). Por outro lado, França *et al.*, (2020), observaram que óleo essencial de *Lippia gracilis* possui atividade antifúngica, além das propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos óleos essenciais de várias espécies de *Lippia*.

Em um experimento avaliando o efeito anti-helmíntico *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial de *Lippia sidoides*, Camurça-vasconcelos *et al.*, (2007) indicaram que este óleo essencial inibiu a eclosão larvar de *H. contortus* em cerca de 99,9% a 1,25 mg/mL e também inibiu o desenvolvimento larvar de *H. contortus* em 90,2% na concentração de 10 mg/mL. No mesmo experimento, Camurça-Vasconcelos *et al.*, (2007) apontaram que o óleo de *L. sidoides* reduziu a carga parasitaria em 46,29, 57,62 e 68,94%, nas concentrações de 800, 1.200 e 1.600 mg/kg, em camundongos infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. Por outro lado, o extrato bruto metanólico e a fração de acetato de etilo do extrato de *Lippia graveolens* apresentaram efeito ovicida e larvicida sobre *H. contortus*, sendo a fração acetato de etila mais ativa, inibindo 100% a eclosão larvar a 1,56 mg/mL e inibindo o desenvolvimento larvar em 90% na concentração de 25 mg/mL (Olmedo-Juárez *et al.*, 2022).

Dois quimiotipos de óleos essenciais de *Lippia alba* foram avaliados com relação a seu efeito anti-helmíntico *in vitro*, demonstrando que tanto o quimiotipo citral (29,4% gerinal e 20,4% neral) quanto o quimiotipo carvona (70% D-carvona) inibiram a eclosão larvar de *H. contortus* (isolado multirresistente Kokstad) com IC<sub>50</sub> de 0,3 e 0,2 mg/mL respectivamente (Barbosa *et al.*, 2023). Barbosa *et al.* 2023 também observaram que o quimiotipo carvona e o quimiotipo citral causaram inibição da motilidade do nematoide adulto de *H. contortus* em 100%, sendo o citral a 1 mg/mL o carvona a 0,5 mg/mL, em 3 horas.

#### 2.6.5.3 Plantas da família Euphorbeaceae: *Croton coronatus* e *Croton poitaei*

O gênero *Croton* é um dos mais numerosos quando consideramos plantas que florescem e pertencente à família Euphorbiaceae. Esse gênero possui espécies que podem ser gramíneas, arbustos e até mesmo árvores, sendo parte constituinte da vegetação secundária nos trópicos e subtropicais em todo o mundo (Webster, 1993). O gênero *Croton* esta composto por cerca de 1.300 espécies ricas em constituintes químicos como: diterpenoides, alcaloides, compostos fenólicos e fenilpropanoides com diferentes atividades biológicas (Bezerra *et al.*, 2020; Simionatto *et al.*, 2009). Entre as atividades biológicas atribuídas aos compostos de *Croton* (principalmente compostos voláteis) incluem: antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, citotóxica, antitumoral, antinociceptiva, miorelaxante, antiespasmódica, ansiolítica, vasorelaxante, entre outras (Luu-dam *et al.*, 2023).

Outras atividades biológicas como os efeitos: antiparasitário, inseticida, protozoacida e anti-helmíntico também foram investigados em algumas espécies de *Croton*. Extratos de *Croton lechleri* possuem atividade antiparasitária *in vitro* potente, inibindo *Plasmodium falciparum* (cepa FCR3 resistente à cloroquina) segundo Yapu Gutierrez *et al.*, (2008). Lukoki Vunda *et al.*, (2012), determinaram que o óleo essencial de *Croton ericoides* (nativa do sudeste do Brasil), contendo b-pineno (39,0%) como principal constituinte, teve atividade amebicida sobre *Acanthamoeba*, matando 87% dos trofozoítos a 0,5 mg/mL, e o óleo essencial de *Croton pallidulus* (nativa do Brasil), teve um 29% de letalidade na mesma concentração. Por outro lado, Camurça-Vasconcelos *et al.*, (2007) também avaliaram o efeito anti-helmíntico *in vitro* do óleo essencial de *Croton zehntneri*, demonstrando que este inibiu a eclosão de ovos de *H. contortus* (>98%) na concentração de 1,25 mg/mL e, além disso, inibiu o desenvolvimento larvar em 90% na concentração de 10 mg/mL. Ademais, Camurça-Vasconcelos e colaboradores também observaram que o óleo essencial da *C. zehntneri* foi menos eficaz do que o óleo de *L. sidoides* na redução da carga parasitaria em camundongos infectados por *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. Na concentração de 800 mg/kg, o óleo da *C. zehntneri* apresentou uma eficácia de 11,64%, enquanto o de *L. sidoides* alcançou 46,69%.

Resulta importante destacar que, embora se disponha de alguns estudos de atividade biológica de algumas espécies de *Croton*, até o momento, não se dispõe de estudos com espécies de *Croton* endêmicas da Hispaniola.

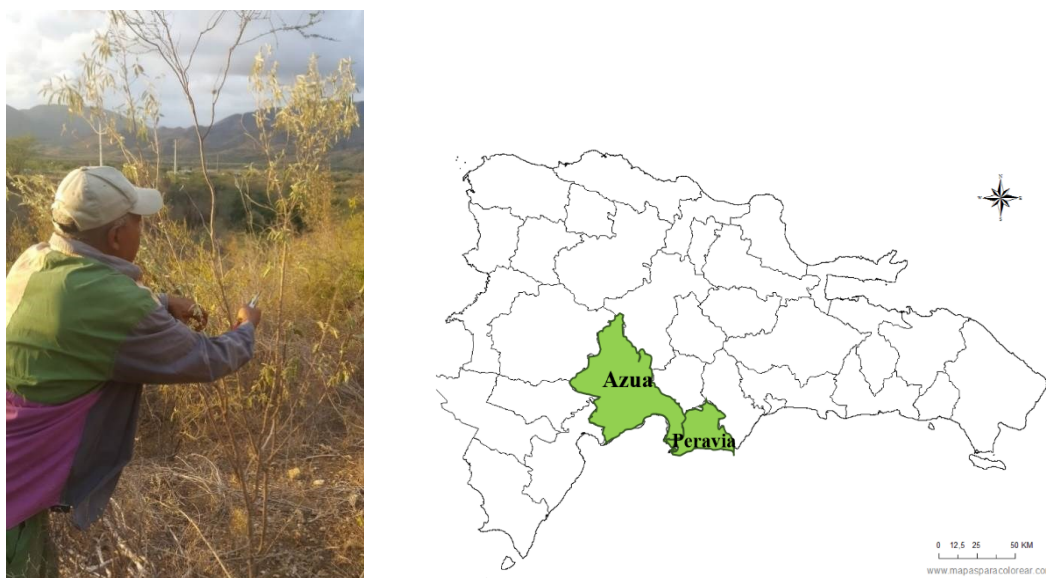
*Croton poitaie* Urb. são arbustos monóicos endêmicos da Hispaniola, comuns em lugares secos; possuem pelos irradiados, folhas lanceoladas de 1,5 a 3,5 cm (Liogier, 2000) (Figura 16). Esta planta pode ser encontrada de forma natural em áreas pouco povoadas das



Provincias de Azua e Peravia da República Dominicana (Figura 16).

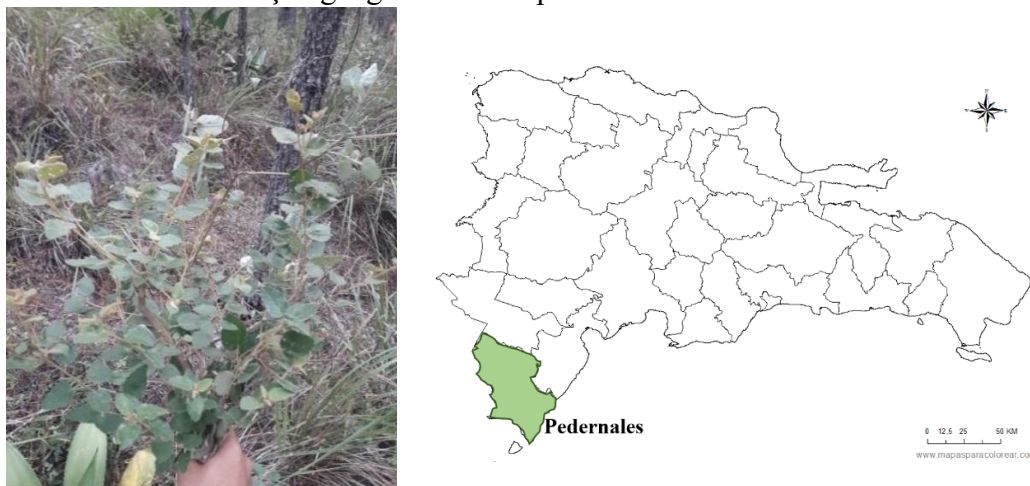
*Croton coronatus* Urb. é uma planta que foi descrita por Urb em 1912. Se encontra unicamente na República Dominicana e Haiti sem um nome comum conhecido, cujo sinônimo é *Croton inaequidens* Urb. (Ecured, 2022). Esta planta cresce principalmente no bioma tropical úmido (POWO, 2023), podendo ser encontrada próximo do Centro de Visitantes, na Serra de Bahoruco, Aceitillar, Hoyo de Pelempito, e Pedernales, na República Dominicana (Figura 17).

Figura 16 – Fotografia de *Croton poitaei* no seu habitat natural e sua distribuição geográfica na República Dominicana



Fonte: A imagem à esquerda é do arquivo pessoal (2020), e a imagem à direita foi adaptada de mapasparacolorear.com (s. d.).

Figura 17 - *Croton coronatus* em seu habitat natural em Hoyo de Pelempito, Pedernales e sua distribuição geográfica na República Dominicana



Fonte: A imagem à esquerda é do arquivo pessoal (2020), e a imagem à direita foi adaptada de mapasparacolorear.com (s. d.).



#### 2.6.5.4 Plantas da família Simaroubaceae: *Simarouba berteriana*

A família Simaroubaceae é composta por seis subfamílias, 20 – 30 gêneros e umas 200 espécies de árvores e arbustos distribuídos em regiões tropicais da América, da Ásia, da África e da Austrália de arque estão distribuídas (Mendez *et al.*, 2020; Thomas, 1990). Simaroubaceae está botanicamente relacionada com as famílias Rutaceae, Meliaceae e Burseraceae, porém está mais relacionada com a Rutaceae no que respeita à composição química, a anatomia da madeira e a falta de ductos resinosos na casca e nos estames livres (Alves *et al.*, 2014). Difere das outras famílias pela ausência de cavidades secretoras de óleos essenciais nas folhas e partes florais e pela presença de quassinoides, uns compostos químicos exclusivos da Simaroubaceae originados pela degradação de triterpenoides (Alves *et al.*, 2014; Thomas, 1990).

O gênero *Simarouba* pertence à subfamília Simarouboidea, e está presente na Florida (USA), no México, nas Grandes Antilhas até na Bolívia e nos estados brasileiros de Minas Gerais e Espírito Santo. Possui três espécies claramente diferentes, que são endêmicas de três lugares diferentes: Cuba, Hispaniola e Porto Rico (Thomas, 1990).

*Simarouba berteriana* (Krug. & Urb.) é uma planta endêmica da Hispaniola que pode chegar até 20 metros (Figura 18). Possui folhas compostas, folíolos superiores lanceolados ou oblongo-lanceolados, obtusos, folíolos inferiores mais curtos, oblongos ou obovado, flores com corolas amareladas, fruto ovoide e com madeira branca, de fibra grossa, porosa e leve (PPA, 2012).

*Simarouba berteriana* é habitualmente achada nas florestas de transição de clima úmido para seco, próximos às costas e em baixa elevação (PPA, 2012), sendo observada em Pedernales, próximo da Lagoa de Oviedo.

Figura 18 – Fotografias de *Simarouba berteriana* em diferentes estádios fenológicos



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Notas: à esquerda árvore adulto com frutos no seu habitat natural, e à direita planta cultivada em Constanza.

A vasta gama de atividades biológicas das diferentes espécies da família Simaroubaceae se deve principalmente aos quassinoides, aos quais são atribuídas atividades antitumorais, antimaláricas, antivirais, anorexígenas, inseticidas, amebicidas, antiparasitárias e herbicidas (Alves *et al.*, 2014).

Com relação a outras espécies do gênero *Simarouba*, as folhas de *Simarouba glauca* tem alcaloides e que são usadas em doenças cutâneas: prurido e pediculose por fricção ou banhos com folhas (Germosen-Robineau, 2014). Espécies do gênero *Brucea* (extrato metanólico 80% dos frutos) demonstraram ter atividade antiprotozoária sobre *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* e sobre *Leishmania infantum* (Ehata *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi observado que extratos aquosos e etanólicos de caules e raízes de *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae), assim como seus quassinoides isolados neosergeolida e isobruceina B, apresentaram atividade anti-helmíntica *in vitro* causando letalidade de larvas de 3º estágio de *H. contortus* (Nunomura *et al.*, 2006),

Existem muito poucos estudos sobre atividade biológica e composição química da *Simarouba berteriana*. Devkota *et al.*, (2014) relataram que *S. berteriana* possui um novo canthin-6-um-9-methoxy-5O-  $\beta$ -D-glucopyranoside, sete alcaloides conhecidos, dois quassinoides e um neo-lignano conhecidos. Estes autores também relataram que alguns compostos desta planta inibiram a proliferação celular em uma linhagem de células tumorais de glioma maligno de camundongo com defeito de Nf1 (Neurofibromatose tipo 1) e p53. Com relação ao efeito anti-helmíntico da espécie *S. berteriana*, estes seriam provavelmente os primeiros estudos a serem realizados.

## 2.6.6 Critérios para seleção de plantas para avaliação de atividade biológica

Para definir se uma planta pode ser candidata para realizar estudos com relação a determinada atividade biológica, alguns critérios devem ser considerados. Entre estes critérios podem ser citados: o uso etnobotânico ou entomedicinal que a população faz da planta, a quimiotaxonomia da planta, assim como os resultados de efeitos farmacológicos ou atividade biológica de outras plantas pertencentes a mesma família ou gênero da planta de interesse (Rates, 2001).

### 2.6.6.1 Uso etnobotânico e etnomedicinal

A pesquisa etnobotânica é importante para a aquisição de conhecimento ecológico tradicional relacionado às plantas, bem como para incentivar o desenvolvimento de ambientes locais (Jarić *et al.*, 2024). Da mesma forma, o conhecimento tradicional sobre os usos medicinais ou terapêuticos das plantas está sendo cada vez mais levado em consideração para a busca de novos fármacos e produtos terapêuticos (Liu; Panda; Luyten, 2020).

### 2.6.6.2 Quimiotaxonomia

A quimiotaxonomia ou quimiosistemática é o estudo de como os compostos químicos ou grupos de produtos químicos produzidos por organismos vivos são distribuídos entre diferentes espécies de plantas relacionadas ou potencialmente relacionadas (Elbalola; Abbas, 2024). Portanto, este critério tem sido muito importante para classificar muitas plantas, assim como para o desenvolvimento de medicamentos a partir de recursos vegetais (Rates, 2001). Conseqüentemente, são considerados os compostos químicos presentes em plantas que pertencem aos mesmos gêneros e famílias, com uma atividade biológica particular para a seleção de plantas como candidatas a serem estudadas com relação à dita propriedade medicinal de interesse.

### 2.6.6.3 Efeitos biológicos comprovados de outras plantas homólogas

Algumas plantas podem ser consideradas para pesquisar determinada atividade biológica, levando em consideração estudos publicados de plantas do mesmo gênero e/ou família que apresentaram aquela atividade biológica que se pretende avaliar. Este terceiro

critério é reforçado pela presença demonstrada de metabolitos secundários compartilhados entre espécies de plantas relacionadas (mesma família) (Rates, 2001).

## 2.7 SELEÇÃO DAS PLANTAS DO PROJETO

Como foi demonstrado nesta revisão de literatura, muitas outras plantas pertencentes aos mesmos gêneros e/ou famílias das plantas selecionadas neste projeto apresentaram atividade antiparasitária e anti-helmíntica em estudos anteriores. Da mesma forma, as plantas selecionadas para serem avaliadas neste projeto possuem relatos de usos terapêuticos relacionados ao controle de verminose, diarreia e/ou outros tipos de doenças gastrointestinais por parte de moradores das regiões onde são naturalmente encontradas. Ou, em seu lugar, outras plantas do mesmo gênero ou família apresentavam usos etnomedicinais envolvendo o tratamento contra helmintos e outras doenças parasitárias.

Com base nesses critérios quimiotaxonômicos e etnomedicinais, assim como nos efeitos biológicos demonstrados de outras plantas homólogas de diferentes regiões, sugeriu-se que os derivados vegetais das plantas propostas (óleos essenciais, extratos e frações) possuam um potencial medicinal que merece ser investigado, especialmente no que diz respeito ao controle de infecções causadas por helmintos gastrointestinais.

Com as informações geradas dos resultados deste projeto, se conhecem os derivados vegetais mais adequados para o controle de verminose em pequenos ruminantes por parte dos produtores. Assim, contribui-se para uma produção animal mais eficiente, sustentável e menos prejudicial aos consumidores, ao reduzir a introdução de resíduos de fármacos sintéticos no meio ambiente. Ademais, o projeto busca contribuir para a valorização dessas plantas como recursos valiosos da biodiversidade da Hispaniola, que merecem ser protegidos, promovendo o uso racional e sustentável das mesmas.

### 3.1 CAPITULO I: CHEMICAL COMPOSITION, ANTHELMINTIC ACTIVITY, AND MECHANISM OF ACTION OF *LIPPIA DOMINGUENSIS* MOLD. ESSENTIAL OIL ON *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Artigo científico publicado em julho de 2023, na revista Chemistry and Biodiversity, fator de impacto (2023): 2.3, ISBN Online ISSN:1612-1880, Print ISSN:1612-1872

DIO: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300135>

O artigo original, tal e como foi publicado, está anexo a esta tese.

doi.org/10.1002/cbdv.202300135

Research Article



www.cb.wiley.com

## Chemical Composition, Anthelmintic Activity, and Mechanism of Action of *Lippia dominguis* Mold. Essential Oil on *Haemonchus contortus*

Marcos J. Espino Ureña,<sup>a, b, c, d</sup> Albert Katchborian-Neto,<sup>d</sup> Alexander Benítez Trinidad,<sup>b</sup> Maritza Ramírez Ramírez,<sup>e</sup> Manuel Vásquez Tineo,<sup>e</sup> José Vilemar de Araújo-Filho,<sup>f</sup> Wesley Lyeverton Correia Ribeiro,<sup>g</sup> Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco,<sup>h</sup> Lorena Mayana Beserra de Oliveira,<sup>i</sup> Claudia Maria Leal Bevilacqua,<sup>f</sup> Daniela Aparecida Chagas-Paula,<sup>d</sup> Claudio Viegas, Jr.,<sup>h</sup> and Marcos José Marques<sup>a</sup>

This study is dedicated to God, our families, Ing. Rosina Taveras Macarrulla and the Dominican Republic's sheep and goat farmers.

Gastrointestinal nematode parasitism is a major burden to small ruminant production globally, compounded by increasing anthelmintic resistance. Previous studies have identified essential oils (EOs) from the *Lippia* genus with antiprotozoal and anthelmintic effects. *Lippia dominguis* Moldenke (Ld), an endemic specie from the Dominican Republic, has similar popular uses, however, is chemically and pharmacologically yet uncharacterized. Here, we investigated the *in vitro* anthelmintic activity of LdEO and its ultrastructural effects on eggs and adult nematodes of *Haemonchus contortus* multidrug-resistant isolated. The GC/MS analysis showed linalool (33.85%), 1,8-cineole (30.88%), and  $\delta$ -terpineol (10.61%) as the main EO constituents.

The LdEO showed an  $IC_{50}$  = 0.523 mg/mL in the egg hatch test, and the motility in the adult worm motility test was 95.8% at 1 mg/mL. The confocal scanning laser microscopy of eggs indicated permeabilization or disruption of egg cell membranes as the possible mechanism of action of LdEO. The scanning electron microscopy of adult worms showed wrinkling, undulations, and cuticular disruptions. The LdEO displayed significant *in vitro* anthelmintic activity on eggs and adult worms of *H. contortus*. Additionally, the LdEO showed low oral toxicity in mice at 2,000 mg/kg. Thus, additional *in vivo* studies are justified to determine its anthelmintic efficacy in small ruminants.

### Introduction

Over the years the small ruminant production system showed relevant economic and worldwide social importance.<sup>1,2</sup> Some of the reasons why goats and sheep have become major

livestock economic resources in marginal environments are their ability to produce animal protein (e.g., meat and milk) with relatively high efficiency with a low nutrient requirement, at a low cost, and also in smaller spaces.<sup>3,4</sup> However, the sustainability and profitability of this type of livestock are

[a] M. J. Espino Ureña, M. J. Marques  
Department of Pathology and Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Gabriel Monteiro da Silva St., 700, 37130-001, Alfenas, Minas Gerais, Brazil,  
E-mail: marcos.urena@unifal-mg.edu.br  
marcosespino@gmail.com

[b] M. J. Espino Ureña, A. B. Trinidad  
Animal Production Center, Dominican Institute of Agricultural and Forestry Research, Duarte Av. Km 24, Pedro Brand, 340 parcel, Santo Domingo, Dominican Republic

[c] M. J. Espino Ureña  
Faculty of Agronomic and Veterinary Sciences, Autonomous University of Santo Domingo, Camino de Engombe St., 10904, Santo Domingo, Dominican Republic

[d] A. Katchborian-Neto, D. A. Chagas-Paula  
Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Gabriel Monteiro da Silva St., 700, 37130-001, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

[e] M. Ramírez Ramírez, M. Vásquez Tineo  
Institute of Chemistry, Science Faculty, Autonomous University of Santo Domingo, Alma Mater Av. Zona Universitaria, Santo Domingo, Dominican Republic

[f] J. Vilemar de Araújo-Filho, L. M. B. de Oliveira, C. M. L. Bevilacqua  
Laboratory of Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Dr. Silas Munguba Av., 1700, 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil.

[g] W. L. C. Ribeiro  
Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo St., 1127, 60430-275, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brazil

[h] D. de Souza Collares Maia Castelo-Branco  
Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Alexandre Baraúna St., 949, 60430-160, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brazil

[i] C. Viegas, Jr.  
Laboratory of Research in Medicinal Chemistry – FeQuim, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Jovino Fernandes Sales Ave., 2600, 37133-840, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300135>

# Chemical Composition, Anthelmintic Activity, and Mechanism of Action of *Lippia dominguensis* Mold. Essential Oil on *Haemonchus contortus*

Marcos J. Espino Ureña,<sup>\*[a, b, c]</sup> Albert Katchborian-Neto,<sup>[d]</sup> Alexander Benítez Trinidad,<sup>[b]</sup> Maritza Ramírez Ramírez,<sup>[e]</sup> Manuel Vásquez Tineo,<sup>[e]</sup> José Vilemar de Araújo-Filho,<sup>[f]</sup> Wesley Lyeverton Correia Ribeiro,<sup>[g]</sup> Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco,<sup>[h]</sup> Lorena Mayana Beserra de Oliveira,<sup>[f]</sup> Claudia Maria Leal Bevilaqua,<sup>[f]</sup> Daniela Aparecida Chagas-Paula,<sup>[d]</sup> Claudio Viegas, Jr.,<sup>[i]</sup> and Marcos José Marques<sup>[a]</sup>

This study is dedicated to God, our families, Ing. Rosina Taveras Macarrulla and the Dominican Republic's sheep and goat farmers.

Gastrointestinal nematode parasitism is a major burden to small ruminant production globally, compounded by increasing anthelmintic resistance. Previous studies have identified essential oils (EOs) from the *Lippia* genus with antiprotozoal and anthelmintic effects. *Lippia dominguensis* Moldenke (Ld), an endemic specie from the Dominican Republic, has similar popular uses, however, is chemically and pharmacologically yet uncharacterized. Here, we investigated the *in vitro* anthelmintic activity of LdEO and its ultrastructural effects on eggs and adult nematodes of *Haemonchus contortus* multidrug-resistant isolated. The GC/MS analysis showed linalool (33.85%), 1,8-cineole (30.88%), and  $\delta$ -terpineol (10.61%) as the main EO constituents.

The LdEO showed an  $IC_{50} = 0.523$  mg/mL in the egg hatch test, and the motility in the adult worm motility test was 95.8% at 1 mg/mL. The confocal scanning laser microscopy of eggs indicated permeabilization or disruption of egg cell membranes as the possible mechanism of action of LdEO. The scanning electron microscopy of adult worms showed wrinkling, undulations, and cuticular disruptions. The LdEO displayed significant *in vitro* anthelmintic activity on eggs and adult worms of *H. contortus*. Additionally, the LdEO showed low oral toxicity in mice at 2,000 mg/kg. Thus, additional *in vivo* studies are justified to determine its anthelmintic efficacy in small ruminants.

## Introduction

Over the years the small ruminant production system showed relevant economic and worldwide social importance.<sup>[1,2]</sup> Some of the reasons why goats and sheep have become major

livestock economic resources in marginal environments are their ability to produce animal protein (e.g., meat and milk) with relatively high efficiency with a low nutrient requirement, at a low cost, and also in smaller spaces.<sup>[2,3]</sup> However, the sustainability and profitability of this type of livestock are

[a] M. J. Espino Ureña, M. J. Marques  
Department of Pathology and Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Gabriel Monteiro da Silva St., 700, 37130-001, Alfenas, Minas Gerais, Brazil,  
E-mail: marcos.urena@unifal-mg.edu.br

marcosespino@gmail.com

[b] M. J. Espino Ureña, A. B. Trinidad  
Animal Production Center, Dominican Institute of Agricultural and Forestry Research, Duarte Av. Km 24, Pedro Brand, 340 parcel, Santo Domingo., Dominican Republic

[c] M. J. Espino Ureña  
Faculty of Agronomic and Veterinary Sciences, Autonomous University of Santo Domingo, Camino de Engombe St., 10904, Santo Domingo, Dominican Republic

[d] A. Katchborian-Neto, D. A. Chagas-Paula  
Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Gabriel Monteiro da Silva St., 700, 37130-001, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

[e] M. Ramírez Ramírez, M. Vásquez Tineo  
Institute of Chemistry, Science Faculty, Autonomous University of Santo Domingo, Alma Mater Av. Zona Universitaria, Santo Domingo, Dominican Republic

[f] J. Vilemar de Araújo-Filho, L. M. B. de Oliveira, C. M. L. Bevilaqua  
Laboratory of Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Dr. Silas Munguba Av., 1700, 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil.

[g] W. L. C. Ribeiro  
Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo St., 1127, 60430-275, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brazil

[h] D. de Souza Collares Maia Castelo-Branco  
Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Alexandre Baraúna St., 949, 60430-160, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brazil

[i] C. Viegas, Jr.  
Laboratory of Research in Medicinal Chemistry – PeQuiM, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Jovino Fernandes Sales Ave., 2600, 37133-840, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300135>



threatened by parasitic diseases<sup>[4]</sup> of which gastrointestinal nematodes (GIN) are responsible for the reduction of 30–50% of weight gain in growing animals, mortality of up to 50% and in adult females, reduction of ~20% in milk production.<sup>[5]</sup>

*Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae) is a helminth that represents the main GIN that affects small ruminants in the world, principally in tropical and subtropical regions.<sup>[6]</sup> This nematode is responsible for the death of a significant number of herd animals because when the animal ingests it with the grass, it adheres to the mucosa of the abomasum, and feeds on blood, causing severe anaemia in a few days, which is aggravated for a high prolificacy of adult females.<sup>[7,8]</sup> Besides, *H. contortus* can rapidly develop resistance to the anthelmintics used for its control.<sup>[9]</sup> The existence of strains of *H. contortus* resistant to all chemical classes of available synthetic anthelmintics has already been reported,<sup>[9,10]</sup> including monepantel, one of the latest molecules launched on the market. For these reasons, there is an urgent need for new alternatives capable of controlling GIN infections.<sup>[8,11]</sup>

In the last 20 years, the interest in phytobiotics or plant derivatives as alternatives for antibiotics and synthetic anthelmintics has significantly increased among researchers and nutritionists in animal production.<sup>[12]</sup> International organizations including the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the World Health Organization (WHO), and the World Organization for Animal Health (OIE) are promoting research in the development of natural therapeutic and prophylactic alternatives such as phytochemicals that include EOs and plant extracts.<sup>[13]</sup> Moreover, consumer interest is growing considerably and preference for safer animal products, organic or with fewer antimicrobial residues is in demand.<sup>[14]</sup>

EO are highly complex natural mixtures derived from several aromatic plants, generally with hundreds of components<sup>[15,16]</sup> that are of interest due to their biological activities such as antibacterial, anti-inflammatory, immunomodulatory,<sup>[16–18]</sup> antifungal anthelmintic, and antiprotozoal activity.<sup>[19–21]</sup> Dominican Republic (DR) has botanical endemism of 32%,<sup>[22]</sup> of which most have not been studied concerning their biological activity or their chemical composition, despite the great amount that possesses traditional popular medicine uses in humans or animals.<sup>[23]</sup> In that context, *Lippia domingensis* Moldenke (Verbenaceae) is an endemic 1.3 m aromatic bush, from Pedernales Province at the DR, traditionally used as a condiment and for respiratory disorders, in which the medicinal properties have not yet been scientifically studied.

Some plants within the genus *Lippia* have also been shown to be effective in treating respiratory and gastrointestinal disorders, including diarrhea and dysentery as well as other disorders.<sup>[24]</sup> These reported biological properties are normally attributed to the EO major volatile compounds, including 1–8-cineole, terpineol, terpinene-4-ol, limonene, thymol, carvacrol, and other monoterpenoids that are reported in the *Lippia* genus,<sup>[25]</sup> with several species showing either anthelmintic or antiparasitic activities.<sup>[26–29]</sup> Based on these chemotaxonomic and pharmacologic criteria, the LdEO is thought to possess a medicinal potential that needs to be explored regarding gastro-

intestinal disorders, particularly those related to the control of parasites and helminth infections.

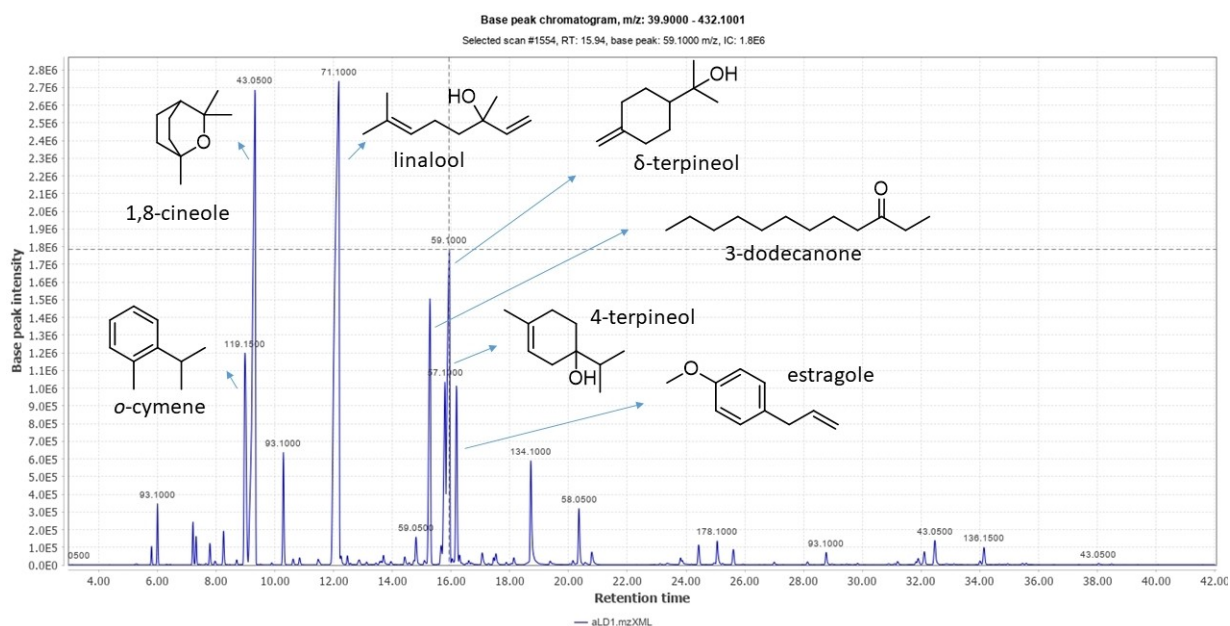
Therefore, the present research aimed to evaluate the effect of LdEO on eggs and adult nematodes of a multidrug-resistant strain of *H. contortus*. At the same time, we have performed ultrastructural evaluations by scanning electron microscopy on adults, as well as by confocal microscopy of eggs, to elucidate possible mechanisms of action of the LdEO. Likewise, this study intends to offer data on the EO chemical composition of the *L. domingensis* by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) which, to our knowledge, had never been reported.

## Results and Discussion

EOs are complex natural mixtures of volatile compounds resulting from the plant's secondary metabolism, produced by some aromatic species of plant families,<sup>[19]</sup> such as Verbenaceae. EOs are physiologically important for these plants because they have protective functions acting as insecticides, antifungals, antivirals, and antibacterial and also protect plants from grazing animals by reducing their acceptance.<sup>[15]</sup> In that sense, some EOs active compounds have been used as therapeutic alternatives in controlling several kinds of parasitic infections such as protozoan,<sup>[30–32]</sup> helminths,<sup>[21,33,34]</sup> cestodes,<sup>[35]</sup> acarids,<sup>[36]</sup> and insects.<sup>[37–39]</sup>

The major compounds of the LdEO were determined by matching mass spectra with the NIST08 MS library in addition to the Kovats index (KI) for confident literature data comparison, while few were not identified. The LdEO chromatogram after EI-MS treatment exhibited approximately 491 features ( $m/z > 39$  and peak area  $> 1.0E4$ ) (Supplementary Table S1). The chemical composition of LdEO was determined for the first time in this study. The mass spectra analysis of LdEO indicated a majority of monoterpenoids, in addition to a few sesquiterpenes when compared to the NIST08 MS library.

The LdEO from the leaves and aerial parts showed a yellow appearance and a characteristic, intense, and pleasant scent. The calculated density of the LdEO was  $0.8978 \text{ mg mL}^{-1}$  and yielded 2.5% (2.5 g) from dehydrated plant material. The LdEO showed monoterpenoids linalool (33.85%), 1,8-cineole (30.88%),  $\delta$ -terpineol (10.61%), and 4-terpineol (6.04%) as the four major compounds, representing approximately 81.4% of the total EO content, besides minor compounds identified as the monoterpenoids estragole (3.20%), *o*-cymene (2.68%), and the sesquiterpene 3-dodecanone (2.86%), among others (Figure 1). Additionally, the peaks were manually checked by using calculated KI and the literature data for ion fragment comparison<sup>[40]</sup> (Table 1). The results corroborate the literature, which indicates that the *Lippia* genus is a rich source of linalool, cineole, and terpineol.<sup>[25,42]</sup> Monoterpenes and sesquiterpenes, such as linalool,  $\beta$ -caryophyllene, 1,8-cineole, and carvone, have also been reported as the major constituents in the EOs of several *Lippia* species.<sup>[42,43]</sup>



**Figure 1.** *L. domingensis* essential oil GC/MS chromatogram evidencing major and minor metabolites chemical structures (linalool; 1,8-cineole;  $\delta$ -terpineol; 4-terpineol, estragole, *o*-cymene, and 3-dodecanone).

**Table 1.** Main chemical composition of the essential oil of *Lippia domingensis* by GC/MS.

Compounds	KI <sup>a</sup>	Area (%)	RT <sup>b</sup>	MolW <sup>c</sup>	MF <sup>d</sup>	SI <sup>e</sup>
Linalool	1096	33.85	12.17	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	98
1,8-cineole	1031	30.88	9.32	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	96
$\delta$ -terpineol	1166	10.61	15.93	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	97
4-terpineol	1177	6.04	15.28	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	96
Estragole	1196	3.20	16.18	148	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	95
3-dodecanone	1390	2.86	15.80	156	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	91
<i>o</i> -cymene	1026	2.68	8.98	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	96
Chavicol	1250	1.96	18.71	134	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	94
Epiglobulol	1590	1.50	32.46	222	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	89
$\gamma$ -terpinene	1059	1.34	10.29	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	97
Caryophyllene oxide	1582	0.75	32.10	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	93
<i>E</i> -caryophyllene	1419	0.73	25.60	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	94
2-undecanone	1294	0.68	20.35	170	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	96
4,4-dimethyltetracyclotridecan-9-ol	–	0.62	34.14	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	87
$\alpha$ -pinene	939	0.50	6.01	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	97
Total		98.20				

<sup>a</sup> KI: Kovats index;<sup>[40]</sup> <sup>b</sup>RT: Retention Time; <sup>c</sup>MolW: Molecular weight; <sup>d</sup>MF: molecular formula; <sup>e</sup>SI: Similarity Index with NIST08s. Library.

## Egg Hatch Test (EHT)

The results of LdEO on the EHT (2 mg/mL) evidenced larval hatching inhibition of 94.7% and a calculated IC<sub>50</sub> value of 0.522 mg/mL. The LdEO inhibition of larval hatching test regarding the different evaluated concentrations (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, and 0.25 mg/mL) is shown in Table 2. Additionally, most eggs (> 75%) showed a complete development of the 1<sup>st</sup> stage larvae at 2 mg/mL of LdEO, when observed at the optic microscope.

Few *Lippia* EOs have been demonstrated to be effective as antiparasitic and insecticides. *Lippia gracilis* EO showed an acaricidal effect against the cattle tick *Rhipicephalus microplus*,<sup>[42]</sup> antileishmanial and antifungal activity,<sup>[43]</sup> and showed *in vitro* anthelmintic effectiveness against *H.*

**Table 2.** Effect (mean  $\pm$  standard deviation [SD], and 95% confidence intervals [CI]) of *Lippia domingensis* EO in egg hatching test on *Haemonchus contortus* Kokstad isolate.

Concentration (mg/mL)	Mean $\pm$ SD	95% CI
2	94.74 $\pm$ 2.8 <sup>A</sup>	93.2–96.3
1.5	85.35 $\pm$ 3.3 <sup>AB</sup>	83.2–87.6
1	70.35 $\pm$ 9.9 <sup>ABC</sup>	64.9–75.8
0.75	62.13 $\pm$ 10.0 <sup>BC</sup>	55.0–69.3
0.5	25.60 $\pm$ 17.1 <sup>BCD</sup>	16.2–35.1
0.25	7.91 $\pm$ 3.3 <sup>BCD</sup>	6.1–9.8
1.5% Tween 80	1.34 $\pm$ 0.9 <sup>D</sup>	0.9–1.8
Thiabendazole (0.1)	94.44 $\pm$ 3.3 <sup>A</sup>	93.6–96.5

Different letters indicate significant differences in mean values ( $p < 0.05$ ).



*contortus*.<sup>[28]</sup> The *L. gracilis* EO in the EHT inhibited the *H. contortus* egg hatching at the concentration of 0.016  $\mu\text{L}/\text{mL}$  in 93%, with an  $\text{EC}_{50}$  value of 0.0034  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (0.0345%), showing great anthelmintic potential, with carvacrol (41.77%) and thymol (10.13%) as major constituents.<sup>[28]</sup>

The anthelmintic activity of *Lippia sidoides* EO, primarily comprising thymol (59.65%) and caryophyllene (10.6%), was demonstrated by its ability to inhibit the hatching of *H. contortus* eggs by 94.88% at a concentration of 0.62 mg/mL ( $\text{EC}_{50}$  = 0.40 mg/mL).<sup>[44]</sup> In the same work, *L. sidoides* EO inhibited 90.2% of the *in vitro* larval development of *H. contortus* at 10 mg/mL ( $\text{IC}_{50}$  = 2.97 mg/mL). Altogether, comparing these results with our study, the LdEO anthelmintic activity was demonstrated by 94.7% inhibition of *H. contortus* egg hatching at 2 mg/mL ( $\text{IC}_{50}$  = 0.52 mg/mL). Even though, the effectiveness was lower than observed by Camurça et al., with *L. sidoides* EO ( $\text{IC}_{50}$  = 0.4 mg/mL) and also lower than the inhibition effect showed by *L. gracilis* EO ( $\text{IC}_{50}$  = 0.003 mg/mL) reported by Souza et al.<sup>[43]</sup> The *in vitro* anthelmintic activity of two *Lippia alba* EO chemotypes, carvone and citral, had their inhibitory effect on *H. contortus* egg hatching assessed with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.3 mg/mL and 0.2 mg/mL, respectively.<sup>[45]</sup> Comparing the results obtained in this study, *L. alba* chemotypes were effective as anthelmintics at lower doses, since LdEO showed an  $\text{IC}_{50}$  value of 0.52 mg/mL.

#### Adult Worm Motility Test (AWMT)

The evaluation of LdEO in the AWMT showed that the adult specimen's motility was also inhibited at 100% at each period evaluated at a concentration of 2 mg/mL. At the concentration of 1 mg/mL, the inhibition was 95.8% until 9 h evaluation, and thereafter it was 100% inhibited, without significant differences compared to the positive control (Table 3). Moreover, after 12 h, the effect of motility was significantly decreased in the other evaluated doses (0.75, 0.5 and 0.25), reaching an effect statistically similar. The effect of carvone and citral chemotypes from *L. alba* EO in the AWMT evidenced a 100% inhibition of motility for both chemotypes at 1 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively, during the first 3 h of the experiment.<sup>[45]</sup> In comparison, the LdEO was effective at higher concentrations (2 and 1 mg/mL)

for the inhibition of 100 and 95.8% of motility, since the first 3 h.

#### Scanning electron microscopy (SEM)

In micrographs of adult nematodes exposed to 2 mg/mL of LdEO, at 12 h, cuticular lesions or disruption were observed only on a few small areas in the cephalic portion and little deposition of amorphous material (Figure 2B), which were not present in either negative or positive controls (Figures 2 A and C). Exploring the nematodes' central portion of the body, it was noted that worms treated with LdEO showed slight wrinkling of cuticle ridges and moderate undulations spread. These undulations and wrinkled areas were not present either in the positive or negative control-treated worms (Figures 2 D and F). Concerning micrographs of the vulvar flaps, the female worm treated with LdEO showed a loss of the normal structure of the whole vulvar flaps, compared to the vulvar flap of the ones treated with 1.5% Tween 80, and presented slight undulations and corrugations in all the extension of its structure. No significant structural alterations such as corrugations or undulations were observed in the vulvar flaps of worms treated with 1.5% Tween 80 (Figure 2G) and were minimal in worms treated with ivermectin (Figure 2I).

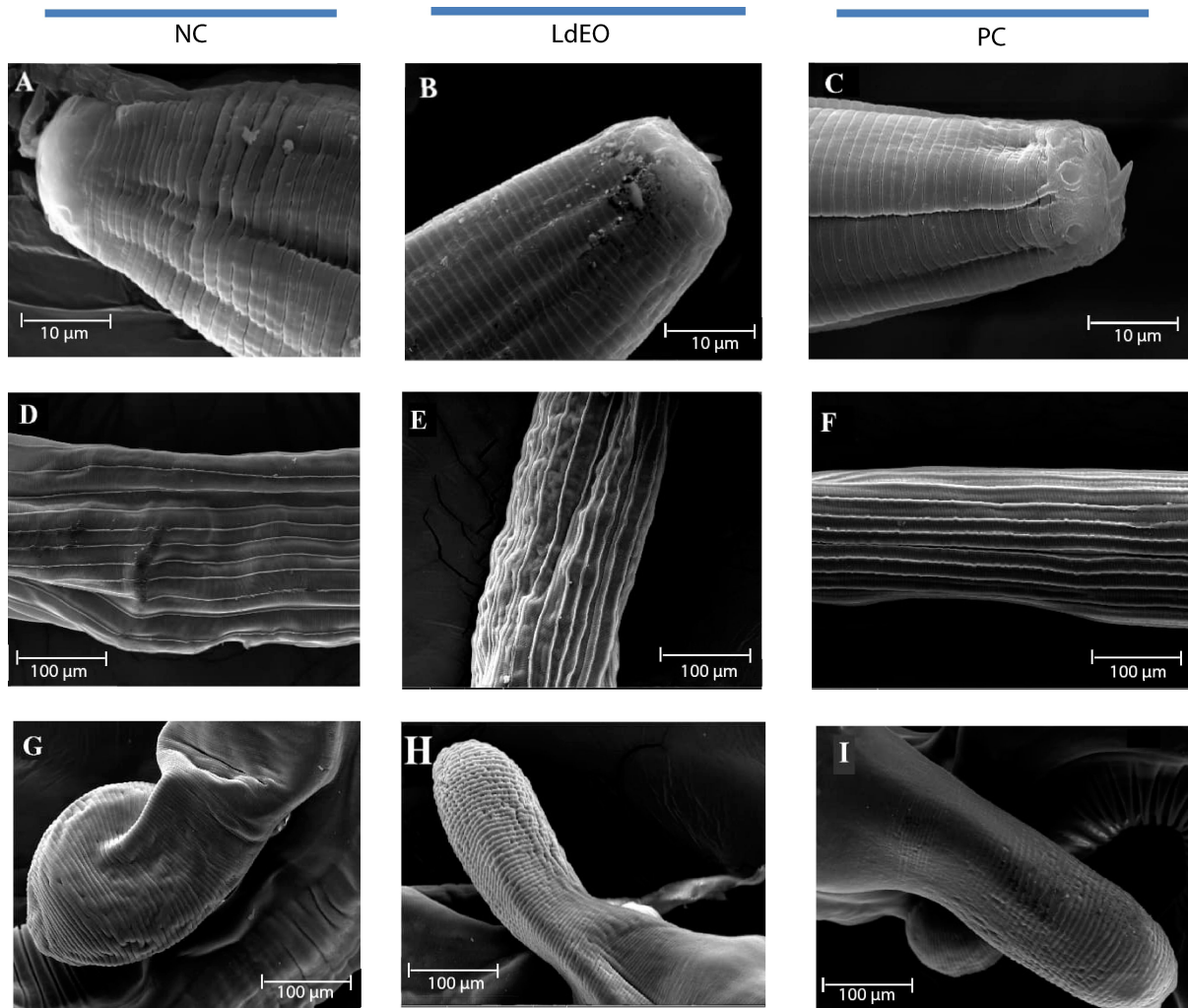
The moderate alterations in this study contrast with severe cuticle alterations observed with carvone and citral *L. alba* EO chemotypes, such as destruction of the oral capsule with loss of lancet and wrinkling being more evident in worms treated with the carvone chemotype.<sup>[45]</sup> The effect of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of carvacrol and carvacryl acetate on the adult worm of *H. contortus*, caused wrinkling of the cuticle, and the vulvar flap, and also produced bubbles in the tegument, being more noticeable in worms treated with carvacryl.<sup>[29]</sup> Hence, these authors stated that the liposolubility of carvacryl acetate and carvacrol is the main factor that contributed to the penetration of that compounds into the parasites by transcuticular diffusion, causing cuticular lesions or swelling.<sup>[29]</sup>

The anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on *H. contortus* produced wrinkled cuticles and the presence of bubbles emerging from the tegument of the adult worms.<sup>[34]</sup> On the other hand, *Eucalyptus citriodora* EO and its major

**Table 3.** Inhibition of the motility (mean  $\pm$  SD) of adult *Haemonchus contortus* isolated Kokstad treated with *Lippia domingensis* essential oil.

Concentration (mg/mL)	Treatment exposure time (h)		9 h	12 h	24 h
	3 h	6 h			
2	100.0 <sup>C</sup>	100.0 <sup>C</sup>	100.0 <sup>D</sup>	100.0 <sup>D</sup>	100.0 <sup>D</sup>
1	95.83 $\pm$ 11.8 <sup>C</sup>	95.83 $\pm$ 11.8 <sup>C</sup>	95.83 $\pm$ 11.8 <sup>D</sup>	100.0 <sup>D</sup>	100.0 <sup>D</sup>
0.75	47.91 $\pm$ 16.5 <sup>Ba</sup>	47.91 $\pm$ 16.5 <sup>Ba</sup>	58.33 $\pm$ 23.6 <sup>CaB</sup>	66.66 $\pm$ 25.2 <sup>Cb</sup>	95.83 $\pm$ 25.2 <sup>CdC</sup>
0.5	4.17 $\pm$ 11.8 <sup>Aa</sup>	4.17 $\pm$ 11.8 <sup>Aa</sup>	20.83 $\pm$ 30.5 <sup>Bb</sup>	33.33 $\pm$ 30.8 <sup>Bb</sup>	87.50 $\pm$ 17.3 <sup>CdC</sup>
0.25	0.0 <sup>Aa</sup>	0.0 <sup>Aa</sup>	4.17 $\pm$ 11.8 <sup>Aa</sup>	7.29 $\pm$ 13.7 <sup>Aa</sup>	81.25 $\pm$ 20.8 <sup>Cb</sup>
1.5% Tween 80	0.0 <sup>Aa</sup>	0.0 <sup>Aa</sup>	4.17 $\pm$ 11.8 <sup>Aa</sup>	8.22 $\pm$ 15.4 <sup>Aa</sup>	29.16 $\pm$ 21.4 <sup>Bb</sup>
PBS + ATB	0.0 <sup>A</sup>	0.0 <sup>A</sup>	0.0 <sup>A</sup>	4.17 $\pm$ 11.8 <sup>A</sup>	12.50 $\pm$ 17.3 <sup>A</sup>
Ivermectin (0.1)	100.0 <sup>C</sup>	100.0 <sup>C</sup>	100.0 <sup>D</sup>	100.0 <sup>D</sup>	100.0 <sup>D</sup>

Capital letters compare means in the columns and small letters compare means in the rows. Different letters indicate significantly different values ( $p < 0.05$ ). PBS – Phosphate-buffered saline; ATB – Antibiotic (4% penicillin/streptomycin); PBS + ATB – phosphate-buffered saline enriched with 4% penicillin/streptomycin.



**Figure 2.** The cephalic region, central body, and vulvar flap of *Haemonchus contortus* adult females, A, D and G, were treated with 1.5% Tween 80 as the negative control (NC), B, E, and H were treated with 2 mg/mL of *Lippia domingensis* EO (LdEO), and C, F, and I with 0.1 mg/mL ivermectin as the positive control (PC).

compound citronellal did not cause considerable changes in the cuticles of *H. contortus* by SEM.<sup>[21]</sup> Hence, the authors stated that the main mode of action of *Eucalyptus citriodora* EO and citronellal for inhibiting the adult worm motility could be due to the penetration to the parasites causing interaction with internal structures, which has led to physiological disorders and triggered death.<sup>[21]</sup> In this context, it could be better understood once some products derived from EOs act by penetrating the nematodes and microorganism cell membranes and then altering the functions of some organelles, affecting homeostasis, and thus leading to death.<sup>[46]</sup> This effect is similar to the action regarding other plant-derived compounds, such as polyphenols and tannins, that can interact with macromolecules of different internal and external structures of the parasites, altering their physical and chemical properties, triggering the disruption of organelles and thus also leading to the cell death.<sup>[47–49]</sup>

Regarding external structures of nematodes, the cuticle is a multifunctional exoskeleton that despite acting as a barrier

between the nematodes and external medium, it is essential for the maintenance of body integrity and morphology, and their locomotion by its connections with body-wall muscles.<sup>[50]</sup> Thus, cuticular injuries would hinder the transport of substances between the nematodes and the external medium but also would affect the proper locomotion, eventually compromising the nematodes' homeostasis, and triggering their death. Concerning our results, the effects observed for the LdEO on *H. contortus* adult worms could be resultant of a combination of multiple effects, since the external cuticular lesions were moderate, and hence the anthelmintic action of LdEO in adult worms could probably include a multitarget action.

#### Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

The CLSM is another tool-less used as SEM for exploring the mode of action of products on parasites. The microorganisms and nematodes need to be previously in contact with

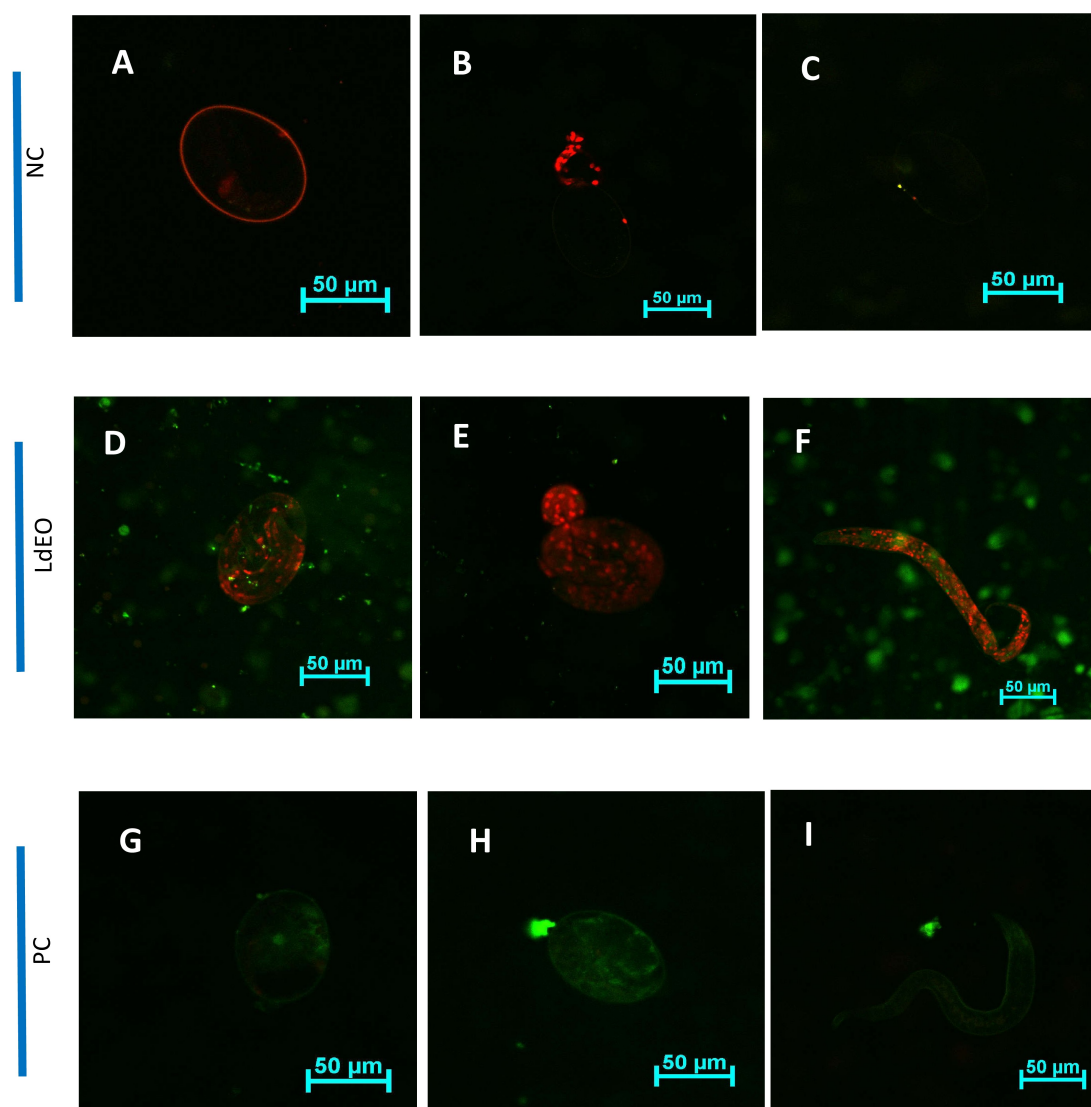
propidium iodide (PI), which is a DNA stain reagent that penetrates cells only when the cell membrane is injured or ruptured, and then it inserts into double-stranded DNA, where it releases red fluorescence.<sup>[51]</sup>

In the CLSM of *H. contortus* eggs treated with 2 mg/mL LdEO, was observed that eggs dyed with PI turned orange-red as is seen in Figure 3, indicating the penetration of the PI in the interior of the treated eggs (Figures 3 D–F). Additionally, L1 also turned orange showing the penetration of PI, while entering into contact with LdEO. However, eggs treated with the negative control were principally dark and some of them showed a slight dye of orange on the outer contour or a very slight green fluorescent (Figures 3 A–C). Conversely, eggs in contact with 0.1 mg/mL thiabendazole showed a more intense green fluorescent colouration without presenting orange or red dyeing (Figures 3 G–I), and also a 1<sup>st</sup> stage larvae were stained with green fluorescent dye in the same way. That could be explained by the mechanism of action of benzimidazole that

does not affect the cuticles or cell membranes of the nematodes.<sup>[52,53]</sup>

In addition to the red coloration of eggs treated with LdEO, in the CLSM micrographs (Figures 3 D and E) it was observed that these eggs have a higher embryonic content as a consequence of the development of the 1<sup>st</sup> stage larvae, which could be a result of an increased size and/or change in its normal oval shape. These changes were not observed on eggs treated with 1.5% Tween 80 (Figure 3 A–C) nor on eggs in contact with TBZ (Figure 3 G and H). In the case of TBZ, the CLSM micrographs showed an ovidical action, causing deformation of the egg embryonic content, resembling plasmolysis, and therefore, preventing the larvae formation as described by Cortes-Morales et al.<sup>[54]</sup>

On the other hand, the anthelmintic effect of the sub-fractions of ethyl acetate and the isolated compound isokaempferide, obtained from the hydroalcoholic extract of *Baccharis conferta* have fully inhibited the developed larvae hatch. Thus,



**Figure 3.** *Haemonchus contortus* eggs of the egg hatch test treated with 1.5% Tween 80, (A, B, and C) as the negative control (NC), *Lippia domingensis* essential oil (2 mg/mL) (D, E, and F) and with Thiabendazole (TBZ, 0.1 mg/mL) (G, H and I) as the positive control (PC).

this effect was attributed to the adhesion of these compounds to the shell of the eggs, having been visualized by confocal microscopy with blue, red and orange fluorescence.<sup>[54]</sup> Coumarin derivatives, from hydroalcoholic extract and fractions obtained from *Brongniartia montalvoana*, observed as blue fluorescence in the interior of treated eggs by CSLM, caused the inhibition of egg hatch, allowing the larvae development in the egg, but caused deformation of the larvae morphology<sup>[55]</sup> Nevertheless, in the current study it was not observed other types of fluorescence that could be related to the LdEO constituents adhered to the eggshell or at the interior of eggs, as evidenced in the CLSM micrographs.

The findings of this study in the CLSM are in agreement with those reported by Barbosa et al.<sup>[45]</sup> since the eggs treated with both citral and carvone chemotypes of *L. alba* EO were red-dyed, confirming similar action of those compounds on *H. contortus*. However, in Barbosa's study, the CLMS micrographs showed that the eggs treated with *L. alba* citral chemotype (LaCT) did not reach embryo development. On the other hand, the eggs that had contact with the carvona chemotype of *L. alba* (LaCV) showed an embryo development that reach the complete formation of the larvae. These authors attributed these findings to the increased permeability through the cell membrane of the citral (the main constituent of LaCT), leading to an earlier action on eggs, and preventing larval development. Instead, LaCV acts probably in the larval motility, consequently inhibiting the hatching of formed larvae.

The findings of this study could indicate that the main action of LdEO and its major compounds linalool and 1,8-cineole, implies the penetration to the eggs cell membranes, changing its permeability or causing its disruption, and then leading to the leakage of ions and other cell contents, which eventually triggers to the death of the *H. contortus* eggs and 1<sup>st</sup> stage larvae. However, these actions take long enough (> 24h) to allow the formation of the larvae inside the egg. Additionally, it seems to be that LdEO major monoterpenes also act directly on the fully developed larvae, compromising the integrity of its surface coat and consequently affecting its vital functions, which will eventually trigger its death. This was inferred from the fact the PI not only dyed the larvae within the eggs but also the hatched ones, as observed in Figure 3 F.

Overall, the results obtained in this study demonstrated the anthelmintic activity of the LdEO on the egg, and adult stages of *H. contortus* Kokstad isolated under *in vitro* conditions. Moreover, further studies should be performed to confirm if the anthelmintic effect on each *H. contortus* live cycle stage is due to one of the LdEO major constituents or if these effects are due to their constituents acting together since linalool could have a more potent anthelmintic effect than 1,8-cineole, according to Katiki et al.<sup>[26]</sup>

### Oral acute toxicity in mice

In the oral acute toxicity test, after administering 2,000 mg/kg orally to the mice, no deaths and no changes in weight were observed during the 14 days of the experiment. However,

during the first 4h, it was observed that mice presented frizzy hair in the neck area, and also showed slight hyperactivity, attempting to clean the snouts with their hands, and occasionally shaking their heads. These signals gradually disappeared within 24h of starting treatment.

The acute and chronic toxicity of the *L. origanoides* essential oil (29% carvacrol, 25.6% o-cymene) at doses 30, 60 and 120 mg/kg orally, were evaluated in Wistar rats without evidencing death nor changes in weight, behavior or hematological and biochemical parameters.<sup>[56]</sup> On the other hand, the oral administration of *Lippia sidoides* EO (thymol 59.6%, E-caryophyllene 10.6% and *p*-cymene 9.08%), of doses from 100 to 3,000 mg/kg did not induce death nor any relevant alteration in the behavior of mice, and also it was observed that the sub-chronic oral administration of 117.95 mg/kg/day did not show toxicity signals nor biochemical and histopathological alterations.<sup>[57]</sup> These results indicate that LdEO also has a high safety margin when administered orally.

### Conclusions

The *in vitro* anthelmintic assays evidenced effective egg hatch inhibition and adult worm lethal activities of LdEO on *H. contortus*. Those effects were confirmed by the changes and colorations on eggs and 1<sup>st</sup> larvae observed by CLMS and by the ultrastructural alteration observed in the cuticle and vulvar flaps of the adult nematodes. It could be attributed, at least in part, to the linalool and 1,8-cineole monoterpenes, which are the main LdEO constituents that represent approximately 65% of the total EO content. Overall, the results of this study confirmed the potent ovicidal and adulticidal activity of LdEO on *H. contortus*, thus indicating that it could be considered a promising source for novel approaches to the development of more effective anthelmintics for small ruminants. However, further studies are needed to better explore the chemical composition of EOs from other parts of *L. dominguisis*, as well as a systematic seasonal study of the plant material aiming to establish a correct relationship between its biological activity and the variation in its chemical composition. In addition, collection at other phenological stages can rigorously evaluate chemical profile modification in the EO composition of *L. dominguisis*, since the evaluations of EOs obtained at the different phenological stages of each plant are important for determining chemical composition variation or the presence of different chemotypes, and if that variation can improve their anthelmintic activity or not. Additionally, the *in vivo* toxicological evaluation showed that the LdEO has low toxicity indicating that is safe EO for being used on small ruminants. Therefore, *in vivo* anthelmintic evaluations are necessary for the extended use of LdEO as an anthelmintic phytomedicine for small ruminant farmers.



## Experimental Section

### Plant material

The *L. dominguensis* Moldenke leaves and aerial parts were collected in the pine forest, around the Hoyo de Pelempito Visitor Center, Aceitillar, Pedernales province – Dominican Republic (DR) in February 2020 (18° 05' 28" N, 71° 30' 33" W, at 1,197 m). The collected plants were adult specimens that were collected during a phenological period without flowers or fruits. The collection of the *L. dominguensis* leaves was made by the collaboration of the taxonomist Teodoro Clase García who deposited the voucher specimens of the plant in the Jardín Botánico Nacional (JBN), "Dr. Rafael M. Moscoso" herbarium, at Santo Domingo – the Dominican Republic with the voucher number 12021.

### Essential oil extraction

After collection of the plant material (leaves), it was washed with fresh distilled water, and air dried in the shade. Then, the material was grounded in 3–5 mm particles using a hammer miller (Thomas®) and hermetically stored in a sealed container until EO extraction. For the extraction of the EO, 100 g of leaves, previously moistened with water, were placed in a 2,000 mL balloon that was connected below to another balloon with 1,800 distilled water, which was heated to a boil to be a source of steam. In this sense, the LdEO was extracted from the leaves by steam-dragging distillation for 2 h. After extraction, the EO was placed in a 20 mL beaker where approximately 100 mg of anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to eliminate residual moisture. The mixture EO:anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was shaken and left for 2 h until complete decantation. Subsequently, the supernatant was collected containing only the EO, which was stored in a sterile amber glass vial at –5 °C until the GC/MS analysis and biological assays.

### Animals

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (CEUA-UNIFAL, Minas Gerais, Brazil) and registered under the number 0053/2021. For the *in vitro* anthelmintic experiments were used two sheep aged 3 or 4 months old, and were male crossbreeds of Blackbelly and Santa Inês. One sheep was used for the evaluation of ovicidal activity and the other one for the adult worm motility test. For the *in vivo* toxicity assay, three Swiss albino mice (*Mus musculus*) were used, which were females aged 7–8 weeks with an average weight of 26 g.

### Haemonchus contortus Isolate

For both *in vitro* experiments, sheep were artificially infected with an *H. contortus* isolate named *Kokstad* (KOK) reported as a multi-drug-resistant (MDR) strain being resistant to benzimidazoles, levamisole, and macrocyclic lactones,<sup>[58–60]</sup> and was provided by the Laboratory of Parasitic Diseases of the State University of Ceará (Brazil).

### Experimental infection of animals

The sheep were housed in metabolic cages and after 2 weeks of adaptation, they have been dewormed in the following scheme: 0.2 mg/mL doramectin (Dectomax®), 5 mg/mL levamisole (Ripercol®), and 2.5 mg/mL monepantel (Zolvix®) orally at 48 h intervals between doses. After 10 days were performed fecal egg counts (epg) using a MacMaster camera, according to Ueno and

Gonçalves,<sup>[55]</sup> for determining a total clearance of natural infection. After confirming a total clearance of parasites by epg and three serials negative coproculture,<sup>[55]</sup> animals were infected with 5,000 *H. contortus* third-stage larvae (L3) of the Kokstad isolated.

### In vitro anthelmintic activity

*In vitro* tests were performed to evaluate LdEO against *H. contortus* by the egg hatch test (EHT) and by the adult worm motility Test (AWMT). In both trials, the concentrations of the essential oil for the evaluation of ovicidal and adulticidal activity were prepared by using 3% Tween 80 (Vetec®) and distilled water.

### Egg Hatch Test (EHT)

This test was performed according to Coles et al.,<sup>[62]</sup> For the recovery of *H. contortus* eggs, 10–15 grams of feces were collected directly from the rectum of animals that were artificially infected as described before, and feces were processed according to Hubert and Kerboeuf<sup>[63]</sup> procedure. The technique consists in incubating 250 µL of egg suspension, containing approximately 100 fresh eggs, with 250 µL solutions of EO, for 48 h at 25 °C. After 48 h, drops of Lugol® iodine were added to stop egg hatching. Eggs and first-stage larvae (L1) were counted under an optic microscope at 100x. Six concentrations of LdEO (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 mg/mL), were tested and a negative (1.5% Tween 80) and a positive (0.1 mg/mL thiabendazole) controls were used, performing three repetitions with at least five replicates for each EO concentration and controls. Since all the concentrations of the LdEO and the negative and positive controls were diluted with 3% Tween 80 in distilled water, the final concentration of tween 80 dropped to 1.5% when mixed with the egg solution.

### Adult Worm Motility Test (AWMT)

AWMT was performed according to the methodology described by Hounzangbe-Adote et al.<sup>[59]</sup> It was used an artificially infected sheep, after confirmation of a very high level of infection (epg > 10,000) by MacMaster technique with modification.<sup>[61]</sup> Then, the animal was euthanized, and the abomasum was removed, opened, and briefly placed at 37 °C and washed in phosphate-buffered saline (PBS) for the adult worm recuperation. Adult female worms were collected and placed into 24-well plates at a ratio of 3 worms, containing 1 mL of PBS enriched with 4% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich®) (ATB), and the 24-well plates were incubated (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) for one h. After that, 1 mL of different concentrations (2, 1, 0.75, 0.5, and 0.25 mg/mL) of LdEO was added to specific 24-well plates. PBS with 4% ATB and 1.5% Tween 80 (PBS + ATB) were used as negative controls and 0.1 mg/mL ivermectin was used as the positive control. After 3, 6, 9, 12, and 24 h of incubation, the motility/survival of adult worms was evaluated under a binocular stereomicroscope. Eight replicates for each dilution of LdEO and each control were performed.

### Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis.

The chemical analysis of the components of the EO was performed using Gas Chromatography (GC-2010 Gas Chromatography, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) coupled with Mass Spectrometry (MS-QP-5050A mass spectrometer, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) instrument. LdEO sample was prepared by dissolving in ultrapure hexane (10:100 µL v/v). A sample volume of 1 µL in a split ratio of 1:60 was injected into the GC/MS system using a capillary column (Rtx® Crossbond® 5% diphenyl 95% dimethylpolysiloxane,

30 m×0.25 mm×0.25 μm film thickness, Restek, Bellefonte, PA). Helium was the carrier gas (99.999%) with an injection pressure of 99.3 kPa, a total flow of 84.5 mL/min, a linear velocity of 46.1 cm/s, a column flow of 1.60 mL/min, a purge flow of 3 mL/min, column oven temperature of 60 °C and injection temperature of 225 °C. The oven temperature program was set from 60 °C to 240 °C at the rate of 3 °C/min. For the MS method: The ionization mode was electron ionization (70 eV).

### GC/MS data handling

The spectra obtained were analyzed and compared with the mass spectra available in the NIST08 library to obtain the Similarity Index (SI). The metabolites were identified by comparing the Kovats retention index (KI) to a homologous series of C10–C24 alkanes and by matching the mass spectra with those of authenticated compounds reported in the literature.<sup>[40]</sup> The quantification was performed using the relative percentage of the total peak area of each constituent in the samples. The.qgd. raw data files were also converted to mz.XML data format and exported from GC/MS Post-run Analysis software (Labsolutions, Shimadzu). Subsequently, the GC/MS mz.XML data files were imported into the open-source software Mzmine 2.53 version for data processing and analysis of the obtained LdEO chromatogram and mass spectra.

### Scanning electron microscopy (SEM)

Specimens of *H. contortus* from the AWMT were collected at 12 h post-treatment for the EO and each control. Adult nematode samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (CACO) for 48 h. Subsequently, the samples were washed three times in CACO buffer for 30 min and PBS and were subjected to serial dehydration by ethanol at 15, 30, 50, 70, 90, and 100% for 1 h. After 24 h, the samples of parasites were dried using EMS 850 critical point drying apparatus and placed in metal stubs, then coated with gold-palladium in a Quorum QT150ES metalizer and observed under an FEI Quanta 450 FEG Scanning Electron Microscope (FEI Company®, OR, USA) at an acceleration voltage of 15 kV. These evaluations aimed to explore the cephalic region, vulvar flap, and cuticle of nematodes for detecting possible ultrastructural alterations and for explaining the possible mode of action of the essential oil, comparing them with specimens treated with negative and positive controls.

### Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

CLSM of *H. contortus* eggs was performed to evaluate changes induced by the treatments in the morphology, viability, and first-stage larvae formation. The samples were prepared similarly to EHT, with some modifications. The time of incubation was about 24 h (25 °C) and after this period, samples were kept refrigerated (5–8 °C) until analyses. Samples of egg solution with the highest concentration of LdEO (2 mg/mL) and both controls were evaluated. Eggs were stained with Live/Dead™ (Invitrogen™, MA), containing SYTO9 and propidium iodide (PI), prepared in aliquots of 70 μL (20 μL:50 μL, Live/Dead™ and egg solution, respectively). Then, samples were evaluated with a Nikon C2 confocal microscope (NIKON, Tokyo, Japan) and visualized in the 40x objective lens, at 488 nm to detect SYTO9, for live or viable eggs/larvae, and at 561 nm, to detect propidium iodide, for dead or damaged eggs/larvae.

### Acute toxicity in mice

The acute oral toxicity testing (limit test) of LdEO was conducted in female Swiss mice (*Mus musculus*) according to the Organization for Economic Cooperation Development Guideline 423.<sup>[65]</sup> The animals were kept in polypropylene boxes (300×200×130 mm) lined with sterilized pine shavings. The animals were fed rodent chow (Nuvilab®, Quimtia, Paraná, Brazil) and water was offered *ad libitum*. Throughout the experiment, the animals were housed in a barrier facility with an ambient temperature of 22 ± °C, a relative humidity ranging from 40 to 60% and a 12-h light:12-h dark cycle. The mice were handled under the regulations of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA/Brazil). LdEO (2,000 mg/kg) was randomly administered in a single dose (n=3) by esophageal gavage to each animal. After administration, the animals were observed individually at the following times: 15, 30, 60, 120, 240 and 360 min, and every 24 h daily for 14 days to record clinical signs of toxicity, behavioral changes, and possible occurrence of death, measuring the body weight at days 0, 7 and 14.

### Statistical Analysis

In the EHT, the percentage of inhibition was obtained by the formula  $[\text{total of hatched egg}/(\text{total of hatched eggs} + \text{total eggs})] \times 100$  for LdEO and respective controls. The percentage of inhibition of adult worm motility in AWMT was obtained by the  $(\text{total motionless worms per well}/\text{total number of worms per well}) \times 100$  which was calculated for each treatment. The results of EHT were not normal in the Shapiro-Will test, hence were analyzed by a non-parametric test (Kruskal Wallis) performing the comparison of the mean with the Duncan test with 0.05 of the significance level. For analyzing the results of AWMT was performed a two-way ANOVA and Tukey's test for mean comparison with  $p < 0.05$  as the significance level. For the IC<sub>50</sub> in the EHT and AWMT linear regressions were performed. The results of EHT and AWMT were expressed as means ± standard deviations (SD). The statistical analyses were developed by using GraphPad Prims® 8.0 statistical software for Windows.

### Author Contributions

MJEU, ABT, WLCR, CMLB, MVT, MRR and MJM conceived the idea and experiments. MVT and MRR prepared the plant material, obtained the essentials, and prepared the samples for the experiments. MJEU, JVAF, and WLCR performed the *in vitro* experiments. MJEU, AKN, and DACP performed the instrument GC/MS analysis and data interpretation, and compounds identification. DCBSCM performed the Confocal Laser Scanning Microscopy of *H. contortus* eggs. MJM and MJEU performed the *in vivo* toxicity Test. MJEU, AKN, WLCR, and DACP drafted the manuscript. MJM, JVAF, LMBO and WLCR participate in the data analysis and interpretation of the results. MJEU, AKN, DACP, CVJ, and MJM coordinated the whole project and wrote the final manuscript.

### Acknowledgements

This work received financial support from the Ministry of High Education, Science, and Technology (MESCYT-FONDOCYT 2018-2019-2B1-165) in the Dominican Republic. We must thank

Jardín Bontánico Nacional (JBN) and Teodoro Clase García for their valuable help in the selection and identification of the plant. Additionally, we would like to thank the Graduate Program in Veterinary Sciences at the State University of Ceará (UECE), for donating the *H. contortus* Kokstad isolated and for making their laboratory facilities (Parasitic Diseases Laboratory) available for developing part of the experiments, in Brazil. We also need to thank the Analytic Center from the Federal University of Ceará (UFC/CT-INFRA/MCT/SISANO/Pró-Equipamentos, Brazil) for developing the Scanning Electron Microscopy. Additionally, we must thank Aline Pereira Castro for performing the linear regression analysis for the determination of the IC<sub>50</sub> values of the EHT and AWMT assays, and Luis Felipe Cunha dos Reis, for his valuable help in performing the toxicological assay. Finally, we also thank National Council for Scientific and Technological Development (CNPq # 316204/2021-8, # 406837/2021-0, # 303804/2020-3, # 310663/2016-4-5), and Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG #APQ02353-17 and #APQ00207-18), and Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES #001) for financial support.

### Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

### Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Keywords:** adult worm motility test · egg hatch test · endemic plant · small ruminants · ultrastructural changes

- [1] G. G. L. De Araújo, T. V. Voltolini, M. L. Chizzotti, S. H. N. Turco, F. F. R. De Carvalho, *Rev. Bras. Zootec.* **2010**, *39*, 326–336.
- [2] N. D. Sargison, *N. Z. Vet. J.* **2020**, *68*, 136–144.
- [3] M. H. Assouma, P. Lecomte, P. Hiernaux, A. Ickowicz, C. Corniaux, V. Decruyenaere, A. R. Diarra, J. Vayssières, *Livest. Prod. Sci.* **2018**, *216*, 16–23.
- [4] J. G. Rodríguez Diego, J. Arace, J. L. Olivares, Y. Alemán, *Rev. Salud Anim.* **2015**, *37*, 57–63.
- [5] A. J. Aguilar-Caballero, J. F. Torres-Acosta, R. Cámara-Sarmiento, C. Sandoval-Castro, A. Ortega-Pacheco, 'La contribución del sector pecuario a la seguridad alimentaria en México' **2013**.
- [6] S. C. M. Niciura, G. G. Cruvinel, C. V. Moraes, A. C. S. Chagas, S. N. Esteves, M. V. Benavides, A. F. T. Amarante, *J. Helminthol.* **2020**, *94*, e46.
- [7] M. Cordero del Campillo, F. A. Rojo Vázquez, A. R. Martínez Fernández, C. Sánchez Acedo, I. Navarrete López-Cozar, H. Díez Baños, M. Carvalho Varela, *Parasitología Veterinaria*, MacGraw-Hill-Interamericana de España, España, 2001.
- [8] J. Sanders, Y. Xie, D. Gazzola, H. Li, A. Abraham, K. Flanagan, F. Rus, M. Miller, Y. Hu, S. Guynn, A. Draper, S. Vakalapudi, K. H. Petersson, D. Zarlenga, R. W. Li, J. F. Urban, G. R. Ostroff, A. Zajac, R. V. Aroian, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2020**, *14*, 230–236.
- [9] A. C. Kotze, R. K. Prichard, *Anthelmintic Resistance in Haemonchus Contortus. History, Mechanisms and Diagnosis.*, Elsevier Ltd, **2016**.
- [10] J. A. Salgado, C. de P. Santos, *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2016**, *25*, 3–17.
- [11] R. M. Kaplan, *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 477–481.
- [12] M. Mohammadi Gheisar, I. H. Kim, *Ital. J. Anim. Sci.* **2018**, *17*, 92–99.
- [13] S. M. Ardoino, R. E. Toso, H. L. Alvarez, E. L. Mariani, P. D. Cachau, M. V. Mancilla, D. S. Oriani, *Cienc. Vet.* **2017**, *19*, 50–66.
- [14] L. W. M. Chávez, P. S. Moctezuma, T. F. Hererra, *Cuad. Geográficos* **2017**, *56*, 27–30.
- [15] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475.
- [16] J. R. Calo, P. G. Crandall, C. A. O'Bryan, S. C. Ricke, *Food Control* **2015**, *54*, 111–119.
- [17] R. K. Joshi, *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *145*, 621–625.
- [18] G. Suresh, R. K. Das, S. Kaur Brar, T. Rouissi, A. Avalos Ramirez, Y. Chorfi, S. Godbout, *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44*, 318–335.
- [19] D. Kalembe, A. Kunicka, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *10*, 813–829.
- [20] M. Sarto Mansano, J. Zanusso, *Uningá Review* **2014**, *20*, 92–102.
- [21] J. V. de Araújo-Filho, W. L. C. Ribeiro, W. P. P. André, G. S. Cavalcante, M. de C. M. Guerra, C. R. Muniz, I. T. F. Macedo, F. C. M. Rondon, C. M. L. Bevilaqua, L. M. B. de Oliveira, *Ind. Crops Prod.* **2018**, *124*, 294–299.
- [22] Rainforest, 'Dominican Republic Forest Information and Data', can be found under [https://rainforests.mongabay.com/deforestation/2000/Dominican\\_Republic.htm](https://rainforests.mongabay.com/deforestation/2000/Dominican_Republic.htm), **2010**.
- [23] H. A. Liogier, 'Diccionario Botánico de Nombres Vulgares de La Española', Editora Corripio, República Dominicana, **2000**.
- [24] E. Nwanosike, O. T. Fatokun, S. E. Okhale, M. Nwanosike, O. Folashade Kunle, *Artic. Int. J. Pharmacogn.* **2016**, *3*, 201–211.
- [25] F. C. Terblanché, G. Kornelius, *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 471–485.
- [26] L. Katiki, A. Evangelista, E. Canova, A. Piza, B. Fornazari, R. Araujo, H. Louvandini, A. Amarante, R. Costa, M. Bueno, J. Lima, C. Verissimo, *Planta Med.* **2014**, *80*, 1415–1415.
- [27] F. L. Dutra, M. M. Oliveira, R. S. Santos, W. S. Silva, D. S. Alviano, D. P. Vieira, A. H. Lopes, *Acta Trop.* **2016**, *164*, 69–76.
- [28] A. L. da C. Souza, C. K. de O. Rebouças, C. C. de Albuquerque, C. de C. F. L. Moura, T. M. Torres, J. I. L. Batista, F. S. B. Bezerra, A. C. D. S. Bezerra, *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo* **2020**, *87*, 1–4.
- [29] W. P. P. André, W. L. C. Ribeiro, G. S. Cavalcante, J. M. L. dos Santos, I. T. F. Macedo, H. C. B. de Paula, R. M. de Freitas, S. M. de Morais, J. V. d. Melo, C. M. L. Bevilaqua, *Vet. Parasitol.* **2016**, *218*, 52–58.
- [30] J. P. Anthony, L. Fyfe, H. Smith, *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 462–468.
- [31] I. G. Demarchi, M. V. Thomazella, M. de Souza Terron, L. Lopes, Z. C. Gazim, D. A. G. Cortez, L. Donatti, S. M. A. Aristides, T. G. V. Silveira, M. V. C. Lonardoní, *Exp. Parasitol.* **2015**, *157*, 128–137.
- [32] Z. Maaroufi, S. Cojean, P. M. Loiseau, M. Yahyaoui, F. Agnely, M. Abderraba, G. Mekhloufi, *Parasitol. Res.* **2021**, *120*, 1455–1469.
- [33] L. Zhu, J. Dai, L. Yang, J. Qiu, *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *148*, 311–316.
- [34] W. P. P. André, G. S. Cavalcante, W. L. C. Ribeiro, J. M. L. Dos Santos, I. T. F. Macedo, H. C. B. De Paula, S. M. De Morais, J. V. De Melo, C. M. L. Bevilaqua, *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2017**, *26*, 323–330.
- [35] E. Kozan, M. İlhan, I. Tümen, E. Kúpeli Akkol, *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *235*, 243–247.
- [36] F. Fang, M. Li, Z. Jiang, X. Lu, J. Guillot, H. Si, *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 4219–4223.
- [37] P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, S. Satya, *Med. Vet. Entomol.* **2011**, *25*, 302–310.
- [38] R. Pavela, *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 274–278.
- [39] R. Pavela, *Ind. Crops Prod.* **2015**, *76*, 174–187.
- [40] R. P. Adams, 'Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry', Allured Publishing Corporation, Illinois, **2017**.
- [41] A. R. B. de Melo, T. M. Maciel Higino, A. D. P. da Rocha Oliveira, A. Fontes, D. C. N. da Silva, M. C. A. B. de Castro, J. A. Dantas Lopes, R. C. B. Q. de Figueiredo, *Micron* **2020**, *129*, 102781.
- [42] E. M. de O. Cruz, L. M. Costa-Junior, J. A. O. Pinto, D. de A. Santos, S. A. de Araujo, M. de F. Arrigoni-Blank, L. Bacci, P. B. Alves, S. C. de H. avalcanti, A. F. Blank, *Vet. Parasitol.* **2013**, *195*, 198–202.
- [43] J. O. de Melo, T. A. Bitencourt, A. L. Fachin, E. M. O. Cruz, H. C. R. de Jesus, P. B. Alves, M. de Fátima Arrigoni-Blank, S. de Castro Franca, R. O. Belebony, R. P. M. Fernandes, A. F. Blank, R. Scher, *Acta Trop.* **2013**, *128*, 110–115.
- [44] A. L. F. Camurça-Vasconcelos, C. M. L. Bevilaqua, S. M. Morais, M. V. Maciel, C. T. C. Costa, I. T. F. Macedo, L. M. B. Oliveira, R. R. Braga, R. A. Silva, L. S. Vieira, *Vet. Parasitol.* **2007**, *148*, 288–294.
- [45] M. L. F. Barbosa, W. L. C. Ribeiro, J. V. de Araújo Filho, R. de Cássia Alves Pereira, W. P. P. André, A. C. F. L. Melo, D. de Souza Collares Maia Castelo-Branco, S. M. de Morais, L. M. B. de Oliveira, C. M. L. Bevilaqua, *Exp. Parasitol.* **2023**, *244*, 108439.

- [46] M. A. O. Dawood, M. F. El Basuini, A. I. Zaineldin, S. Yilmaz, M. T. Hasan, E. Ahmadifar, A. M. El Asely, H. M. R. Abdel-Latif, M. Alagawany, N. M. Abu-Elala, H. Van Doan, H. Sewilam, *Pathogens* **2021**, *10*, 1–38.
- [47] H. Hoste, F. Jackson, S. Athanasiadou, S. M. Thamsborg, S. O. Hoskin, *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 253–261.
- [48] S. Brunet, I. Fourquaux, H. Hoste, *Parasitol. Int.* **2011**, *60*, 419–424.
- [49] C. Martínez-Ortiz-De-Montellano, J. F. D. J. Torres-Acosta, I. Fourquaux, C. A. Sandoval-Castro, H. Hoste, *Parasite* **2019**, *26*, DOI 10.1051/parasite/2019065.
- [50] A. Page, I. L. Jhonstone, 'The cuticle', *WormBook* **2007**, 1–15.
- [51] Y. J. Yang, M. Y. Lin, S. Y. Feng, Q. Gu, Y. C. Chen, Y. D. Wang, D. feng Song, M. Gao, *J. Food Process. Preserv.* **2020**, *44*, 1–9.
- [52] H. S. Sumano López, L. Ocampo Camberos, ' *Farmacología Veterinaria*', MacGraw-Hill Interamericana, Mexico, **2006**.
- [53] L. Gregorio Illesca, ' *Mecanismo de Acción de Antiparasitarios (II). Antihelmínticos*', Universidad Complutense, **2019**.
- [54] J. A. Cortes-Morales, A. Olmedo-Juárez, G. Trejo-Tapia, M. González-Cortazar, B. E. Domínguez-Mendoza, P. Mendoza-de Gives, A. Zamilpa, *Exp. Parasitol.* **2019**, *197*, 20–28.
- [55] J. A. Cortes-Morales, A. Olmedo-Juárez, M. González-Cortazar, A. Zamilpa, M. A. López-Arellano, E. A. Ble-González, D. Tapia-Maruri, G. Flores-Franco, D. O. Salinas-Sánchez, *Exp. Parasitol.* **2022**, *240*, DOI 10.1016/j.exppara.2022.108336.
- [56] V. A. Andrade, A. C. Almeida, D. S. Souza, K. G. F. Colen, A. Macêdo, E. R. Martins, F. S. A. Fonseca, R. L. Santos, *Pesq. Vet. Bras.* **2014**, *34*, 1153–1161.
- [57] R. O. S. Fontenelle, S. M. Morais, E. H. S. Brito, M. R. Kerntopf, R. S. N. Brilhante, R. A. Cordeiro, A. R. Tomé, M. G. R. Queiroz, N. R. F. Nascimento, J. J. C. Sidrim, M. F. G. Rocha, *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 934–940.
- [58] C. Neveu, C. Charvet, A. Fauvin, J. Cortet, P. Castagnone-Sereno, J. Cabaret, *Parasitology* **2007**, *134*, 1105–1110.
- [59] M. de L. Mottier, R. K. Prichard, *Pharmacogenet. Genomics* **2008**, *18*, 129–140.
- [60] C. L. Charvet, F. Guégnard, E. Courtot, J. Cortet, C. Neveu, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2018**, *8*, 540–549.
- [61] H. Ueno, P. C. Gonçalves, ' *Manual para Diagnóstico Das Helmintoses de Ruminantes*', Japan International Cooperation Agency, Tokyo, **1998**.
- [62] G. C. Coles, C. Bauer, F. H. M. Borgsteede, S. Geerts, T. R. Klei, M. A. Taylor, P. J. Waller, *Vet. Parasitol.* **1992**, *44*, 35–44.
- [63] J. Hubert, D. Kerboeuf, *Vet. Rec.* **1992**, *130*, 442–446.
- [64] M. S. Hounzangbe-Adote, V. Paolini, I. Fouraste, K. Moutairou, H. Hoste, *Res. Vet. Sci.* **2005**, *78*, 155–160.
- [65] OECD, in *Oecd Guidel. Test. Chem. Sect. 4*, **2002**, pp. 1–14.

---

Manuscript received: January 27, 2023  
 Accepted manuscript online: May 12, 2023  
 Version of record online: June 16, 2023



3.2 CAPITULO II: ANTHELMINTIC POTENTIAL OF *SIMAROUBA BERTEROANA*  
KRUG & URB. EXTRACTS AND FRACTIONS AGAINST  
MULTIDRUG-RESISTANT *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Artigo científico a ser submetido na revista Veterinary Sciences, open access journal on veterinary sciences published monthly online by MDPI, **Fator de Impacto:** 2.0 (2023); 5 anos fator de impacto: 2.2 (2023) ISSN: 2306-7381, <https://www.mdpi.com/journal/vetsci>

## **Anthelmintic Potential of *Simarouba berteriana* Krug & Urb. Extracts and Fractions Against Multidrug-Resistant *Haemonchus contortus***

Marcos Javier Espino Ureña<sup>1,2,3</sup>, Albert Katchborian-Neto<sup>4</sup>, José Garcez Neto<sup>5</sup>, Francisco Flávio da Silva Lopes<sup>5</sup>, Selene Maia de Moraes<sup>5</sup>, Vitor Eduardo Narciso dos Reis<sup>6</sup>, Carmen Lúcia Cardoso<sup>6</sup>, Lorena Mayana Beserra de Oliveira<sup>7</sup>, Claudio Viegas Jr.<sup>8</sup>, Marcos José Marques<sup>1</sup> and Wesley Lyeverton Correia Ribeiro<sup>9</sup>

1 M. J. Espino Ureña, M. J. Marques Department of Pathology and Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, 700 Gabriel Monteiro da Silva St., 37130-001, Alfenas-MG, Brazil, E-mail: [marcos.marques@unifal-mg.edu.br](mailto:marcos.marques@unifal-mg.edu.br), [marcosespinou@gmail.com](mailto:marcosespinou@gmail.com)

2 M. J. Espino Ureña, Animal Production Center, Dominican Institute of Agricultural and Forestry Research, Duarte Ave., Km 24, Pedro Brand, 340 Parcel, Santo Domingo, Dominican Republic

3 M. J. Espino Ureña Faculty of Agronomic and Veterinary Sciences, Autonomous University of Santo Domingo, 10904 Camino de Engombe St., Santo Domingo, Dominican Republic

4 A. Katchborian-Neto, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 700 Gabriel Monteiro da Silva St., 37130-001, Alfenas-MG, Brazil

5 J. Garcez Neto, F., F. F. Silva Lopes, S. M. Moraes, Laboratory of Chemistry of Natural Products, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, 1700 Dr. Silas Munguba Av., 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil.

6 V. E. Narciso Reis, C. L. Cardoso Department of Chemistry, Group of Bioaffinity Chromatography and Natural Products, Faculty of Philosophy, Science and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

7 S. M. de Moraes, L. M. B. Oliveira Postgraduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, 1700 Dr. Silas Munguba Av., 60714-903, Fortaleza-CE, Brazil.

8 C. Viegas Jr. Laboratory of Research in Medicinal Chemistry - PeQuiM, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 2600 Jovino Fernandes Sales Ave., 37133-840, Alfenas-MG, Brazil

9 W. L. C. Ribeiro Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, 1127 Coronel Nunes de Melo St., 60430-275, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE, Brazil

### **Simple Summary**

Gastrointestinal nematode infections pose a global threat to small ruminant production, worsened by the growing resistance to existing anthelmintic drugs. This study evaluated the *in vitro* anthelmintic activity and chemical profile of *Simarouba berteriana* extracts and fractions. High levels of phenolics, tannins, and flavonoids were quantified in crude extracts and medium- and high-polarity fractions; additionally, quassinoids, terpenoid quinones, phytosterol lipids, alkaloids and naphthoquinones were annotated. The hydroalcoholic and isobutanol fractions showed significant inhibitory effects on *Haemonchus contortus* egg hatching, and the extracts

and fractions adhered to eggshells, leading to evisceration and cuticle detachment in larvae. Except for the hexane fraction, all tested extracts and fractions inhibited the exsheathment of third-stage larvae. These findings indicate the *S. berteriana* as a promising source of natural compounds for developing new anthelmintic treatments.

## Abstract

Gastrointestinal nematode infections pose a significant threat to small ruminant production, leading to substantial economic losses worldwide. The increasing prevalence of anthelmintic resistance has driven the exploration of alternative therapies, including phytotherapeutic approaches. This study investigates the chemical composition of crude extracts and fractions of *Simarouba berteriana*, an endemic plant from Hispaniola, and evaluate their *in vitro* anthelmintic activity against a multidrug-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. Chemical analyses revealed high contents of phenolic compounds, tannins, and flavonoids (except in the hexane fractions) and confirmed the presence of 22 quassinoids, 5 phytosterol lipids, 3 terpenoid quinones, 3 alkaloids, and 1 naphthoquinone. The hydroalcoholic fraction from the first collection and the *iso*-butanol fraction from the second collection exhibited the most potent egg hatching inhibition ( $IC_{50}=0.93$  and  $1.21$  mg/mL, respectively), while the hexane fractions showed the lowest potency ( $p < 0.05$ ). Fluorescence microscopy revealed that extracts and fractions adhered to eggshells, causing evisceration and cuticle detachment in hatched larvae. Except for the hexane fractions, the crude extracts and the other fractions inhibited the exsheathment of third-stage larvae (at  $0.3$  mg/mL), and the addition of polyvinylpyrrolidone confirmed that this effect was due to the presence of phenolic compounds. This study provides the first evidence of the ovicidal and the larval exsheathment inhibition activity of *S. berteriana* extracts and fractions, demonstrating their potential against *H. contortus* eggs and infective larvae, underscoring their potential for managing gastrointestinal nematodes in small ruminants. Further *in vivo* studies are necessary to confirm these findings.

Keywords: *Endemic plant, Exsheathment, Phytotherapy, Ovicidal, Phenolic content, Quassinoids.*

## 1. Introduction

Parasitic diseases are a significant global challenge to animal health, posing a major obstacle to sustainable and more efficient food production [1]. Among parasitic these, gastrointestinal nematodes (GIN) represent one of the most critical health problems in small ruminant production systems, leading to substantial economic losses worldwide [2,3]. *Haemonchus contortus*, the most pathogenic nematode [4] and the most prevalent in tropical and subtropical regions of the World [5], is particularly concerning due to its hematophagous feeding habits, which can rapidly lead to severe anemia, and the death in affected flocks [6]. In addition, haemonchosis is of particular concern because *H. contortus* employs survival strategies such as larval developmental arrest at the fourth larval stage (L<sub>4</sub>) in the mucosa, a process known as hypobiosis, allowing it to endure unfavorable environmental conditions until favorable temperatures and humidity return [4]. The growing resistance of *H. contortus* to conventional anthelmintic drugs is a pressing concern [7]. Resistance has been documented across all major classes of anthelmintics, including benzimidazoles, macrocyclic lactones, imidazothiazoles, and even newer molecules like monepantel [8] and derquantel [9]. This escalating problem underscores the urgent need for novel anthelmintics with different mechanisms of action as alternatives to combat GIN effectively [6,10].

Phytotherapy has emerged as a promising alternative to synthetic antiparasitic and antimicrobial drugs, offering advantage such as effectiveness, greater accessibility in certain regions, lower costs, and reduced environmental impact [9,11,12]. Plant species of the family Simaroubaceae are well known for their medicinal properties, and have been traditionally used for the treatment of malaria and parasitic infections [13–15]. A hallmark of this plant family is the widespread presence of quassinoids, a natural product chemical class derived from the triterpenoids, [16] which exhibit a range of biological activities [13]. Species such as *Simarouba glauca* have demonstrated antiparasitic properties, particularly in the management of ectoparasites, with bioactive compounds such as alkaloids and phenolic compounds, including tannins and flavonoids that were already isolated in the leaves [17,18]. Nevertheless, quassinoids, including ailanthinone, glaucarubinone and holacanthone, are recognized as the primary bioactive metabolites in Simaroubaceae plants, exhibiting potent antiparasitic effects [19]. Notably, aqueous and ethanolic extracts of *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae) stems and roots, as well as its isolated quassinoids, neosergeolide, and isobrucein B, have demonstrated significant *in vitro* anthelmintic activity, including lethality against the third-stage larvae of *H. contortus* [15].

In recent studies, Brazilian medicinal plants traditionally used as anthelmintic agents ranked Simaroubaceae as the fourth most frequently cited family, with *Simarouba versicolor* being the most commonly reported species<sup>[14]</sup>. Given the phytochemical similarities among species within the *Simarouba* genus, it is hypothesized that *S. berteriana*, may exhibit comparable biological activities, including anthelmintic effects. Thus, *S. berteriana* Krug & Urb., commonly known as "Olivo", is an endemic plant on the Caribbean Island Hispaniola, that can grow up to 20 meters in height (Supplementary material **Figure S1**), and is usually found in Pedernales, Dominican Republic<sup>[20]</sup>. Despite its traditional use in ethnomedicine, pharmacological and phytochemical studies are limited. However, previous research of Devkota et al.<sup>[21]</sup> isolated a series of compounds from *S. berteriana*, including eight canthine alkaloids, quassinoids, and one neolignane derivative<sup>[21]</sup>, suggesting potential antiparasitic activity similar to other *Simarouba* species.

Addressing the need for alternative therapies for helminth control in small ruminants, the present study assesses the *in vitro* anthelmintic potential of the crude extracts and fractions of *S. berteriana* leaves, collected during two different, against a multidrug-resistant isolate of *H. contortus*. To assess potential ultrastructural damage to the eggs and larvae of *H. contortus* induced by *S. berteriana* was employed the fluorescence microscopy with propidium iodide. In addition, liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) analyses were performed to evaluate the chemical composition of the extracts and fractions of *S. berteriana*. This research aims to establish *S. berteriana* as a viable source of natural anthelmintics, contributing to the development of sustainable alternatives for parasite control in small ruminant production.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Collection and management of plant material

The plant material was first collected in February 22, 2020 (at the end of the winter), in its natural habitat, in Pedernales province, Dominican Republic (17° 50' 55" N, 71° 20' 11" W), with 26°C and a relative humidity of 75%. It was identified by a taxonomist, and a voucher specimen was deposited at the National Botanical Garden (JBSD) "Dr. Rafael M. Moscoso" under the code 11831. Approximately 20 kg of plant material, consisting of thin stems, leaves, and fruits, were obtained and stored in plastic bags. Then, the plant material was subsequently dried in air, and protected from sunlight for 14 days and ground into 2-3 mm particles. The

powder material was stored in plastic cages. A second collection was carried out in the same place in June 15, 2021 (late spring period), with 25°C and relative humidity of 89%, resulting in 29.87 kg of fresh leaves and stems (no fruits). The plant material was treated in the same way as the first one.

## 2.2. *Obtention of Extracts and Fractions*

The crude extract from each collection were obtained using a percolator system for maceration with 95% ethanol for 24h, followed by another extraction round for 45 minutes. The crude extracts were then concentrated under reduced pressure at 45°C, resulting in 52.8 g and 127.2 g of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> collected material, respectively (~ 6.8% yield), which were stored in dark glass containers at -20°C until use. The crude extracts (10g) from the 1<sup>st</sup> (Sb1) and 2<sup>nd</sup> collections (Sb2) of *S. berteriana* were resuspended in a 7:3 MeOH/H<sub>2</sub>O mixture (100mL) and submitted to a liquid-liquid partition with hexane, ethyl acetate and *iso*-butanol (40 mL each). As a result, the hexane (HexFr), ethyl acetate (EtAcFr), *iso*-butanol (isobFr), and the remaining hydroalcoholic (FrHaq) fractions were obtained. Subsequently, all these fractions were concentrated under vacuum (rotatory evaporator), furnishing the eight corresponding fractions as follows: Sb1- HexFr (0.17g, 2.8%), EtAcFr, (1.77g, 28.9%), isobFr (1.03g, 16.9%); Sb2 – HexFr (0.11g, 2.4%), EtAcFr (1.93g, 43.7%), isobFr (1.56g, 35.2%), and HaqFr (0.83g, 18.7%).

## 2.3. *Spectrophotometric analysis*

### 2.3.1 *Total phenolic content*

The total phenolic content was determined by spectroscopy in the visible range using the Folin-Ciocalteu method adapted from Sousa et al. [22]. Briefly, 7.5 mg of each extract was dissolved in MeOH, then transferred to a 25 mL volumetric flask and the final volume was made up with MeOH. A 100 µL aliquot of this solution was shaken for 30 seconds with 500 µL of Folin-Ciocalteu, then 6 mL of distilled water and 2 mL of 15% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were added. The mixture was shaken again for 1 minute and made up to 10 mL with distilled H<sub>2</sub>O. After 2 h in the dark, the absorbance of the samples at 750 nm was determined in triplicate using a UV-Vis spectrophotometer. The quantification of phenolic compounds was determined using the analytical curve of gallic acid:  $y = 0.1277x + 0.0118$ ,  $R^2 = 0.9953$ . The results are expressed in mg of gallic acid equivalent per gram of extract or fraction (mg EAG/g).

### 2.3.2. *Total tannin content*

Total tannins in the crude extract and fractions were quantified according to the Folin-Denis method [23] and expressed as tannic acid equivalents. Briefly, 5 mg of each crude extract was dissolved in 100 mL of distilled water, then 1 mL of this solution was added to a test tube with 1 mL of Folin-Denis reagent. The mixture was then shaken and allowed to stand for 3 min. Finally, 1 mL of 8% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added to each solution, stirred, and allowed to stand for 2 h. After this time, the absorbance was read on a spectrophotometer at 725 nm. The equation for the calibration curve:  $y = 0.0748x - 0.0067$ ,  $R^2 = 0.9995$ , was used to determine the total tannin content, where x is the absorbance value of the readings from the tubes of each extract. The results are expressed in mg of tannic acid equivalents per gram of extract or fraction (mg TAE/g).

### 2.3.3 Total flavonoid content

The total flavonoid content was determined by spectrometry in the visible range using the AlCl<sub>3</sub> method adapted from Funari and Ferro [26]. To quantify the total flavonoids in the samples, a solution is prepared by dissolving 20 mg of the extract/fraction sample in 10 mL of ethanol. An aliquot of 2 mL of this solution (concentration 2 mg/mL) was mixed with 1 mL of 2.5% AlCl<sub>3</sub> solution, and the volume was completed to 25 mL with ethanol. After resting in the dark for 30 minutes, the absorbance of the sample was determined at 425 nm on the spectrophotometer. The absorbance of the solutions prepared with the standard was determined in triplicate (3 times). The quantitation of flavonoids was determined using an analytical curve for quercetin. The curve used was  $y = 0.0677x - 0.0114$ ,  $R^2 = 0.9992$ , where x is the absorbance value of the readings from the tubes of each extract. Results are expressed as quercetin equivalents per gram of extract (mg EQ/g).

### 2.4. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) analyses

The chemical composition of the extracts and fractions was analyzed using a Nexera XR HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of two LC 20AD pumps, a Sil-20A injector, a DGU-20A degasser, a CTO-20A oven, and a CBM-20A controller. The LC system was coupled to an AmaZon Speed Ion Trap (IT) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The HPLC-IT/MS(n) was controlled by Bruker Compass Hystar software (version 4.5). The chromatographic separation was performed with a Kinetex<sup>®</sup> C18 100 A column (50 mm × 4.6 mm, 2.6 μm particle size). The solvents used were water (A) and acetonitrile (B), both phases acidified with 0.1% formic acid. The analysis was conducted in gradient elution mode at a flow rate of 0.3 mL/min under

the following conditions: 0–40 min: 5% to 100% B; 40–45 min: 100% B; 45–50 min: 5% B. The extracts and fractions were diluted in methanol to a concentration of 1.0 mg/mL and 10 µL of each solution was injected in duplicate alongside blank samples under the described conditions. The ion trap mass spectrometer parameters were optimized according to the manufacturer's recommendations (Bruker) for the ionization source with a chosen flow of 0.3 mL/min: capillary voltage – 4.5 kV (positive mode); end plate offset - 550 V; nebulizer gas pressure (N<sub>2</sub>) 40 psi; drying gas (N<sub>2</sub>); gas flow - 9.0 L/min; ionization temperature - 300°C. Analyses were performed in negative and positive ionization modes, covering a mass range of 50 to 1000 *m/z*. The raw data containing peak area and *Rt*–*m/z* pairs were exported to the .mzML format and then imported into MZmine 3.8.2 (<https://mzmine.github.io/>) for data visualization and analysis. Putative ion annotations in the analyzed extracts and fractions were performed by matching the nominal mass of protonated ions (ESI+) with the online Dictionary of Natural Products (DNP) v.33.1 [25].

## 2.5. Animals

Two 5-month-old male crossbred sheep of the Blackbelly and Santa Inês breeds were used as donors of infective *H. contortus* larvae to perform *in vitro* tests. Each sheep, initially free of gastrointestinal parasite infection, was infected with approximately 6,000 third-stage larvae (L<sub>3</sub>) of a multidrug-resistant isolate of *H. contortus*.

## 2.6. *Haemonchus contortus* isolate

For both *in vitro* experiments, sheep were artificially infected with an *H. contortus* isolate known as Kokstad (KOK), which is recognized as a multidrug-resistant (MDR) that shows resistance to benzimidazoles, levamisole, and macrocyclic lactones [26–28].

## 2.7. *In vitro* anthelmintic tests

### 2.7.1. Egg hatch test (EHT)

The EHT was performed according to Coles et al. [29]. First, the feces of the animal harboring *H. contortus* were collected directly from the rectum and processed according to Hubert and Kerboeuf [30], to obtain a suspension containing the parasite eggs. Briefly, 250 µL of the egg suspension containing approximately 100 eggs was incubated for 48 h at 25°C with 250 µL of the extracts and fractions of *S. berteroana* at different concentrations (16, 8, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.25 mg/mL). This assay was performed with two controls, 0.5% DMSO as



negative control and 0.1 mg/mL of thiabendazole as positive control. After incubation, drops of Lugol's iodine solution were added to stop egg hatching, and eggs and first-stage larvae (L<sub>1</sub>) were counted under a light microscope (Opton®) in the 10x objective. At least three repetitions were performed with four replicates for each treatment and control.

### 2.7.2. Optical fluorescence microscopy

In addition to light microscopic observations to count eggs and hatched 1<sup>st</sup> stage larvae, three samples of each treatment at each concentration were also evaluated in an optical fluorescence microscope (Nikon®, Tokyo, Japan) in the 10x and 40x objective lens to verify or confirm the ultrastructural changes detected in the light microscope. Thus, fluorescence microscopy of *H. contortus* eggs helped to evaluate the changes induced by the treatments in morphology, viability of eggs, and larval formation. Propidium iodide was used to confirm disruptions of the eggshell, egg membranes or cuticles of 1<sup>st</sup> stage-hatched larvae. Samples were prepared similarly to EHT with some modifications. The time of incubation was approximately 24 h (25°C) and after this period the samples were kept refrigerated (8°C) until the microscopic evaluation within a maximum period of 8 h. The mean and highest concentration of each extract and fraction, as well as the negative and positive controls, were evaluated, which were the same as for the EHT. The eggs were stained with propidium iodide (Sigma-Aldrich®) at a ratio of 5:50, that is, 5 µL of propidium iodide (PI) for 50 µL of egg solution in contact with the respective treatments. The samples were then evaluated with the Nikon fluorescence microscope and visualized at 40x objective at 561 nm to detect PI in contact with dead or damaged eggs and larvae.

### 2.7.3. Larval artificial exsheathment assay (LAEA)

To recover *H. contortus* third-stage larvae (L<sub>3</sub>), feces were collected directly from the rectum of an experimentally infected sheep and processed according to Roberts and O'Sullivan [31]. Larvae were stored at 4°C. Twenty-four hours before the experiment, 2- to 3-month-old larvae were transferred to 25°C. The viability and the proportion of exsheathed larvae were checked under a light microscope (Opton®) at 10x, (viability greater than 97%). The test was performed according to Alonso-Díaz et al. [32]. The extracts and fractions were diluted in phosphate buffer solution (PBS) and the concentration evaluated was 300 µg/mL. Approximately 1,000 to 1,300 ensheathed L<sub>3</sub> were incubated for 3 h at 25°C with each extract and fraction. The larvae were washed and centrifuged three times in PBS (pH 7.2). The L<sub>3</sub> was

then subjected to the process of artificial exsheathment by incubation in a solution of sodium hypochlorite (2% w/v) diluted 1:300 in PBS and divided into 7 aliquots.

The kinetics of larval exsheathment was monitored under the optical microscope (10x) for 1 h, and exsheathed larvae were counted at 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min after contact with the hypochlorite dilution. PBS was used as a negative control. Four replicates were performed for each extract and fraction. Negative control was done to examine changes in the proportion of exsheathed larvae as a function of time. Also, each extract and fraction at 300 µg/mL was pre-incubated overnight with 50 mg/mL Polivinilpolipirrolidone (PVPP) (Sigma-Aldrich®) to evaluate the role of tannins present in the extracts and fractions, as PVPP is a tannin inhibitor by forming a complex. Therefore, after the addition of PVPP to each extract and fraction, the assay was performed as previously described, including PVPP and PBS as a second negative control. At least four replicates were performed for each extract, fraction, and control.

## 2.8. Statistical analysis

### 2.8.1 Spectrophotometric data

The values of total phenolic compounds, tannin, and flavonoid contents were determined with at least three replicates and subjected to descriptive statistics. The mean and standard deviation of the contents of these compounds were determined using GraphPad Prism software v.8.0.2. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test was used to assess statistical differences ( $p < 0.05$ ) between the values.

### 2.8.2 *In vitro* anthelmintic evaluation

In the EHT, the percentage effect of crude extracts and fractions was obtained using the formula:  $\%E = [(\text{number of eggs}/\text{number of eggs} + \text{number of hatched } L_1)] \times 100$ . The data were subjected to the Shapiro-Wilk test for normality analysis ( $p < 0.05$ ). Since the data passed this test, they were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by comparison with Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The effective concentration to inhibit 50% (IC<sub>50</sub>) and 90% (IC<sub>90</sub>) of the egg hatching was determined by probit regression in the IMB SPSS statistics® 22 software for Windows (New York, USA). Additionally, a one-way ANOVA followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ) was performed to compare the IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> values of each extract and fraction. In LAEA, the effect of crude extracts and fractions of the effect on the percentage of 3rd-stage larvae sheathing was obtained using the formula:

$\%E = [\text{number of exsheathed } L_3 / (\text{number of sheathed } L_3 + \text{number of exsheathed } L_3)] \times 100$ . Descriptive statistics of the values were then performed and the means and standard errors of the exsheathing percentages were plotted using GraphPad Prism<sup>®</sup> 8.0.2 software.

### 3. Results

#### 3.1. Chemical analysis

##### 3.1.1. Phenolic, tannins and flavonoid content

We determined the total phenolic, tannin, and flavonoid contents of the crude extracts and their fractions, which was the first time this has been done for the studied species (**Table 1**). However, the yield of the hexane fraction of the *S. berteriana* crude extract (1<sup>st</sup> collection) was insufficient to allow the determination of the content of these compounds.

**Table 1.** Values of total phenolic, tannin, and flavonoid content (mean  $\pm$  standard deviation) expressed in mg/g of crude extracts and fractions of *Simarouba berteriana*.

<i>S. berteriana</i> Extract/Fraction	Crude extract	HexFr	EtAcFr	isobFr	HalcFr
Phenolic (mg GAE/g)					
Sb1	255.47 $\pm$ 22.6 <sup>b</sup>	-	333.33 $\pm$ 34.1 <sup>ba</sup>	354.33 $\pm$ 31.8 <sup>a</sup>	288.71 $\pm$ 9.5 <sup>abA</sup>
Sb2	276.47 $\pm$ 44.7 <sup>bc</sup>	57.74 $\pm$ 61.9 <sup>d</sup>	354.33 $\pm$ 4.6 <sup>ab</sup>	374.45 $\pm$ 21.4 <sup>a</sup>	189.85 $\pm$ 11.8 <sup>cB</sup>
Tannin (mg TAE/g)					
Sb1	422.04 $\pm$ 51.6 <sup>aA</sup>	-	545.94 $\pm$ 29.2 <sup>b</sup>	528.5 $\pm$ 17.0 <sup>b</sup>	456.95 $\pm$ 28.5 <sup>aB</sup>
Sb2	495.8 $\pm$ 26.9 <sup>aB</sup>	15.45 $\pm$ 4.2 <sup>c</sup>	500.0 $\pm$ 31.3 <sup>a</sup>	517.92 $\pm$ 26.0 <sup>a</sup>	324.19 $\pm$ 17.2 <sup>ba</sup>
Flanovoids (mg QE/g)					
Sb1	22.73 $\pm$ 1.1 <sup>bB</sup>	-	30.88 $\pm$ 1.3 <sup>aA</sup>	20.86 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	12.46 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>
Sb2	27.49 $\pm$ 1.9 <sup>aA</sup>	-	21.55 $\pm$ 2.3 <sup>bB</sup>	20.80 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	8.61 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>

Mg GAE/g: mg of gallic acid equivalents per gram, mg TAE/g: mg of tannic acid equivalents per gram, mg QE/g: mg of quercetin equivalents per gram of extract/fraction. Different uppercase letters indicate significant differences between columns and different lowercase letters indicate significant differences between rows ( $p < 0.05$ ). Sb1: crude extract of *S. berteriana* collected in February 2020 (1<sup>st</sup> collection); Sb2: crude extract of *S. berteriana* collected in June 2021 (2<sup>nd</sup> collection); Fr: extract fraction; HexFr: hexane fraction; EtAcFr: ethyl acetate fraction; isobFr: *iso*-butanol fraction and HalcFr: hydroalcoholic fraction.

The *iso*-butanol fraction (isobFr) showed the highest total phenolic content in both Sb1 and Sb2 collections, followed by the EtAcFr. There were no statistical differences between them, and their contents were statistically higher than those of the crude extract. In addition,

the HalcFr showed a total phenolic content that was statistically similar to the crude extract contents, but it was higher ( $p < 0.05$ ) in the Sb1 compared to Sb2 (288.71 and 189.6 mg GAE/g, respectively). The total tannin content was quantified, and the fractions isobFr and EtAcFr showed to have the higher concentrations (517.9 and 500.0 mg TAE/g, respectively), followed by the crude extract (495.8 mg TAE/g), which was statistically similar. However, HalcFr showed a significantly lower total tannin content (324.2 mg TAE/g), followed by HexFr (15.45 mg TAE/g). Similarly, the crude extracts and their EtAcFr and isobFr fractions showed higher concentrations of total flavonoids than the HalcFr fractions. On the other hand, the EtAcFr of Sb1 showed the highest flavonoid content (30.88 mg QE/g), which was statistically different from the other fractions ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.2. Liquid Chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS) analyses

The LC-MS analyses of the extracts and fractions of *S. berteriana* revealed a distinct chromatographic profile (**Figure 1**), with 35 compounds annotated by matching nominal mass with metabolites previously isolated in plant species from the family of Simaroubaceae as well as from the genus *Simarouba*. Among these, 22 matched quassinoids of various types, including glycosylated and quinolone quassinoids, in addition to 5 phytosterol lipids, 3 terpenoid quinones, 3 alkaloids of the glycosylated canthin-6-one group, and 1 naphthoquinone. As expected, considering that the two collections were carried out in different seasons, it was observed that both crude extracts differ in the qualitative and quantitative levels, which suggests that the relative quantity and the type of metabolites may differ depending on the seasonality.

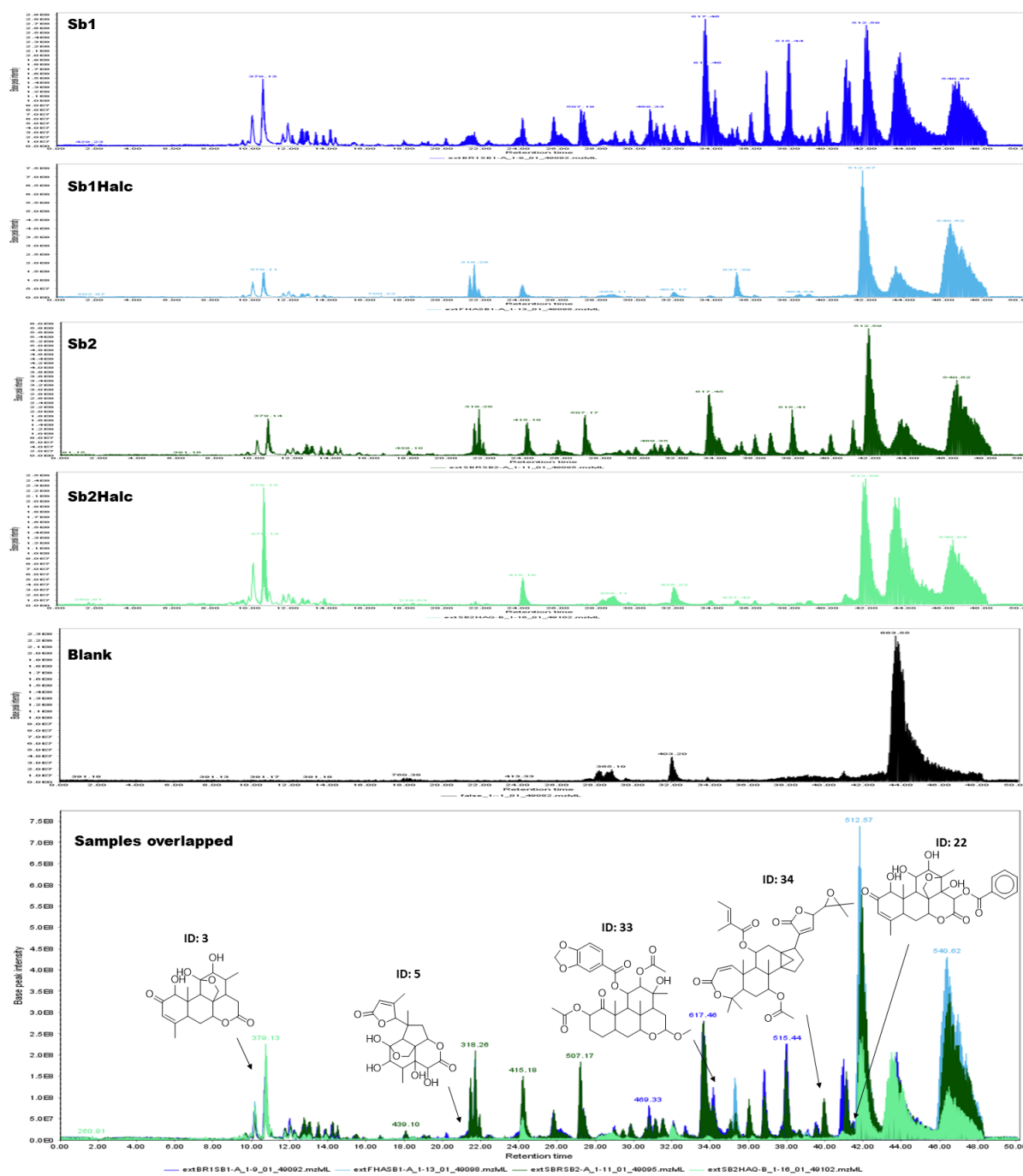
The quassinoid putatively annotated as glaucarubol-15-deoxy, 2-ketone (**Figure 1**, final ID: 3) was among the most intense compounds in the chromatograms of the two crude extracts (Sb1 and Sb2), and the hydroalcoholic fraction (Sb1-HalcFr and Sb2-HalcFr) (**Table 2**). The compound annotated as glaucarubol 15-glucopyranoside (final ID: 28) also exhibited the highest peak areas in both crude extracts. In addition, the annotated quassinoid glaucarubol-13,18-didehydro-2-ketone-(2-hydroxy-2-methylbutanoyl) (Final ID: 17) was among the most intense annotated peaks with the highest intensity in the crude extract of Sb1. Likewise, the annotated naphthoquinone javanicin D (Final ID: 33) was detected with a higher intensity in the crude extract of Sb2. Other compounds annotated as the terpenoid quinone simaroubin B (final ID: 34) and the phytosterol lipid named tirucalla-7,24-dien-3-one (stigmasta-7,22-dien-3) (final ID: 9) were among the most intense annotated peaks in both HalcFr, being higher in the Sb1. In summary, the LC-MS analyses and the cross-matching of previously isolated compounds in the family and genus allowed the detection and annotation of several quassinoids

as constituents of both plant collections' crude extracts and hydroalcoholic fractions. Other compounds detected and annotated in the samples, along with their biological source and SMILES and chemical structures, are provided in the supplementary material (**Table S1** and **S2**).

**Table 2.** LC-MS analyses of the main metabolites detected in the crude extracts and hydroalcoholic fractions of *S. berteriana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections).

Tentative compound annotation	Final ID <sup>a</sup>	RT <sup>b</sup>	M+H <sup>c</sup>	Mol. weight <sup>d</sup>	MF <sup>e</sup>	Natural Product Class	Peak area <sup>f</sup> (x10 <sup>5</sup> ) in each extract/fraction			
							Sb1	Sb1-HalcFr	Sb2	Sb2-HalcFr
Glaucarubol (2-ketone, 15-deoxy)	3	10.8	379	378.1	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	Quassinoids	173.0	6.97	197.0	326.0
Dihydroxy Ailanquassin A	5	21.3	397	396.2	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	Quassinoids	53.2	0.00	5.01	0.00
Brucein K or Brucein E	8	41.0	414	412.6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	2.31	11.7	59.8	2.25
Tirucalla-7,24-dien-3-one (stigmasta-7,22-dien-3)	9	32.1	425	424.2	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	Phytosterol lipids	39.7	82.6	61.9	19.7
Glaucarubol-13,18-didehydro-2-ketone-(2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	17	38.2	493	492.4	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	Quassinoids	105.0	0.00	19.4	0.00
Glaucarubinon or Glaucarubol-2-ketone (2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	18	14.1	495	494.2	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	Quassinoids	3.31	17.2	2.9	16.8
Brucein E (2-ketone, 15-benzoyl)	22	37.2	515	514.4	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	59.4	0.00	15.8	0.00
Glaucarubol (15-glucopyranoside)	28	33.8	559	558.4	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	Glycosylated quassinoids	61.9	0.00	239.0	0.00
Javanicin D	33	34.6	617	616.5	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>12</sub>	Naphthoquinones	10.1	0.00	130.0	0.00
Simaroubin B	34	35.3	637	636.4	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	Terpenoid quinones	50.5	657.0	38.6	31.6

<sup>a</sup>ID: annotations by dnp.chemnetbase.com (2024); <sup>b</sup>RT: retention Time; <sup>c</sup>M+H: mass of the ionized protonated molecule; <sup>d</sup>Molecular weight, <sup>e</sup>MF: molecular formula. <sup>f</sup>Peak intensity: peak area of *m/z* at its respective retention time. Sb1 and Sb1-HalcFr: crude extract and the hydroalcoholic fraction of *S. berteriana* (1<sup>st</sup> collection), respectively, Sb2 and Sb2-HalcFr: crude extract and the hydroalcoholic fraction of *S. berteriana* (1<sup>st</sup> collection), respectively.



**Figure 1.** LC-MS analyses of the overlapped Base Peak Ion (BPI) chromatogram of samples (Sb1: crude extract, Sb1Halc: hydroalcoholic fraction from the 1<sup>st</sup> collection in February 2020 and Sb2: crude extract, and Sb2Halc: hydroalcoholic fraction from the 2<sup>nd</sup> collection in June 2021) in the positive ionization mode with chemical structures of the putatively annotated metabolites. The numbers of the compound are shown in Table 1 (final ID).

### 3.2. *In vitro* anthelmintic tests

#### 3.2.1. Egg hatch test (EHT)

Our experimental results demonstrate the effectiveness of the extracts and fractions of *S. berteroa* in inhibiting *H. contortus* egg hatching. Except for hexane fractions, the crude

extracts and their hydroalcoholic, *iso*-butanol, and ethyl acetate fractions were the most effective at the concentrations used (**Tables 3 and 4**).

**Table 3.** Percentage of egg hatch inhibition (mean and standard deviation) of extracts and fractions of *Simarouba berteriana* from the 1<sup>st</sup> collection (Sb1) against *Haemonchus contortus* Kokstad isolate.

Concentration (mg/mL)	Sb1	HexFr	EtAcFr	IsobFr	HalcFr
16	-	14.43 ± 5.8 <sup>b</sup>	-	-	-
8	-	7.88 ± 1.05 <sup>c</sup>	-	-	-
4	100.0 <sup>aA</sup>	3.11 ± 1.7 <sup>cdB</sup>	100.0 <sup>aA</sup>	100.0 <sup>aA</sup>	100.0 <sup>aA</sup>
3	100.0 <sup>a</sup>	-	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>
2.5	98.72 ± 1.1 <sup>a</sup>	-	98.32 ± 1.9 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	-
2	76.57 ± 3.2 <sup>bB</sup>	2.15 ± 1.02 <sup>dD</sup>	76.25 ± 3.9 <sup>bBC</sup>	71.91 ± 4.1 <sup>bC</sup>	100.0 <sup>aA</sup>
1.5	35.33 ± 2.5 <sup>cC</sup>	-	33.14 ± 2.6 <sup>cC</sup>	44.98 ± 3.2 <sup>cB</sup>	98.51 ± 1.4 <sup>aA</sup>
1	23.26 ± 2.8 <sup>dB</sup>	1.45 ± 1.4 <sup>dC</sup>	25.23 ± 2.7 <sup>dB</sup>	35.76 ± 3.1 <sup>dA</sup>	34.77 ± 3.3 <sup>bA</sup>
0.5	14.74 ± 2.7 <sup>eA</sup>	1.74 ± 0.3 <sup>dC</sup>	9.53 ± 1.9 <sup>eB</sup>	15.27 ± 2.8 <sup>eA</sup>	18.04 ± 1.8 <sup>cA</sup>
0.25	9.36 ± 2.1 <sup>fAB</sup>	-	4.74 ± 1.3 <sup>fB</sup>	8.36 ± 1.4 <sup>fAB</sup>	10.67 ± 2.6 <sup>dA</sup>
0.125	-	-	-	-	7.24 ± 2.4 <sup>d</sup>
0.5% DMSO	2.78 ± 0.8 <sup>g</sup>	2.78 ± 0.8 <sup>d</sup>	2.78 ± 0.8 <sup>g</sup>	2.78 ± 0.8 <sup>g</sup>	2.78 ± 0.8 <sup>c</sup>
Thiabendazole (0.1 mg/mL)	98.49 ± 0.8 <sup>a</sup>	98.49 ± 0.8 <sup>a</sup>	98.49 ± 0.8 <sup>a</sup>	98.49 ± 0.8 <sup>a</sup>	98.49 ± 0.8 <sup>a</sup>

Sb1: crude extract of *S. berteriana* collected in February 2020 (1<sup>st</sup> collection); HexFr: hexane fraction; EtAcFr: ethyl acetate fraction; isobFr: *iso*-butanol fraction and HalcFr: hydroalcoholic fraction. DMSO: Dimethylsulfoxide. Different lowercase letters indicate a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between rows, and different uppercase letters indicate a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between columns, as determined by the Tukey test.

**Table 4.** Percentage of egg hatch inhibition (mean and standard deviation) of extracts and fractions of *Simarouba berteriana* from the 2<sup>nd</sup> collection (Sb2) against *Haemonchus contortus* Kokstad isolate

Concentration (mg/mL)	Sb2	HexFr	EtAcFr	IsobFr	HalcFr
16	-	19.78 ± 2.4 <sup>b</sup>	-	-	-
8	-	12.68 ± 1.7 <sup>c</sup>	-	-	-
4	100.0 <sup>aA</sup>	10.96 ± 1.9 <sup>cdB</sup>	100.0 <sup>aA</sup>	100.0 <sup>aA</sup>	100.0 <sup>aA</sup>
3	100.0 <sup>a</sup>	-	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>
2.5	97.62 ± 2.1 <sup>aA</sup>	-	100.0 <sup>aA</sup>	100.0 <sup>aA</sup>	83.79 ± 8.0 <sup>bB</sup>
2	70.15 ± 6.7 <sup>bB</sup>	10.54 ± 0.5 <sup>cdD</sup>	99.18 ± 0.8 <sup>aA</sup>	100.0 <sup>aA</sup>	60.73 ± 2.6 <sup>cC</sup>
1.5	41.08 ± 3.7 <sup>cB</sup>	-	37.39 ± 4.1 <sup>bB</sup>	55.08 ± 2.8 <sup>bA</sup>	35.53 ± 3.8 <sup>dB</sup>
1	19.99 ± 2.6 <sup>dC</sup>	6.96 ± 3.1 <sup>dD</sup>	26.66 ± 3.4 <sup>cB</sup>	37.33 ± 3.5 <sup>cA</sup>	21.37 ± 4.2 <sup>eBC</sup>
0.5	10.11 ± 2.0 <sup>e</sup>	6.33 ± 1.5 <sup>de</sup>	10.04 ± 1.9 <sup>d</sup>	11.52 ± 1.4 <sup>d</sup>	11.33 ± 2.8 <sup>f</sup>
0.25	5.29 ± 1.3 <sup>f</sup>	-	5.67 ± 1.1 <sup>df</sup>	6.21 ± 1.8 <sup>de</sup>	5.24 ± 1.4 <sup>g</sup>
0.5% DMSO	2.61 ± 1.3 <sup>f</sup>	2.61 ± 1.3 <sup>e</sup>	2.61 ± 1.3 <sup>f</sup>	2.61 ± 1.3 <sup>e</sup>	2.61 ± 1.3 <sup>g</sup>
Thiabendazole (0.1 mg/mL)	98.28 ± 1.0 <sup>a</sup>	98.28 ± 1.0 <sup>a</sup>	98.28 ± 1.0 <sup>a</sup>	98.28 ± 1.0 <sup>a</sup>	98.28 ± 1.0 <sup>a</sup>

Sb2: crude extract of *S. berteriana* collected in June 2021 (2<sup>nd</sup> collection); HexFr: hexane fraction; EtAcFr: ethyl acetate fraction; isobFr: *iso*-butanol fraction and HalcFr: hydroalcoholic fraction. DMSO: Dimethylsulfoxide. Different lowercase letters indicate a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between rows, and different uppercase letters indicate a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between columns, as shown by the Tukey test.



The values of inhibitory concentrations of 50% and 90% in the egg hatch test evidenced that Sb1-HalcFr and Sb2-isobFr of *S. berteroana* were the most potent fractions, showing even higher potencies than their respective crude extracts on the eggs of the Kokstad isolate of *H. contortus* (Table 5). However, their effects (IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> values) were statistically similar to that of ethyl acetate fractions, and crude extracts. Notably, the potent effect observed for Sb1-HalcFr in the inhibition of larval hatching was decreased compared to the same fraction obtained from the second collection (Sb2). Additionally, hexane fractions of both crude extracts showed the weakest anthelmintic effects ( $p < 0.05$ ), with the Sb2-HexFr being statistically more potent than the Sb1-HexFr (Table 5).

**Table 5.** Effective concentration (mean and 95% interval confidence) of extracts and fractions of *S. berteroana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections) to inhibit 50 and 90% the egg hatch of *Haemonchus contortus* Kokstad isolate

Extract/ Fraction	IC <sub>50</sub> mg/mL		IC <sub>90</sub> mg/mL	
	Sb1	Sb2	Sb1	Sb2
Crude	1.465 (1.14 – 1.87) <sup>a</sup>	1.524 (1.34 – 1.72) <sup>a</sup>	2.443 (2.00 – 3.48) <sup>a</sup>	2.377 (2.12 – 2.76) <sup>a</sup>
HexFr	30.661 (23.75 – 46.83) <sup>bA</sup>	37.439 (25.56 – 82.8) <sup>bB</sup>	49.167 (37.0 – 72.54) <sup>bA</sup>	70.411 (46.44 – 163.36) <sup>bB</sup>
EtAcFr	1.515 (1.25 – 1.82) <sup>a</sup>	1.338 (0.94 – 1.83) <sup>a</sup>	2.392 (2.04 – 3.09) <sup>a</sup>	2.057 (1.64 – 3.35) <sup>b</sup>
isobFr	1.382 (1.1 – 1.7) <sup>a</sup>	1.196 (0.93 – 1.49) <sup>a</sup>	2.388 (2.0 – 3.2) <sup>a</sup>	1.897 (1.58 – 2.56) <sup>b</sup>
HalcFr	0.925 (0.56 – 1.3) <sup>a</sup>	1.662 (1.48 – 1.85) <sup>a</sup>	1.517 (1.18 – 2.4) <sup>a</sup>	2.708 (2.44 – 3.1) <sup>b</sup>

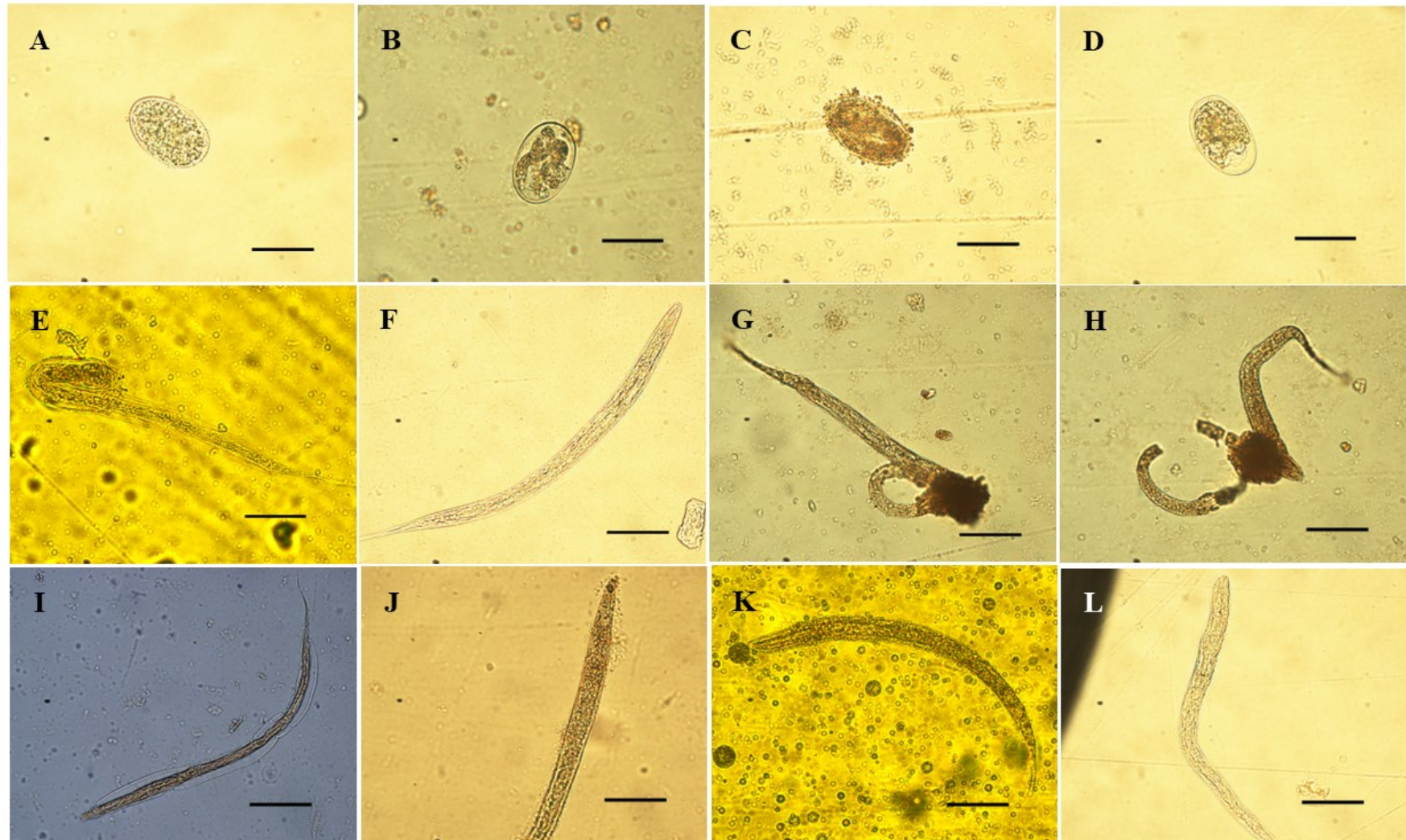
Sb1 and Sb2: *Simarouba* from the 1<sup>st</sup> (February 2020) and 2<sup>nd</sup> (June 2021) collections, respectively; Crude: crude extract; HexFr: hexane fraction; EtAcFr: ethyl acetate fraction; isobFr: isobutanol fraction; HalcFr: hydroalcoholic fraction and IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub>: inhibitory concentration of 50% and 90% respectively. Different lowercase letters indicate a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between rows and different uppercase letters indicate a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between columns in the Tukey test.

It is also worth noting that a significant percentage of eggs exposed to crude extracts and high- and low-polarity fractions exhibited complete development of first-stage larvae inside, which failed to hatch when observed under the optical microscope. The percentage of larval-formed eggs (%LFE) ranged from ~40% at concentrations of 0.5 and 1 mg/mL to over 80% at 2.5 and 3 mg/mL (Figure 2B, C). Additionally, the adhesion of extract particles to the outer surface of the eggshell was evident (Figure 2B and E). Furthermore, at low to medium concentrations (0.5 and 1 mg/mL), some ultrastructural alterations were observed in hatched larvae, including adhesions of extract material to the cuticle (Figure 2J, K), detachment of the cuticle from internal subjacent tissues (Figure 2I), and cuticle rupture with evisceration in some larvae (Figure 2G, H). The number of larvae exhibiting these alterations was quantified relatively to the total number of larvae observed, and the resulting values are shown in the SM

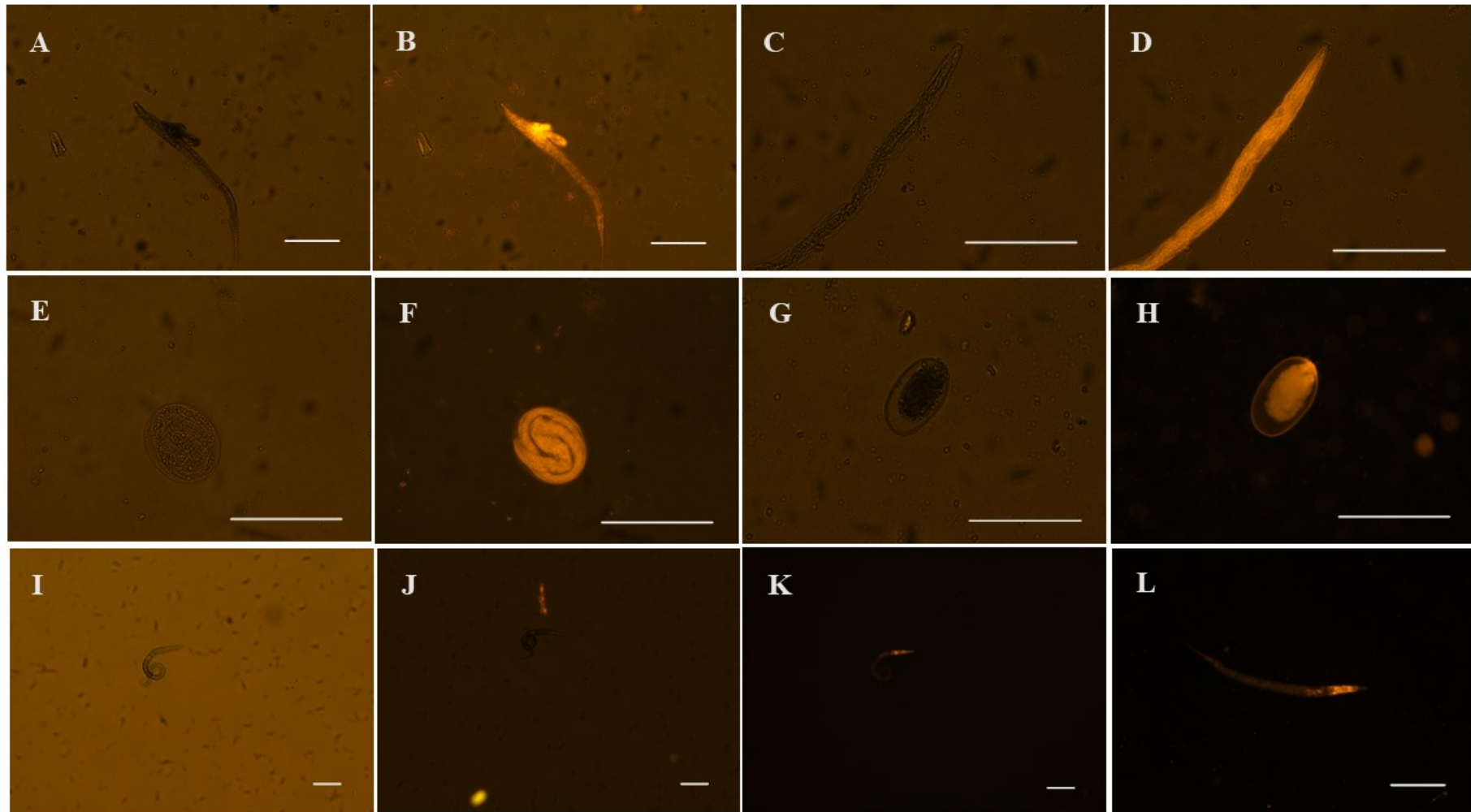
(**Table S3**). The percentage of L<sub>1</sub> with these alterations was higher (~ 50%) in both isobFr and HalcFr from both collections, particularly at concentrations of 0.5 and 1 mg/mL (**Table S3**).

### 3.2.2. Optical fluorescence microscopic evaluation

Given the observation of morphological alterations in the first-stage larvae hatching from the eggs of *H. contortus*, as well as in the eggs themselves, a decision was made to proceed with the photographic documentation of these eggs and larvae using an optical fluorescence microscope. Images were captured in two distinct modes: a clear field mode, which did not utilize fluorescence, and a fluorescence mode with propidium iodide at a wavelength of 561 nm. **Figure 3** illustrates the typical changes observed in *H. contortus* first-stage larvae exposed to the crude extract and fractions of *S. berteroana* at intermediate concentrations (0.5-1 mg/mL). Similarly, **Figure 3** depicts the changes observed in eggs treated with the crude extract and fractions of *S. berteroana* at higher concentrations (2-4 mg/mL). The images were observed at 10x and 40x magnification.



**Figure 2.** Eggs and 1<sup>st</sup> stage larvae of *H. contortus* treated with *S. berteroana* iso-butanol fraction at a concentration of 0.5 mg/mL (B, G, H, I), hydroalcoholic fraction at 2.5 mg/mL (C, J), Hexane fraction at 8 mg/mL (E, K), and negative control with 0.5% DMSO in distilled water (A, F) and Thiabendazole at 0.1 mg/mL (D, L). The black bars in the lower right margin of the images represent a length of 50  $\mu$ m.

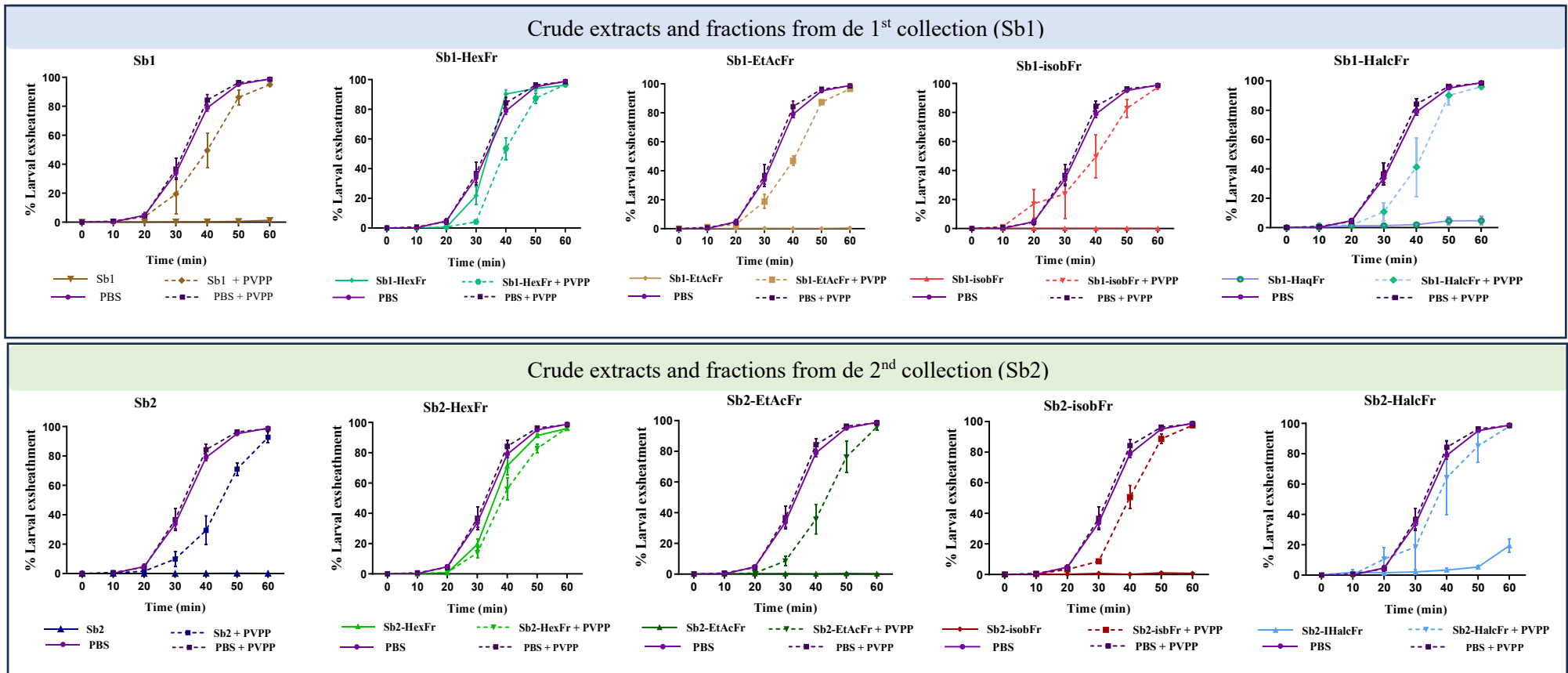


**Figure 3.** Eggs and 1<sup>st</sup> stage larvae of *H. contortus* treated with *S. berteriana* crude extract and hydroalcoholic fraction with and without Propidium Iodide (A-F), while G-L were treated with 0.5% DMSO (G and H show an inviable egg and I-L live at the 1<sup>st</sup> stage larvae). The white bars in the lower right margin of the images represent a length of 100 μm.

### 3.2.2. Larval artificial exsheathment assay (LAEA)

It was observed that at 300  $\mu\text{g/mL}$ , the exsheathment of *H. contortus* larvae was inhibited or delayed for 60 min, with the crude extracts, ethyl acetate, and *iso*-butanol fractions, followed by the hydroalcoholic fractions (exhibiting less inhibition), and the hexane fractions exhibiting no inhibition (**Figure 4**). No significant differences in the inhibition of *H. contortus* larval exsheathment were observed among crude extracts from Sb1/Sb2 or among fractions from the same or different collections. However, the Sb1-HalcFr exhibited a more pronounced inhibitory effect than the same fraction from Sb2 and showed comparable effectiveness to that of the crude extracts, isobFr, and EtAcFr.

The addition of the tannin inhibitor PVPP (50 mg/mL) led to restoring the ability of the larvae to exsheath. This phenomenon was predominantly observed in the crude extracts and fractions isobFr and EtAcFr, with a lesser effect for HalcFr. In the case of the hexane fractions, the addition of PVPP did not result in a perceptible difference in the ability of the larvae to exsheath, as these fractions did not exhibit any inhibitory or delaying effects on the third stage of *H. contortus* larvae.



**Figure 4.** Percentage of exsheathment inhibition (mean and standard error) of 3<sup>rd</sup> stage *H. contortus* larvae in contact with the crude extract and fractions of *S. berteroana* at 300 µg/mL. Sb1 and Sb2: *S. berteroana* crude extract derived from the Sb1 and Sb2, respectively; the hexane fractions (Sb1-HexFr and Sb2-HexFr), ethyl acetate (Sb1-EtAcFr and Sb2-EtAcFr), iso-butanol (Sb1-isobFr and Sb2-isobFr) and Hydroalcoholic (Sb1-HalcFr and Sb2-HalcFr) were obtained from each crude extract of *S. berteroana*; PVPP: polyvinylpolypyrrolidone and PBS: phosphate buffered solution.

#### 4. Discussion

Gastrointestinal nematode infections pose a particular threat to small ruminant production systems, primarily due to the pathogenicity of *H. contortus* [2] which is known for its lethality and its ability to rapidly develop resistance to existing anthelmintic treatments [4,7].

In this study, we aimed to evaluate the effect of extracts and fractions of *S. berteroana* obtained in two different moments on egg hatch and on the inhibition of 3<sup>rd</sup> stage-larvae exsheathment of *H. contortus*. The decision to fractionate the crude extracts was motivated by the need to understand how variations in chemical composition might influence their biological effects and to identify which constituents may contribute most to their observed anthelmintic activity. Indeed, it was observed that crude extracts and fractions of *S. berteroana* exhibited *in vitro* anthelmintic activity against *H. contortus* eggs and infective larvae. The most active fractions in inhibiting egg hatching were the hydroalcoholic fraction from the first collection (Sb1-HalcFr) and the *iso*-butanol fraction from the second collection (Sb2-isobFr).

Concerning phytochemical analysis, there is a lack of published studies on *S. berteroana* extracts and fractions in the literature. Phenolic compounds, such as tannins and flavonoids, are of medium polarity [33]. As expected, it was observed that *iso*-butanol and ethyl acetate fractions concentrated major of the phenolic, tannin, and flavonoid content (**Table 1**), and by contrast, the hexane fractions exhibited minimal concentrations of these compounds. The phenolic content of hexane, ethyl acetate, ethanol, and aqueous extracts derived from *Simarouba glauca* was found to be 0.7, 6.5, 16.5, and 5.9 mgGAE/g, respectively [34]. Additionally, the flavonoid contents of these same extracts were 0.6, 2.8, 4.8, and 4.3 mgQE/g. Therefore, the phenolic and flavonoid contents of *S. berteroana* extracts and fractions were found to be higher than those quantified in *S. glauca* by Jose et al. [34]. In contrast, other study reported that the phenolic content of *S. glauca* aqueous, hydroalcoholic, ethanol, and ethyl acetate extracts, were 92.38, 90.55, 84.55, and 76.69 mg GAE/g, respectively [35], being notably higher than those observed for extracts and fractions of *S. berteroana*. These findings suggest that the content of the phenolic compound type may vary significantly between plant species within a family, and even with the same species, depending on the solvent used to obtaining the extracts or fractions.

Additionally, it is essential to note that the polarity of phenolic compounds varies depending on their chemical structure and complexity or degree of polymerization [36]. A phytochemical study of extracts derived from *S. glauca* revealed that the aqueous extract exhibited the highest total phenolic content (402.4 µg GAE/mg), followed by the methanolic extract, and the ethanolic extract demonstrated the lowest content (200-260 µg GAE/mg) [18].



Similarly to our study, the hydroalcoholic fraction of 1<sup>st</sup> collection of *S. berteroana* (Sb1-HalcFr) exhibited a higher phenolic content compared to its crude (ethanolic) extract, even though the Sb2-HalcFr showed a lower phenolic content compared to its crude extract. In addition, the total flavonoid content of *S. glauca* in the ethanolic extract was observed to be lower in the Umesh <sup>[18]</sup> study when compared to the crude extracts of *S. berteroana* of this study (14.98 µg QE/mg vs. 22.7-27.5 µg QE/mg). However, the aqueous extracts of *S. glauca* exhibited a higher flavonoid content (16.96 µg QE/mg) compared to the hydroalcoholic fractions of *S. berteroana* (12.49 and 8.61 µg QE/mg). This suggests that the phenolic compounds in the extracts of *S. berteroana* exhibit greater structural complexity or a higher degree of polymerization compared to those in the extracts of *S. glauca*. Consequently, these compounds were more concentrated in the crude extracts as well as in the ethyl acetate and isobutanol fractions of *S. berteroana* but were more retained in the aqueous extract of *S. glauca* <sup>[33]</sup>.

Our study revealed that Sb1-HalcFr exhibited a phenolic content statistically comparable to that of the isobFr and EtAcFr from the same correspondent collection. However, the Sb2-HalcFr exhibited a statistically lower phenolic content than that of Sb1, which in turn exhibited a statistically lower phenolic content than isobFr and EtAcFr. Additionally, the total tannin content was found to be statistically lower in the Sb2-HalcFr compared to the Sb1-Halc, while the flavonoid content was also lower but not statistically significant. These variations can be attributed to the known changes in the metabolism of almost all living organisms depending on climate and season, especially in the specialised metabolism of plants, leading to changes in diverse biochemical pathways and fluctuations in the production of different metabolites at different times of the year. In addition, it must be considered that the time of collection of plant material, along with the phenological development stage and any external stressors affecting the specimens at a particular moment, can also influence the metabolites present in their tissues <sup>[37,38]</sup>. Consequently, the concentration of specialised metabolites in the tissues of a given plant will probably fluctuate in response to changes in one or more of these factors over time. Concerning this matter, the *S. berteroana* specimen collected in February 2020 (1<sup>st</sup> collection, Sb1) was observed to be in a state of flowering with the presence of multiple fruits. However, the specimen collected in June 2021 (2<sup>nd</sup> collection, Sb2) was observed to be in a phenological stage devoid of flowers or fruits. Therefore, these phenological variations, in conjunction with the differences in the time of collection, may be the underlying causes of the observed



discrepancies, particularly in the hydroalcoholic fractions, despite the minimal differences observed in the crude extracts and the other fractions.

Moreover, the LC-MS analysis of *S. berteriana* extracts and fractions revealed a diverse array of phytochemicals, including quassinoids, quinone terpenoids, lipid phytosterols, alkaloids, and one naphthoquinone. Out of the 35 compounds putatively annotated, quassinoids dominated with 22. Also, the four most intense annotated peaks in the chromatograms were also predominantly annotated as quassinoids, thus suggesting that quassinoids are major constituents in the analyzed extracts and fractions.

In line with the present findings, Devkota et al. [21], isolated and identified compounds using LC-MS and 1D and 2D-NMR analyses. These compounds included 2 quassinoids, 8 canthin alkaloids, and 1 neo-lignan. Notably, one of the identified canthin alkaloids, canthin-6-one-9-methoxy-5-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, was identified for the first time. The isolated compounds were also found to inhibit cell proliferation in an Nf1- and p53-defective mouse malignant glioma tumour cell line, further highlighting the biological significance of *S. berteriana* plant extract constituents.

Other quassinoids have been isolated and identified in other *Simarouba* species as well. For instance, malikalactone D (SKD) has been isolated from *Simarouba tulae*, which is endemic to Puerto Rico [39]. Additionally, glaucarubinone has been identified in *S. glauca* [40], and 2'-acetylglaucarubine, and 13,18-dehydroglaucarubinone have been identified in *Simarouba amara* from Guyana [41]. The detection and annotation of glaucarubinone (final ID: 4) in the present study further support the presence of this compound within the genus. Furthermore, other classes of compounds, such as alkaloids, terpenoids, steroids, and flavonoids have been identified in other species of the Simaroubaceae family [13,15,16]. These results affirm that the LC-MS analyses of *S. berteriana* extracts and fractions are consistent with the typical phytochemical profile of the family, reinforcing the potential of this species as a rich source of bioactive compounds.

*Simarouba versicolor* was considered as a prominent plant with nematicidal properties, having numerous reports of its use [14]. They also referenced *S. amara* and *Quassia amara* as plants with similar properties. Additionally, *Ailanthus excelsa* has been identified as a species with both nematicidal and anthelmintic properties, along with other reported attributes [42] and *Picrolemma sprucei* Hook. F, [15]. The majority of studies confirming the anthelmintic activity of plant derivatives from the Simaroubaceae family have focused on the mortality of third-stage larvae and adult nematodes of various species.

Zamilpa et al. <sup>[43]</sup> assessed the *in vitro* anthelmintic effect of a hexane extract from *Castela tortuosa* (Simaroubaceae) on the mortality of third-stage larvae (L<sub>3</sub>) of *H. contortus*. The findings revealed that at 20 mg/kg, the mortality rate reached 78.2% after 72 hours. Additionally, the lethal concentration of 90% (LC<sub>90</sub>) was found to be 98.2 mg/mL at 24 hours and 64 mg/mL at 72 hours. A comparison of these results with those of our study reveals that, although L<sub>3</sub> mortality was not evaluated, the LC<sub>90</sub> for the inhibition of egg hatching by the hexane fractions of *S. berteroana* from the first and second collections were 49.4 mg/mL and 74.8 mg/mL, respectively, both of which were lower than those determined by Zamilpa et al. <sup>[43]</sup> It could be attributed that hexane extracts could act better on L<sub>3</sub> mortality while medium- and high-polarity extracts are more potent for inhibiting egg hatching. The aqueous and ethanolic (95%) extracts from the leaves of *Samadera indica* (Simaroubaceae) demonstrated a concentration-dependent anthelmintic effect (10, 25, and 50 mg/mL) on two types of avian nematodes, inducing paralysis and death. The anthelmintic effect was observed in both *Raillietina spiralis* (a flatworm) and *Ascaris galli* (a roundworm) within a shorter time frame compared to Piperazine (10 mg/mL), which was used as a positive control <sup>[44]</sup>. Additionally, the authors attributed the observed anthelmintic activity to the phenolic compounds, such as tannins and flavonoids, present in the plant extracts. Consistent with the findings of Harindran and Rajalakshmi <sup>[44]</sup>, *S. berteroana* extracts and fractions demonstrated a concentration-dependent anthelmintic effect against *H. contortus* in the egg hatch test, albeit at lower concentrations (0.25–16 mg/mL).

The decoction of *Spigelia anthelmia* was also evaluated in the egg hatch test using the *H. contortus* Kokstad isolate, exhibiting 90% and 99.3% inhibition of egg hatching at 5 and 10 mg/mL, respectively <sup>[45]</sup>. Additionally, the *S. anthelmia* decoction exhibited a phenolic content of 96.6 mgGAE/g of extract. A comparison of these results with those from our study reveals that the phenolic compounds in the crude extracts and fractions of *S. berteroana* were present at higher concentrations, except for the exception of the hexane fractions. Furthermore, the egg hatch was inhibited by 90% and 100% at lower concentrations (2.5–3 mg/mL), except for the hexane fractions, showing the correlation between this ovicidal effect and the content of phenolic compounds, irrespective of the plant species from which the extracts are obtained.

Cortes-Morales et al. <sup>[46]</sup> evaluated the crude extract and its ethyl acetate and hydroalcoholic fractions of *Brongniartia montalvoana* in the inhibition of egg hatching of *H. contortus*. The crude extract and ethyl acetate fraction were shown to inhibit 99.7% and 99.2% of egg hatching at concentrations of 6 mg/mL and 0.8 mg/mL, respectively, while the hydroalcoholic fraction showed no effect at 6 mg/mL. These results partially align with our

study, in which the ethyl acetate fraction (second collection) inhibited 99.1% of egg hatching at 2 mg/mL, outperforming both the crude extract (70.2% inhibition) and the hydroalcoholic fraction (60% inhibition) at the same concentration. However, the results differed for the first collection, where both the crude extract and ethyl acetate fraction inhibited approximately 76% of hatching at 2 mg/mL, while the hydroalcoholic fraction was more potent, showing 100% inhibition at the same concentration. Therefore, the ovicidal effects of extracts and fractions is directly related to the concentration of phytochemicals, which is influenced not only by the plant species and the type of solvent used for extraction [46,47] but also by the timing and conditions of plant collection.

High-resolution microscopy techniques, including scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, confocal laser scanning microscopy, and fluorescence microscopy, are employed to observe specific changes in nematodes at various life stages (adult, larval, or egg) to gain insight into the direct effects or modes of action of plant derivatives and their phytoconstituents as nematicidal agents [46,48–50]. In this study, fluorescence microscopy using PI was employed to ascertain whether the constituents of the *S. berteroana* extracts and fractions caused any disruption or rupture of the eggshell and/or membranes of *H. contortus* eggs, as part of their mode of action to inhibit egg hatch. Additionally, the objective was to determine whether the damage observed in hatched first-stage larvae resulted from any disruption or alteration of the cuticle. The rationale for utilizing PI as a DNA staining reagent is that it can only penetrate cells when the cell membrane is injured or ruptured. Once inside the cell, PI intercalates into double-stranded DNA, resulting in red fluorescence [51]. It was observed that eggs in contact with *S. berteroana* crude extracts and fractions, especially at higher concentrations ( $\geq 1$  mg/mL), contained fully developed larvae inside. Additionally, these eggs were more oval in shape and larger in size due to the effects of larval development. The first-stage larvae within the eggs exhibited some morphological changes, such as wrinkling. Upon examination of the eggs using fluorescence microscopy with PI, it was confirmed that the eggshell and membranes were damaged or disrupted, as evidenced by the red-orange staining of the egg interior and the formed larvae inside.

Furthermore, the morphological changes observed in hatched larvae, including larval evisceration and cuticle separation or detachment from the larval body, were examined under fluorescence microscopy. It was also noted that PI penetrated the larval body, indicating that these larvae were dead and that their cuticle and membrane integrity had been compromised. Moreover, eggs and first-stage larvae exposed to 0.5% DMSO (negative control) following the

addition of PI did not exhibit orange staining, indicating the maintenance of membrane and cuticle integrity.

A previous study corroborated the impact of the essential oil of *Lippia dominguensis* on eggs and first-stage larvae of *H. contortus* using confocal microscopy. At a concentration of 2 mg/mL, the eggs exhibited red-orange staining with PI when a Live/Dead™ (Invitrogen™, MA) stain was employed [52]. Additionally, it was observed that the majority of the eggs contained fully developed first-stage larvae, a finding that is similarly evident in this study with *S. berteroana* extracts and fractions. Therefore, it was plausible to suggest that the ultrastructural alterations were caused by the transcuticular diffusion of the essential oil constituents, which in turn caused damage or changes in the permeability of the eggshell membrane, potentially inhibiting the larvae from hatching.

Confocal laser scanning microscopy was employed to observe the effects of *B. montalvoana* crude extract (6 mg/mL), ethyl acetate fraction, and a subfraction (800 µg/mL) on *H. contortus* in the egg hatch test conducted by Cortes-Morales et al. [46]. The crude extract, fraction, and subfraction caused deformations in the eggs, with colocalization (interaction) observed between the green autofluorescence from the larvae and the blue fluorescence from the extract's compounds (flavonoids, coumarins, and hydroxycinnamic acid derivatives) [46]. This suggests an interaction between the compounds and the larvae within the eggs. These authors hypothesized that the ethyl acetate fraction and its subfraction contain compounds capable of penetrating the egg's triple-layer membrane and binding to the larvae, resulting in structural damage and death, although no damage to the eggshell was observed. These findings were consistent with another study that evaluated the ovicidal activity of isokaempferide from *Baccharis conferta* on *H. contortus* larvae [47].

Several mechanisms have been proposed to explain how phytochemicals, such as phenolic compounds, exert their inhibitory effects on egg hatching. Phenolic compounds can disrupt various key biological processes essential for larval development and their subsequent emergence from the eggshell. Phenolics may bind to the lipoproteins of the eggshell membranes, altering their permeability, or form a coating around the egg, which mechanically prevents the larvae from breaking through the eggshell [53,54]. Additionally, phenolic oxidation or hydrolysis products can bind to or interact with eggs through noncovalent or covalent interactions, leading to damage [53]. Another mechanism by which phenolics, such as tannins, inhibit egg hatching is through binding to enzymes (lipase, leucine aminopeptidase, and metalloproteases) and molecules essential for eggshell degradation [55]. This binding inactivates or reduces the production of these enzymes and molecules, thereby preventing the breakdown

of the eggshell [55]. Furthermore, low molecular weight phenolics (400–500 Da) can penetrate the eggshell membranes without disrupting them, binding to the larvae, and impairing their normal development by interfering with vital functions [46,54,56]. These compounds may also reduce normal larval motility, which is essential for breaking through the eggshell membranes and hatching [57].

The unusual shapes of the hatched larvae observed in this study, including evisceration, split-headed larvae, cuticle detachment from the body, and their inability to hatch properly, are likely due to the binding of phenolic compounds to the eggshells and larval proteins. This binding impairs egg hatching or results in larvae with morphological alterations, as observed at lower and middle concentrations of the *S. berteroana* extracts and fractions. At higher concentrations, the effect may be more related to the coating of the extracts and fraction compounds on the eggshell, which may mechanically inhibit egg hatching and bind to membrane proteins, disrupting their proper degradation.

The nematicidal activity of 38 quassinoids isolated from Simaroubaceae was tested against a species of *Diplogastridae* (nematode) [58]. Samaderines B and E, along with brucein D, demonstrated greater efficacy in killing the nematode than the synthetic anthelmintics albendazole, thiabendazole, and avermectin. Watanabe et al. [58] observed morphological changes in the larvae (coil or S-shaped curvature) after quassinoid exposure, similar to the effects seen with picrotoxinin, suggesting a similar mode of action as a GABA receptor Cl<sup>-</sup> channel complex antagonist. These authors also proposed that quassinoids exert their effects by inhibiting nematode protein synthesis. Therefore, it can be hypothesized that the quassinoids present in *S. berteroana* extracts and fractions, many of which possess a molecular weight below 500 Da, may act by penetrating the eggshell membranes and subsequently interact with the developing larvae. This interaction could potentially disrupt normal motility by affecting the neuromuscular system or inhibiting proper protein synthesis, ultimately contributing to the inhibition of egg hatch. It can be reasonably deduced that the diverse phytoconstituents of *S. berteroana* acted in a synergistic or additive manner for inhibiting the egg hatch, through the aforementioned mechanisms of action, given the wide range of compounds present in *S. berteroana* extracts and fractions.

Phenolic compounds, including tannins and flavonoids, have been shown to affect several pivotal biological processes within the parasitic nematode life cycle, such as the establishment of infective L<sub>3</sub> [54,59,60], by inhibiting the process of exsheathment [61,62]. Furthermore, phenolic compounds have been observed to impair the proper motility of L<sub>3</sub> [49,53,57]. The mechanism behind the inhibition or delay of L<sub>3</sub> exsheathment is related to the

ability of tannins and other phenolics to bind to proteins and other macromolecules, resulting in changes to their physical and chemical properties [63]. This is particularly relevant given that the nematode cuticle is known to be a structure rich in proline and hydroxyproline [61,63].

Greiffer et al. [49] investigated the inhibitory effects of phytoconstituents from *Combretum mucronatum* extract on the exsheathment of *Caenorhabditis elegans* larvae using differential interference contrast microscopy, fluorescence microscopy, and atomic force microscopy. Their findings demonstrated that the cuticle serves as the primary binding site for tannins and that structural disruption of the cuticle impaired molting at all larval stages. They further noted that tannin-cuticle binding increased cuticle rigidity without affecting the underlying tissues. Additionally, while tannins did not inhibit the synthesis of new sheaths and cuticles, they interfered with the removal of the old cuticle, altered sheath flexibility, impaired motility, and caused muscle filament alterations, ultimately leading to larval death [49].

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the inhibition of *H. contortus* third-stage larvae exsheathment by *S. berteriana* derivatives. It was observed that, except for hexane fractions, the crude extracts and fractions of *S. berteriana* inhibited or delayed the shedding of *H. contortus* L<sub>3</sub> at a concentration of 0.3 mg/mL. Crude extracts even inhibited exsheathment at 0.15 mg/mL (data not shown). However, the hydroalcoholic fraction from the second collection exhibited a somewhat less pronounced effect between 50 and 60 minutes (**Figure 4**), which may be related to the lower content of tannins, phenolics, and flavonoids in this fraction, as supported by the literature [61,64]. These findings are consistent with those reported by Oliveira et al. [65], whom evaluated the exsheathment of *H. contortus* L<sub>3</sub> (Kokstad isolate) using leaf extracts from tannin-rich plants (*Anadenanthera colubrina*, *Leucaena leucocephala*, and *Mimosa tenuiflora*). The authors observed that larval exsheathment was inhibited at a concentration of 0.31 mg/mL. Additionally, they reported that the phenolic content of the evaluated extracts ranged from 48.2 to 147.9 mg GAE/g, with a tannin content between 30.1 and 138.85 mg GAE/g. Similarly, Macedo et al. [66] investigated the effects of decoctions of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa*, and *Tagetes minuta* on the larval exsheathment of *H. contortus* (Kokstad isolate) by quantifying total phenolic and tannin content. They found that the *A. zerumbet* and *M. villosa* decoctions exhibited higher phenolic content (116.2 and 117.7 mg GAE/g, respectively) and tannin content (107.1 and 87.5 mg GAE/g) compared to the other decoctions. Consequently, these decoctions also exhibited complete inhibition of larval exsheathment at a concentration of 0.31 mg/mL, while the other decoctions achieved the same effect only at 0.62 mg/mL.

A comparison between the results of the aforementioned studies and those of the present study indicates that the plant extracts evaluated in the previous studies had a higher phenolic content than the crude extracts and fractions of *S. berteroana*. Nonetheless, the impact on the larval exsheathment of the same *H. contortus* isolate was found to be quite similar to that observed in the present study, except for the hexane fractions which did not show inhibition of larval exsheathment, and which also showed the lowest phenolic contents.

Klongsiriwet et al.<sup>[67]</sup> demonstrated that the combination of condensed tannins and flavonoids, such as quercetin and luteolin, enhanced anthelmintic activity and exhibited a synergistic effect on larval exsheathment inhibition, even at lower concentrations of procyanidin and prodelphinidin tannins. In our study, the inhibition of larval exsheathment with *S. berteroana* extracts and fractions is likely due to the synergistic action of various phenolic compounds, including tannins and flavonoids. The action of phenolic compounds in plant extracts on larval exsheathment can be further confirmed by the addition of a substance capable of inhibiting tannins and other phenolic compounds through complexation, such as polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)<sup>[32]</sup>. In such cases, the larvae's typical ability to exsheath would be restored. In this study, the inhibitory effects on larval exsheathment observed with *S. globosa* crude extracts and *iso*-butanol, ethyl acetate, and hydroalcoholic fractions were not observed when PVPP was added to larval solution. Instead, larval exsheathment was similar to that of the control groups treated with PBS and PBS + PVPP. Therefore, these results confirmed that the inhibition of the exsheathment of the L<sub>3</sub> was due to the action of the phenolic compounds presents in these extracts and fractions, which were inactivated or complexed by PVPP. These findings are consistent with previous studies<sup>[65,66,68]</sup>.

Regarding quassinoids, it appears that they exerted a minimal impact on larval exsheathment, as the addition of PVPP (which inhibited the phenolic action) resulted in the complete restoration of the ability of *H. contortus* L<sub>3</sub> to exsheath. Further studies are required to gain a deeper understanding of the anthelmintic effects of *S. berteroana* quassinoids on larval exsheathment, as well as to elucidate the mechanisms of action underlying their effects on various stages of the *H. contortus* life cycle. Furthermore, future studies should aim the optimization of plant collection and perform a detailed chemical profile across different harvest to identify the periods and conditions under which the plant's anthelmintic activity is maximized.

## 5. Conclusions

This study provides the first evidence of the *in vitro* anthelmintic activity of *S. berteriana* extracts and fractions, demonstrating their potential in controlling *H. contortus*. The hydroalcoholic, *iso*-butanol, and ethyl acetate fractions, along with the crude extracts exhibited significant efficacy by inhibiting larval hatching and delaying the exsheathment of infective larvae. These effects are likely associated with the high levels of phytochemicals present including phenolic compounds, such as tannins and flavonoids, and also quassinoids, in addition to phytosterol lipids. The phytoconstituents in *Simarouba* extracts and fractions exert their effects, in part, by adhering to the eggshells, thereby inhibiting hatching and larval development. Additionally, the use of propidium iodide staining confirmed that these compounds induced structural damage to eggshells, egg membranes and cuticles of the hatched larvae. Such findings suggest that *S. berteriana* may disrupt the development of *H. contortus* at multiple life stages, highlighting its potential as a natural alternative for parasite control.

Further investigations should focus on toxicity tests, *in vivo* anthelmintic assays and pharmacokinetics, in order to confirm the extent to which the anthelmintic effects of extracts and fractions of *S. berteriana* can be achieved. By addressing these factors, *S. berteriana* extracts and fractions can be effectively integrated into sustainable parasite control programs, offering cost-effective solutions to combat anthelmintic resistance in small ruminant production systems.

### Supplementary Materials

The following supporting information can be downloaded at: [https://\\_\\_\\_\\_\\_](https://_____), Figure S1: Young *Simarouba berteriana* plant cultivated in La Vega province, Dominican Republic, Table S1. LC-MS analyses of the metabolites detected in the crude extracts and hydroalcoholic fractions of *Simarouba berteriana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections), Table S2. Molecular structure and biological sources of metabolites detected in the LC-MS analyses of the crude extracts and hydroalcoholic fractions of *Simarouba berteriana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections), and Table S3. Percentage (mean and standard deviation) of eggs and hatched larvae of *Haemonchus contortus* Kokstad exposed to extracts and fractions of *Simarouba berteriana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections) exhibiting morphological alterations.

### Author Contributions



**MJEU, ABT, LMBO, WLCR, CVJ and MJM** conceived the idea and experiments (conceptualization). **MJEU, ABT, and CVJ** prepared the plant material, obtained the crude extracts and fractions and prepared the samples for the experiments. **JGN, FFSL and SMM** quantified of phenolic, tannin and flavonoid content. **VENR, CLC** and **AKN** performed the instrument LC-MS analysis and the chemical compounds annotations. **MJEU and WLCR** performed the *in vitro* experiments. **MJEU** performed the Fluorescence Microscopy of *H. contortus* eggs and 1<sup>st</sup> stage larvae. **MJEU, AKN, WLCR and MJM** drafted the manuscript. **MJM, JVAF, LMBO** and **WLCR** participate in the data analysis and interpretation of the results. **MJEU, CVJ, WLCR** and **MJM** coordinated the whole project and wrote the final manuscript.

### **Funding**

This study was funded by a consortium of several institutions. Therefore, this work was supported by present the Ministry of High Education, Science, and Technology (MESCYT-FONDOCYT 2018-2019-2B1-165) in the Dominican Republic; the Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG #APQ02353-17 and #APQ00207-18); Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES #001); Research Support Foundation of the State of São Paulo (FAPESP-PROEM 2014/050299-5) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq #312597/2023-1).

### **Institutional Review Board Statement**

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (CEUA-UNIFAL, Minas Gerais, Brazil) and registered under the numbers 0053/2021, 0052/2021 and 0053/2021.

### **Informed Consent Statement**

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

### **Data Availability Statement**

The original contributions presented in the study are included in the article material. Some of the data supporting the results of this study are available in the Supplementary Material to this article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Jardim Botânico Nacional (JBN) and to Teodoro Clase García for their valuable help in the selection and identification of plant material. We also thank Gaby Quispe Palomino from Oocyte and pre-antral ovarian follicle manipulation laboratory (LAMOFOPA) and Wallison B. M. Pacheco from Laboratory of Technology for Goat and Sheep Semen (LTSCO/NBI) at the State University of Ceará-Brazil, for their contribution for developing the optical fluorescence microscopy. Finally, the authors acknowledge to the Brazilian Agencies FAPEMIG, FAPESP, CAPES and CNPq for financial support and fellowships.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Abbreviations

Acetonitrile (ACN), Anti-helminthic (AH), anthelmintic resistance AHR, Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA), aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>), Dimethylsulphoxide (DMSO), Egg Hatch Test (EHT), Ethanol (EtOH), Methanol (MeOH), egg per gram of feces (epg), extract fraction obtained with ethyl acetate (EtAcFr), extract fraction obtained with hexane (HexFr), extract fraction obtained with isobutanol (isobFr), residual extract fraction or hydroalcoholic fraction (HalcFr), Gas chromatography (GC), Liquid chromatography (LC), MS mass spectrometry (MS), First-stage larvae (L<sub>1</sub>) Third-stage larvae (L<sub>3</sub>), Gastrointestinal nematodes (GIN), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Phosphate-Buffered Saline (PBS), polivinilpolipirrolidone (PVPP), propidium iodide (PI), Dominican Republic (RD), *S. berteroana*, Krug & Urb (Sb), *S. berteroana* from first collection (Sb1), *S. berteroana* from second collection (Sb2), Ethyl acetate fraction of the crude extract of *S. berteroana* from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> collection respectively (Sb1-EtAcFr and Sb2-EtAcFr), Hexane fraction of the crude extract of *S. berteroana* from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> collection respectively (Sb1-HexFr and Sb2-HexFr), hydroalcoholic or residual fraction of the crude extract of *S. berteroana* from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> collection respectively (Sb1-HalcFr and Sb2-HalcFr), isobutanol fractions of the crude extract of *S. berteroana* from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> collection, respectively (Sb1-isobFr and Sb2-isobFr), Thiabendazole (TBZ), Federal University of Alfenas

(UNIFAL), tannic acid equivalents (TAE), quercetin equivalents (QE), gallic acid equivalents (GAE), condensed tannins (CT).

## References

- [1] N. D. Sargison, 'The critical importance of planned small ruminant livestock health and production in addressing global challenges surrounding food production and poverty alleviation', *New Zealand Veterinary Journal* 2020, *68*, 136–144.
- [2] A. Beleckė, T. Kupčinskas, I. Stadalienė, J. Höglund, S. M. Thamsborg, S. Stuen, S. Petkevicius, 'Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region', *Acta Vet. Scand.* **2021**, *63*, 18.
- [3] J. Charlier, L. Rinaldi, V. Musella, H. W. Ploeger, C. Chartier, H. R. Vineer, B. Hinney, G. von Samson-Himmelstjerna, B. Băcescu, M. Mickiewicz, T. L. Mateus, M. Martinez-Valladares, S. Quealy, H. Azaizeh, B. Sekovska, H. Akkari, S. Petkevicius, L. Hektoen, J. Höglund, E. R. Morgan, D. J. Bartley, E. Claerebout, 'Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe', *Prev. Vet. Med.* **2020**, *182*, 105103.
- [4] K. V. Arsenopoulos, G. C. Fthenakis, E. I. Katsarou, E. Papadopoulos, 'Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats', *Animals* **2021**, *11*, 363.
- [5] S. C. M. Niciura, G. G. Cruvinel, C. V. Moraes, A. C. S. Chagas, S. N. Esteves, M. V. Benavides, A. F. T. Amarante, 'In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel', *J. Helminthol.* **2020**, *94*, e46.
- [6] J. Sanders, Y. Xie, D. Gazzola, H. Li, A. Abraham, K. Flanagan, F. Rus, M. Miller, Y. Hu, S. Guynn, A. Draper, S. Vakalapudi, K. H. Petersson, D. Zarlenga, R. W. Li, J. F. Urban, G. R. Ostroff, A. Zajac, R. V. Aroian, 'A new paraprobiotic-based treatment for control of *Haemonchus contortus* in sheep', *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2020**, *14*, 230–236.
- [7] A. C. Kotze, R. K. Prichard, *Anthelmintic Resistance in Haemonchus Contortus. History, Mechanisms and Diagnosis.*, Elsevier Ltd, 2016.
- [8] A. E. Mederos, Z. Ramos, G. E. Banchemo, 'First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay', *Parasites and Vectors* **2014**, *7*, DOI 10.1186/s13071-014-0598-z.
- [9] M. Liu, S. K. Panda, W. Luyten, 'Plant-Based Natural Products for the Discovery and Development of Novel Anthelmintics against Nematodes', *Biomolecules* **2020**, *10*, 426.
- [10] R. M. Kaplan, A. N. Vidyashankar, 'An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance', *Vet. Parasitol.* **2012**, *186*, 70–78.
- [11] S. M. Ardoino, R. E. Toso, H. L. Alvarez, E. L. Mariani, P. D. Cachau, M. V. Mancilla, D. S. Oriani, 'Antimicrobial as growth promoters (AGP) in poultry balanced feed: use, bacterial resistance, new alternatives and replacement options', *Cienc. Vet.* **2017**, *19*, 50–66.
- [12] L. W. M. Chávez, P. S. Moctezuma, T. F. Herrera, 'Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México', *Cuad. Geográficos* **2017**, *56*, 27–30.
- [13] I. A. B. S. Alves, H. M. Miranda, L. A. L. Soares, K. P. Randau, 'Simaroubaceae family: botany, chemical composition and biological activities', *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, *24*, 481–501.
- [14] K. N. Kuhn Agnes, D. D. Boeff, L. de Oliveira Carvalho, E. L. Konrath, 'Ethnobotanical knowledge on native Brazilian medicinal plants traditionally used as anthelmintic agents – A review', *Exp. Parasitol.* **2023**, *249*, 108531.
- [15] R. de C. S. Nunomura, E. C. C. da Silva, D. F. Oliveira, A. M. Garcia, J. N. Boeloni, S. M. Nunomura, A. M. Pohlit, 'In vitro studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae)', *Acta Amaz.* **2006**, *36*, 327–330.
- [16] W. W. Thomas, 'The American genera of Simaroubaceae and their distribution', *Acta Bot. Brasilica* **1990**, *4*, 11–18.
- [17] L. Germosen-Robineau, *Farmacopea Vegetal Caribeña*, República Dominicana, 2005.

- [18] T. G. Umesh, 'In vitro antioxidant potential, Free radical scavenging and Cytotoxic activity of Simirouba Gluaca Leaves.', *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *7*, 411–416.
- [19] S. E. Osagie-Eweka, N. E. J. Orhue, E. K. I. Omogbai, F. C. Amaechina, 'Oral acute and sub-chronic toxicity assessment of aqueous leaf extract of Simarouba glauca DC (Paradise tree)', *Toxicol. Reports* **2021**, *8*, 239–247.
- [20] P. P. A. [PPA], *Guía de Arboles Maderables En La República Dominicana*, Santo Domingo, RD, 2012.
- [21] K. P. Devkota, J. A. Wilson, C. J. Henrich, J. B. McMahon, K. M. Reilly, J. A. Beutler, 'Compounds from Simarouba berteroa which inhibit proliferation of NF1-defective cancer cells', *Phytochem. Lett.* **2014**, *7*, 42–45.
- [22] C. M. de M. Sousa, H. R. e Silva, G. M. Vieira-Jr., M. C. C. Ayres, C. L. S. da Costa, D. S. Araújo, L. C. D. Cavalcante, E. D. S. Barros, P. B. de M. Araújo, M. S. Brandão, M. H. Chaves, 'Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais', *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351–355.
- [23] M. Pansera, A. ; C. A. Santos, K. Paese, R. Wasum, M. Rossato, L. D. Rota, G. F. Pauletti, L. A. Serafini, 'Caracteres morfo-anatômicos de folha e caule de Bauhinia microstachya Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul', *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, *13*, 17–22.
- [24] C. S. Funari, V. O. Ferro, 'Análise de própolis', *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 171–178.
- [25] Chemnetbase, 'Dictionary of Natural Products', can be found under <https://dnp.chemnetbase.com/chemical/ChemicalSearch.xhtml?dswid=6877>, 2024.
- [26] C. Neveu, C. Charvet, A. Fauvin, J. Cortet, P. Castagnone-Sereno, J. Cabaret, 'Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode Haemonchus contortus using a cDNA-AFLP approach', *Parasitology* **2007**, *134*, 1105–1110.
- [27] M. de L. Mottier, R. K. Prichard, 'Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on Haemonchus contortus', *Pharmacogenet. Genomics* **2008**, *18*, 129–140.
- [28] C. L. Charvet, F. Guégnard, E. Courtot, J. Cortet, C. Neveu, 'Nicotine-sensitive acetylcholine receptors are relevant pharmacological targets for the control of multidrug resistant parasitic nematodes', *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2018**, *8*, 540–549.
- [29] G. C. Coles, C. Bauer, F. H. M. Borgsteede, S. Geerts, T. R. Klei, M. A. Taylor, P. J. Waller, 'World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance', *Vet. Parasitol.* **1992**, *44*, 35–44.
- [30] J. Hubert, D. Kerboeuf, 'A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes', *Vet. Rec.* **1992**, *130*, 442–446.
- [31] F. Roberts, P. O'Sullivan, 'Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle', *Aust. J. Agric. Res.* **1950**, *1*, 99.
- [32] M. A. Alonso-Díaz, J. F. J. Torres-Acosta, C. A. Sandoval-Castro, A. J. Aguilar-Caballero, H. Hoste, 'In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of Haemonchus contortus larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts', *Vet. Parasitol.* **2008**, *153*, 313–319.
- [33] S. Molino, Bioactivity and Effect on Gut Microbiota, Universidad de Granada, 2021.
- [34] A. Jose, E. Kannan, S. R. V. Madhunapantula, 'Anti-proliferative potential of phytochemical fractions isolated from Simarouba glauca DC leaf', *Heliyon* **2020**, *6*, e03836.
- [35] S. I. Puranik, S. C. Ghagane, R. B. Nerli, S. S. Jalalpure, M. B. Hiremath, 'Evaluation of in vitro Antioxidant and Anticancer activity of Simarouba glauca leaf extracts on T-24 Bladder cancer cell line', *Pharmacogn. J.* **2017**, *9*, 906–912.
- [36] S. Molino, N. A. Casanova, J. Á. Rufián Henares, M. E. Fernandez Miyakawa, 'Natural Tannin Wood Extracts as a Potential Food Ingredient in the Food Industry', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 2836–2848.
- [37] C. C. Arcila-Lozano, G. Loarca-Piña, S. Lecona-Urbe, E. Gonzalez de Mejia, 'El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes', *Arch. Latinoam. Nutr.* **2004**, *54*, 100–111.
- [38] W. K. Costa, A. M. de Oliveira, I. B. da Silva Santos, V. B. G. Silva, J. C. R. de O. F. de Aguiar, D. M. do A. F. Navarro, M. T. dos Santos Correia, M. V. da Silva, 'Influence of

- Seasonal Variation on the Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from *Eugenia pohliana* DC Leaves', *Chem. Biodivers.* **2022**, *19*, DOI 10.1002/cbdv.202200034.
- [39] B. Mendez, J. Reyes, I. Conde, Z. Ramos, E. Lozada, A. M. Cruz, G. Asencio, A. Carvajal, S. Dharmawardhane, D. M. Piñero-Cruz, E. Hernández, P. Vivas, C. A. Ospina, 'Simalikalactone D, a Potential Anticancer Compound from *Simarouba tulae*, an Endemic Plant of Puerto Rico', *Plants* **2020**, *9*, 93.
- [40] S. Rajendran, J. Jeyamani, R. Radhakrishnan, 'GLAUCARUBINONE - A LEAD MOLECULE FROM SIMAROUBA GLAUCA AS A POTENTIAL DRUG CANDIDATE, AN IN SILICO STUDY', *INDIAN DRUGS* **2023**, *60*, 70–86.
- [41] J. Polonsky, Z. Varon, H. Jacquemin, G. R. Pettit, 'The isolation and structure of 13,18-dehydroglauucarubinone, a new antineoplastic quassinoid from *Simarouba amara*', *Experientia* **1978**, *34*, 1122–1123.
- [42] D. N. Mokhat, T. D. Kharat, 'Tree of heaven: *Ailanthus excelsa* roxb.-chemistry and pharmacology', *Phytochem. Pharmacol. Med. Plants* **2023**, *2*, 239–252.
- [43] A. Zamilpa, C. García-Alanís, M. E. López-Arellano, V. M. Hernández-Velázquez, M. G. Valladares-Cisneros, D. O. Salinas-Sánchez, P. Mendoza-de Gives, 'In vitro nematocidal effect of *Chenopodium ambrosioides* and *Castela tortuosa* n-hexane extracts against *Haemonchus contortus* (Nematoda) and their anthelmintic effect in gerbils', *J. Helminthol.* **2019**, *93*, 434–439.
- [44] J. Harindran, G. R. Rajalakshmi, 'In vitro anthelmintic activity of *Samadera indica*' **2011**, *4*, 1593–1595.
- [45] W. L. C. Ribeiro, W. P. P. Andre, G. S. Cavalcante, J. V. de Araújo-Filho, J. M. L. Santos, I. T. F. Macedo, J. V. de Melo, S. M. de Moraes, C. M. L. Bevilaqua, 'Effects of *Spigelia anthelmia* decoction on sheep gastrointestinal nematodes', *Small Rumin. Res.* **2017**, *153*, 146–152.
- [46] J. A. Cortes-Morales, A. Olmedo-Juárez, M. González-Cortazar, A. Zamilpa, M. A. López-Arellano, E. A. Ble-González, D. Tapia-Maruri, G. Flores-Franco, D. O. Salinas-Sánchez, 'In vitro ovicidal activity of *Brongniartia montalvoana* against small ruminant gastrointestinal nematodes', *Exp. Parasitol.* **2022**, *240*, DOI 10.1016/j.exppara.2022.108336.
- [47] J. A. Cortes-Morales, A. Olmedo-Juárez, G. Trejo-Tapia, M. González-Cortazar, B. E. Domínguez-Mendoza, P. Mendoza-de Gives, A. Zamilpa, 'In vitro ovicidal activity of *Baccharis conferta* Kunth against *Haemonchus contortus*', *Exp. Parasitol.* **2019**, *197*, 20–28.
- [48] M. J. Espino Ureña, A. Katchborian-Neto, A. Benítez Trinidad, M. Ramírez Ramírez, M. V. Tineo, J. V. de Araújo-Filho, W. L. Correia Ribeiro, D. de S. Collares Maia Castelo-Branco, L. M. Beserra de Oliveira, C. M. Leal Bevilaqua, D. A. Chagas-Paula, C. Viegas, M. J. Marques, 'Chemical composition, anthelmintic activity, and mechanism of action of *Lippia dominguensis* Mold. essential oil on *Haemonchus contortus*', *Chem. Biodivers.* **2023**, DOI 10.1002/cbdv.202300135.
- [49] L. Greiffer, E. Liebau, F. C. Herrmann, V. Spiegler, 'Condensed tannins act as anthelmintics by increasing the rigidity of the nematode cuticle', *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 18850.
- [50] C. Martínez-Ortiz-De-Montellano, J. F. D. J. Torres-Acosta, I. Fourquaux, C. A. Sandoval-Castro, H. Hoste, 'Ultrastructural study of adult *Haemonchus contortus* exposed to polyphenol-rich materials under in vivo conditions in goats', *Parasite* **2019**, *26*, DOI 10.1051/parasite/2019065.
- [51] Y. J. Yang, M. Y. Lin, S. Y. Feng, Q. Gu, Y. C. Chen, Y. D. Wang, D. feng Song, M. Gao, 'Chemical composition, antibacterial activity, and mechanism of action of essential oil from *Litsea cubeba* against foodborne bacteria', *J. Food Process. Preserv.* **2020**, *44*, 1–9.
- [52] M. J. Espino Ureña, A. Katchborian-Neto, A. B. Trinidad, M. Ramírez Ramírez, M. Vásquez Tineo, J. Vilemar de Araújo-Filho, W. L. C. Ribeiro, D. de Souza Collares Maia Castelo-Branco, L. M. B. de Oliveira, C. M. L. Bevilaqua, D. A. Chagas-Paula, C. Viegas, M. J. Marques, 'Chemical Composition, Anthelmintic Activity, and Mechanism of Action of *Lippia dominguensis* Mold. Essential Oil on *Haemonchus contortus*', *Chem. Biodivers.* **2023**, *20*, DOI 10.1002/cbdv.202300135.
- [53] M. T. Engström, M. Karonen, J. R. Ahern, N. Baert, B. Payré, H. Hoste, J.-P. Salminen, 'Chemical Structures of Plant Hydrolyzable Tannins Reveal Their in Vitro Activity against

- Egg Hatching and Motility of *Haemonchus contortus* Nematodes', *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 840–851.
- [54] J. J. Vargas-Magaña, J. F. J. Torres-Acosta, A. J. Aguilar-Caballero, C. A. Sandoval-Castro, H. Hoste, J. I. Chan-Pérez, 'Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds', *Vet. Parasitol.* **2014**, *206*, 322–327.
- [55] W. P. Rogers, F. Brooks, 'The Mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*', *Int. J. Parasitol.* **1977**, *7*, 61–65.
- [56] J. H. Niezen, G. C. Waghorn, T. Graham, J. L. Carter, D. M. Leathwick, 'The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture', *Vet. Parasitol.* **2002**, *105*, 269–283.
- [57] A. L. Molan, L. P. Meagher, P. A. Spencer, S. Sivakumaran, 'Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*', *Int. J. Parasitol.* **2003**, *33*, 1691–1698.
- [58] I. Watanabe, K. Koike, T. Satou, T. Nikaido, 'Nematocidal Activity of Quassinoids against a Species of Diplogastridae.', *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 723–726.
- [59] S. Brunet, C. M.-O. de Montellano, J. F. J. Torres-Acosta, C. A. Sandoval-Castro, A. J. Aguilar-Caballero, C. Capetillo-Leal, H. Hoste, 'Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats', *Vet. Parasitol.* **2008**, *157*, 81–88.
- [60] J. Moreno-Gonzalo, K. Osoro, U. García, P. Frutos, R. Celaya, L. M. M. Ferreira, L. M. Ortega-Mora, I. Ferre, 'Effect of the consumption of heather on incoming larvae and established population of *Teladorsagia circumcincta* in experimentally infected Cashmere goats', *Vet. Parasitol.* **2013**, *196*, 124–129.
- [61] D. Bahuaud, C. Martinez-Ortiz De Montellano, S. Chauveau, F. Prevot, F. Torres-Acosta, I. Fouraste, H. Hoste, 'Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes', *Parasitology* **2006**, *132*, 545–554.
- [62] E. von Son-de Fernex, M. Á. Alonso-Díaz, P. Mendoza-de Gives, B. Valles-de la Mora, M. González-Cortazar, A. Zamilpa, E. Castillo Gallegos, 'Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp.', *Vet. Parasitol.* **2015**, *214*, 89–95.
- [63] W. E. Zeller, 'Activity, Purification, and Analysis of Condensed Tannins: Current State of Affairs and Future Endeavors', *Crop Sci.* **2019**, *59*, 886–904.
- [64] J. Quijada, C. Fryganas, H. M. Ropiak, A. Ramsay, I. Mueller-Harvey, H. Hoste, 'Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins', *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 6346–6354.
- [65] L. M. B. de Oliveira, C. M. L. Bevilaqua, I. T. F. Macedo, S. M. de Morais, M. V. B. Monteiro, C. C. Campello, W. L. C. Ribeiro, E. K. F. Batista, 'Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*', *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* **2011**, *20*, 155–160.
- [66] I. T. F. Macedo, C. M. L. Bevilaqua, L. M. B. de Oliveira, A. L. F. Camurça-Vasconcelos, S. M. Morais, L. K. A. Machado, W. L. C. Ribeiro, 'In vitro activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae', *Vet. Parasitol.* **2012**, *190*, 504–509.
- [67] C. Klongsiriwet, J. Quijada, A. R. Williams, I. Mueller-Harvey, E. M. Williamson, H. Hoste, 'Synergistic inhibition of *haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins', *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2015**, *5*, 127–134.
- [68] L. M. B. Oliveira, C. M. L. Bevilaqua, I. T. F. MacEdo, S. M. De Morais, L. K. A. MacHado, C. C. Campello, M. De Aquino Mesquita, 'Effects of *Myracrodruon urundeuva* extracts on egg hatching and larval exsheathment of *Haemonchus contortus*', *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 893–898.





**Figure S1.** Young *Simarouba berteriana* plant cultivated in La Vega province, Dominican Republic.

**Table S1.** LC-MS analyses of the metabolites detected in the crude extracts and hydroalcoholic fractions of *Simarouba berteroana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections).

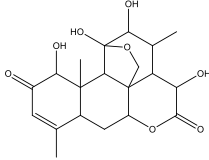
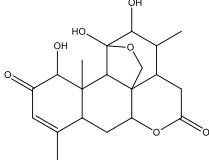
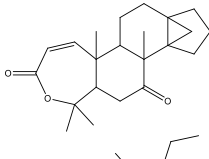
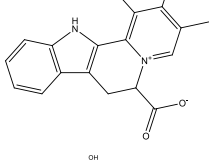
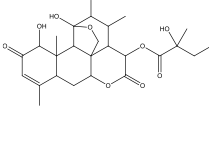
Tentative compound annotation	Final ID <sup>a</sup>	RT <sup>b</sup>	M+H <sup>c</sup>	Neutral m/z <sup>d</sup>	MF <sup>e</sup>	Natural product class	Isolated from Genus / Family / Specie	Peak area <sup>f</sup> (x10 <sup>5</sup> ) in each extract/fraction			
								Sb1	Sb1-halcFr	Sb2	Sb2-HalcFr
Glauucarubolone	4	9.7	395	394.1	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	Glycosylated quassinoids	Genus	0.00	0.00	0.497	3.915
Glauucarubol (15-Deoxy, 2-ketone)	3	10.8	379	378.1	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	Quassinoids	Family	173.0	6.97	197.0	326.0
Simaroubin E	2	10.8	343	342.1	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	Terpenoid quinones	Genus	0.00	0.00	0.569	6.61
Javacarboline	1	12.9	321	320.0	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carboline alkaloids	Family	3.5	0.00	0.00	0.00
Glauucarubinone or Glauucarubol-2-ketone (2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	18	14.1	495	494.2	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>10</sub>	Quassinoids	Family	3.31	17.2	2.9	16.8
Ailanquassin A-Dihydroxy	5	21.3	397	396.2	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	Quassinoids	Family	53.2	0.00	5.01	0.00
Amarolide-2-Glucopyranoside	23	21.3	527	526.4	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>	Glycosylated quassinoids	Family	0.00	0.00	36.6	0.00
Ailanthus quassinoid 1	12	24.1	445	444.2	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	Quassinoids	Family	0.00	0.00	37.0	0.00
Glauucarubol or 2-Ketone-glucopyranoside	25	26.8	557	556.4	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>13</sub>	Glycosylated quassinoids	Genus	0.00	0.00	12.8	0.00
Glauucarubol 15-Glucopyranoside	29	28.1	559	558.4	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	Glycosylated quassinoids	Genus	2.1	0.00	4.23	0.00
24,25-epoxy-6,23-dihydroxytirucall-8-en-3-one	15	28.6	473	472.3	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Phytosterol lipids	Genus	3.42	0.00	0.00	0.00
Tirucalla-7,24-dien-3-one (stigmasta-7,22-dien-3)	9	32.1	425	424.2	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	Phytosterol lipids	Genus	39.7	82.6	61.9	19.7
Ailanquassin A-Dihydroxy	6	32.1	397	396.3	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	Quassinoids	Family	23.6	0.00	0.00	0.00
3-Hydroxytirucalla-7,24-dien-26-oic acid-3-Ketone	13	32.6	455	454.3	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	Phytosterol lipids	Genus	0.00	0.00	6.01	0.0
Glauucarubol or 15-(2-Acetoxy-2-methylbutanoyl)	24	32.7	539	538.4	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>	Quassinoids	Genus	13.1	0.00	17.0	0.00
21,23,24,25-Diepoxytirucall-7-ene-3,21-diol-3-ketone	14	33.4	471	470.3	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	Phytosterol lipids	Genus	13.2	0.00	4.13	0.00
3-Oxotirucalla-7,24-dien-21-al	11	33.7	439	438.3	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	Phytosterol lipids	Genus	0.00	0.00	10.1	0.00
Glauucarubol 15-glucopyranoside	28	33.8	559	558.4	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	Glycosylated quassinoids	Genus	61.9	0.00	239.0	0.00

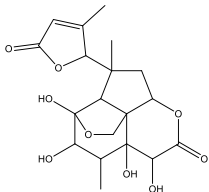
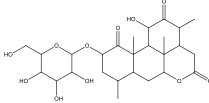
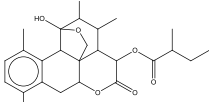
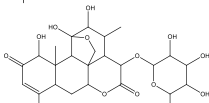
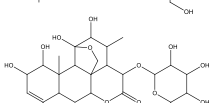
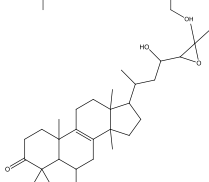
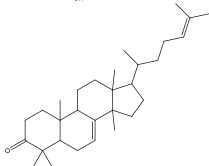


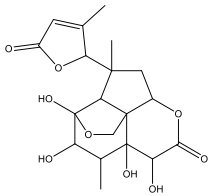
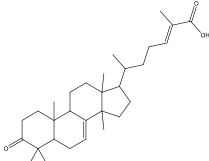
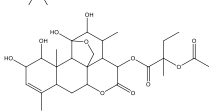
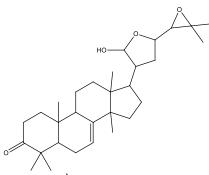
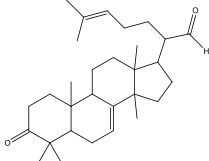
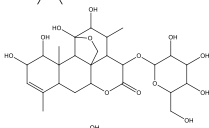
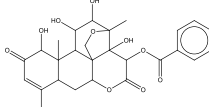
Brucein E or 2-Ketone, 15-benzoyl	21	34.1	515	514.4	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	Family	0.00	0.00	32.3	0.00
Javanicin D	33	34.6	617	616.5	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>12</sub>	Naphthoquinones	Family	10.1	0.00	130.0	0.00
Simaroubin B	34	35.3	637	636.4	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	Terpenoid quinones	Genus	50.5	657.0	38.6	31.6
Glaucarubol or 2-Ketone-glucopyranoside	26	35.5	557	556.4	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>13</sub>	Glycosylated quassinoids	Genus	21.6	0.00	14.3	0.00
Glaucarubol-Benzoyloxy-15-deoxy-2-glucopyranoside	35	36.1	662	661.5	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>14</sub>	Glycosylated quassinoids	Family	16.9	0.00	0.00	0.00
5-Hydroxycanthin-6-one-glucopyranosyl-glucopyranoside	30	36.8	561	560.5	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	Glycosylated canthin-6-one alkaloids	Family	2.84	0.00	11.0	0.00
Brucein E or 2-Ketone, 15-benzoyl	22	37.2	515	514.4	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	Family	59.4	0.00	15.8	0.00
Glaucarubol-13,18-didehydro-2-ketone-(2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	17	38.2	493	492.4	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	Quassinoids	Genus	105.0	0.00	19.4	0.00
Brucein K or Brucein E	7	40.5	413	412.3	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	Family	26.5	3.32	0.00	0.00
Brucein K or Brucein E	8	41	413	412.6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	Family	2.31	11.7	59.8	2.25
Brucein E or 2-Ketone, 15-benzoyl	20	41.9	515	513.6	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	Family	51.6	0.00	121.0	18.5
5,9-Dihydroxycanthin-6-one-glucopyranoside	10	41.9	429	428.2	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Glycosylated canthin-6-one alkaloids	Specie	15.9	0.00	2.83	0.00
Glaucarubol; 2-ketone-glucopyranoside	27	42.3	557	556.5	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>13</sub>	Glycosylated quassinoids	Genus	2.65	7.64	36.6	3.35
Simaroubin A	16	42.8	482	480.6	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	Terpenoid quinones	Genus	5.64	0.00	0.00	0.00
Bruceanol G	32	44.3	608	607.5	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>13</sub>	Quassinoids	Family	6.3	0.00	0.00	0.00
Glaucarubinone or Glaucarubol-2-Ketone (2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	19	44.8	496	494.8	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	Quassinoids	Genus	0.00	0.00	2.97	5.71
5-Hydroxycanthin-6-one-glucopyranosyl-glucopyranoside	31	46.6	562	560.6	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	Glycosylated canthin-6-one alkaloids	Family	0.00	0.000	14.8	0.00

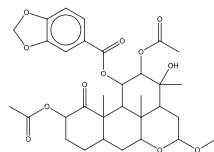
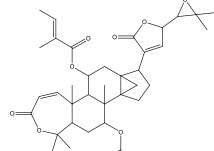
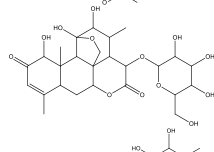
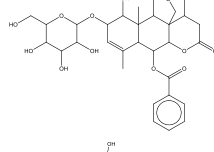
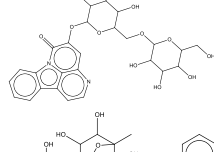
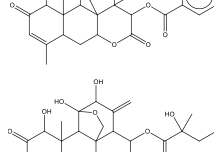
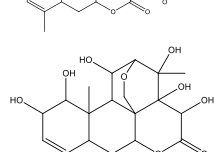

<sup>a</sup>ID: annotations by dnp.chemnetbase.com (2024); <sup>b</sup>RT: retention Time; <sup>c</sup>M+H: mass of the ionized protonated molecule; <sup>d</sup>Molecular weight, <sup>e</sup>MF: molecular formula. <sup>f</sup>Peak intensity: peak area of  $m/z$  at its respective retention time. Sb1 and Sb1HalcFr: crude extract and the hydroalcoholic fraction of *S. berteriana* (1<sup>st</sup> collection), respectively, Sb2 and Sb2-HalcFr: crude extract and the hydroalcoholic fraction of *S. berteriana* (2<sup>nd</sup> collection), respectively.

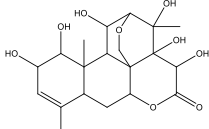
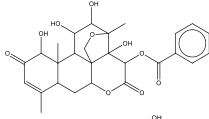
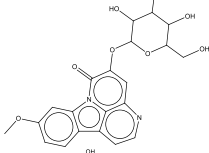
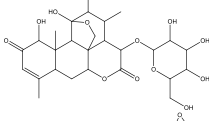
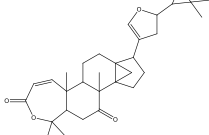
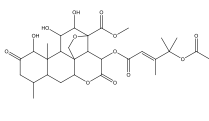
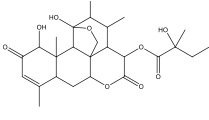
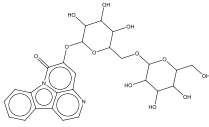
**Table S2.** Molecular structure and biological sources of metabolites detected in the LC-MS analyses of the crude extracts and hydroalcoholic fractions of *Simarouba berteriana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections).

Tentative compound annotation	Final ID <sup>a</sup>	Natural product class	SMILES	MF <sup>b</sup>	Molecular structure	Isolated from Genus / Family / Specie	Biological Source
Glaucarubolone	4	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1C2C(C(=O)OC3C24COC(C1O)(C4C5(C(C3)C(=CC(=O)C5O)C)C)O)O</chem>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>		Genus	<i>Quassia simarouba</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol-15-deoxy, 2-ketone	3	Quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C2C2(C)C(O)C(=O)C=C(C)C2CC3OC(=O)CC14</chem>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>		Family	Isol. from <i>Hannoa klaineana</i> , <i>Ailanthus integrifolia</i> , <i>Simaba multiflora</i> , <i>Soulamea tomentosa</i> , <i>Castela tortuosa</i> , <i>Simaba cedron</i> , <i>Ailanthus altissima</i> and others (Simaroubaceae)
Simaroubin E	2	Terpenoid quinones	<chem>CC12C=CC(=O)OC(C)(C)C1CC(=O)C1(C)C2CCC23CC12CCC3</chem>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> (Simaroubaceae)
Javacarboline	1	Carboline alkaloids	<chem>CCc1c(C)c[n+]2C(Cc3c([nH]c4cccc34)-c2c1C)([O-])=O</chem>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Family	Alkaloid from the stem of <i>Picrasma javanica</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubinone or Glaucarubol-2-ketone (2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	18	Quassinoids	<chem>CCC(C)(O)C(=O)OC1C2C(C)C(O)C3(O)OCC22C3C3(C)C(O)C(=O)C=C(C)C3CC2OC1=O</chem>	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>10</sub>		Family	<i>Simarouba glauca</i> (Simaroubaceae)

Ailanthus quassinoid A-dihydroxy	5	Quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C(CC(C)C)C5OC(=O)C=C5C)C23)OC(=O)C(O)C14O</chem>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>		Family	Constit. of <i>Eurycoma longifolia</i>
Amarolide-2-glucopyranoside	23	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1CC(OC2OC(CO)C(O)C(O)C2O)C(=O)C2(C)C1CC1OC(=O)CC3C(C)C(=O)C(O)C2C13C</chem>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>		Family	Constit. of <i>Ailanthus altissima</i> (Simaroubaceae)
Ailanthus quassinoid 1	12	Quassinoids	<chem>CCC(C)C(=O)OC1C2C(C)C(O)C3(O)OCC22C3e3c(C)ccc(C)c3CC2OC1=O</chem>	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>		Family	Constit. of <i>Ailanthus excelsa</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol or 2-ketone-glucopyranoside	25	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C2C2(C)C(O)C(=O)C=C(C)C2CC3OC(=O)C(OC2OC(CO)C(O)C(O)C2O)C14</chem>	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>13</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba glauca</i> and <i>Castela marcophylla</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol 15-Glucopyranoside	29	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C2C2(C)C(O)C(O)C=C(C)C2CC3OC(=O)C(OC2OC(CO)C(O)C(O)C2O)C14</chem>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba glauca</i> (Simaroubaceae)
24,25-Epoxy-6,23-dihydroxytirucall-8-en-3-one	15	Phytosterol lipids	<chem>CC(CC(O)C1OC1(C)C)C1CC(C2(C)C3=C(CCC12C)C1(C)C)CC(=O)C(C)(C)C1C(O)C3</chem>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> (Simaroubaceae)
Tirucalla-7,24-dien-3-one (stigmasta-7,22-dien-3)	9	Phytosterol lipids	<chem>CC(CCC=C(C)C)C1CCC2(C1)CCC3C2=CCC4C3(CCC(=O)C4(C)C)C)C)C</chem>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> and <i>Vismia laurentii</i> (Simaroubaceae)

Ailanquassin A-dihydroxy	6	Quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C(CC(C)C5OC(=O)C=C5C)C23)OC(=O)C(O)C14O</chem>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>		Family	Constit. of <i>Eurycoma longifolia</i>
3-Hydroxytirucalla-7,24-dien-26-oic acid-3-ketone	13	Phytosterol lipids	<chem>CC(CC\C=C(/C)C(O)=O)C1C CC2(C)C3=CCC4C(C)(C)C(=O)CCC4(C)C3CCC12C</chem>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> and <i>Dysoxylum pettigrewianum</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol or 15-(2-acetoxy-2-methylbutanoyl)	24	Quassinoids	<chem>CCC(C)(OC(C)=O)C(=O)OC1C2C(C)C(O)C3(O)OCC22C3C3(C)C(O)C(O)C=C(C)C3CC2OC1=O</chem>	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> , <i>Pierreodendron kerstingii</i> , <i>Odyendea gabonensis</i> and <i>Perriera</i> sp. (Simaroubaceae)
21,23,24,25-Diepoxytirucall-7-ene-3,21-diol-3-ketone	14	Phytosterol lipids	<chem>CC1(C)OC1C1CC(C(O)O)1C1CCC2(C)C3=CCC4C(C)(C)C(=O)CCC4(C)C3CCC12C</chem>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>		Genus	Constit. of <i>Melia azedarach</i> , <i>Simarouba amara</i> , <i>Neochamaelea pulverata</i> and <i>Eurycoma longifolia</i> (Simaroubaceae)
3-Oxotirucalla-7,24-dien-21-al	11	Phytosterol lipids	<chem>C/C(C)=C\CCC(C([H])=O)C1CCC2(C)C1(C)CCC3C2=CC4C3(C)CCC(C4(C)C)=O</chem>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> and <i>Owenia cepiodora</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol 15-glucopyranoside	28	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C2C2(C)C(O)C(O)C=C(C)C2CC3OC(=O)C(OC2OC(CO)C(O)C(O)C2O)C14</chem>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba glauca</i> (Simaroubaceae)
Brucein E or 2-Ketone, 15-benzoyl	21	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	<chem>CC1=CC(=O)C(O)C2(C)C1C1OC(=O)C(OC(=O)c3ccccc3)C3(O)C4(C)OCC13C2C(O)C4O</chem>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>		Family	Constit. of <i>Soulamea amara</i>

Javanicin D	33	Naphthoquinones	<chem>COC1CC2C(C)(O)C(OC(C)=O)C(OC(=O)c3ccc4OCOc4c3)C3C2(C)C(CC2CCC(OC(C)=O)C(=O)C32C)O1</chem>	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>12</sub>		Family	Constit. of <i>Picrasma javanica</i> (Simaroubaceae)
Simaroubin B	34	Terpenoid quinones	<chem>C\C=C(/C)C(=O)OC1CC23C C2(CCC3C2=CC(OC2=O)C2 OC2(C)C)C2(C)C(CC3C(C)C=CC(=O)OC3(C)C)C12)OC(C)=O</chem>	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol or 2-Ketone-glucopyranoside	26	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C2C2(C)C(O)C(=O)C=C(C)C2CC3 OC(=O)C(OC2OC(CO)C(O)C(O)C2O)C14</chem>	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>13</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba glauca</i> and <i>Castela marcophylla</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol (Benzoyloxy-15-deoxy-2-glucopyranoside)	35	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C2C2(C)C(O)C(OC5OC(CO)C(O)C(O)C5O)C=C(C)C2C(OC(=O)c2ccccc2)C3OC(=O)CC14</chem>	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>14</sub>		Family	Constit. of <i>Ailanthus altissima</i> (Simaroubaceae)
5-Hydroxycanthin-6-one-glucopyranosyl-glucopyranoside	30	Glycosylated canthin-6-one alkaloids	<chem>OCC1OC(OCC2OC(Oc3cc4nccc5c6cccc6n(c45)c3=O)C(O)C(O)C2O)C(O)C(O)C1O</chem>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>		Family	Alkaloid from stems of <i>Brucea javanica</i> and root wood of <i>Brucea mollis</i> var. <i>tonkinensis</i> (Simaroubaceae)
Brucein E (2-Ketone, 15-benzoyl)	22	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	<chem>CC1=CC(=O)C(O)C2(C)C1C C1OC(=O)C(OC(=O)c3ccccc3)C3(O)C4(C)OCC13C2C(O)C4O</chem>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>		Family	Constit. of <i>Soulamea amara</i>
Glaucarubol-13,18-didehydro-2-ketone-(2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	17	Quassinoids	<chem>CCC(C)(O)C(=O)OC1C2C(=C)C(O)C3(O)OCC22C3C3(C)C(O)C(=O)C=C(C)C3CC2OC1=O</chem>	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> (Simaroubaceae)
Brucein K or Brucein E	7	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	<chem>CC1=CC(O)C(O)C2(C)C1CC 1OC(=O)C(O)C3(O)C(C)(O)C4OCC13C2C4O</chem>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>		Family	Constit. of <i>Brucea javanica</i> (Simaroubaceae)

Brucein K or Brucein E	8	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	<chem>CC1=CC(O)C(O)C2(C)C1CC1OC(=O)C(O)C3(O)C(C)(O)C4OCC13C2C4O</chem>	$C_{20}H_{28}O_9$		Family	Constit. of <i>Brucea javanica</i> (Simaroubaceae)
Brucein E or 2-Ketone, 15-benzoyl	20	Quinolone quassinoids (terpenoid quinones)	<chem>CC1=CC(=O)C(O)C2(C)C1C C1OC(=O)C(OC(=O)c3ccccc3)C3(O)C4(C)OCC13C2C(O)C4O</chem>	$C_{27}H_{30}O_{10}$		Family	Constit. of <i>Soulamea amara</i>
5,9-Dihydroxycanthin-6-one-glucopyranoside	10	Glycosylated canthin-6-one alkaloids	<chem>COc1ccc2c3cnc4cc(OC5OC(CO)C(O)C(O)C5O)c(=O)n(c2c1)c34</chem>	$C_{21}H_{20}N_2O_8$		Specie	Alkaloid from the stem bark of <i>Simarouba berteriana</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubol or 2-Ketone-glucopyranoside	27	Glycosylated quassinoids	<chem>CC1C(O)C2(O)OCC34C2C2(C)C(O)C(=O)C=C(C)C2CC3OC(=O)C(OC2OC(CO)C(O)C(O)C2O)C14</chem>	$C_{26}H_{36}O_{13}$		Genus	Constit. of <i>Simarouba glauca</i> and <i>Castela marcophylla</i> (Simaroubaceae)
Simaroubin A	16	Terpenoid quinones	<chem>CC1(C)OC1C1CC(=CO1)C1C CC23CC12CCC1C2(C)C=CC(=O)OC(C)(C)C2CC(=O)C31C</chem>	$C_{30}H_{40}O_5$		Genus	Constit. of <i>Simarouba amara</i> (Simaroubaceae)
Bruceanol G	32	Quassinoids	<chem>COC(=O)C12OCC34C1C(OC(=O)C=C(C)C(C)(C)OC(C)=O)C(=O)OC3CC1C(C)CC(=O)C(O)C1(C)C4C(O)C2O</chem>	$C_{30}H_{40}O_{13}$		Family	Constit. of <i>Brucea antidysenterica</i> (Simaroubaceae)
Glaucarubinone or Glaucarubol-2-ketone (2-hydroxy-2-methylbutanoyl)	19	Quassinoids	<chem>CCC(C)(O)C(=O)OC1C2C(C)C(O)C3(O)OCC22C3C3(C)C(O)C(=O)C=C(C)C3CC2OC1=O</chem>	$C_{25}H_{34}O_{10}$		Genus	<i>Simarouba glauca</i> (Simaroubaceae)
5-Hydroxycanthin-6-one-glucopyranosyl-glucopyranoside	31	Glycosylated canthin-6-one alkaloids	<chem>OCC1OC(OCC2OC(Oc3cc4nccc5c6cccc6n(c45)c3=O)C(O)C(O)C2O)C(O)C(O)C1O</chem>	$C_{26}H_{28}N_2O_{12}$		Family	Alkaloid from stems of <i>Brucea javanica</i> and root wood of <i>Brucea mollis</i> var. <i>tonkinensis</i> (Simaroubaceae)

<sup>a</sup>ID: annotations by dnp.chemnetbase.com (2024); <sup>b</sup>Molecular weight, <sup>c</sup>MF: molecular formula.

**Table S3.** Percentage (mean and standard deviation) of eggs and hatched larvae of *Haemonchus contortus* Kokstad exposed to extracts and fractions of *Simarouba berteroana* (1<sup>st</sup> & 2<sup>nd</sup> collections) exhibiting morphological alterations.

Extract/ Fraction	Sb1							Sb2						
	# Eggs	%ME	%LFE	# L <sub>1</sub>	%L <sub>1</sub> Alt-1	%L <sub>1</sub> Alt-2	%L <sub>1</sub> Alt-3	# Eggs	%ME	%LFE	# L <sub>1</sub>	%L <sub>1</sub> Alt-1	%L <sub>1</sub> Alt-2	%L <sub>1</sub> Alt-3
Crude extract														
(Sb1, mg/mL)														
3	101 (9.23)	30.50 (4.78)	69.5 (4.78)	0.17 (0.41)	0.0	-	-	101 (9.23)	30.5 (4.78)	69.5 (4.78)	0.167 (0.41)	0.0	-	-
2.5	102.5 (25.45)	26.48 (5.18)	73.52 (5.18)	0.94 (1.06)	0.0	0.0	0.0	117.29 (14.97)	15.15 (2.89)	84.85 (2.89)	3.29 (2.14)	0.0	0.0	0.0
2	77.93 (15.5)	30.64 (8.0)	69.36 (8.0)	37.33 (19.12)	4.89 (4.42)	0.6 (1.6)	0.80 (2.13)	56.85 (16.28)	32.71 (6.4)	67.29 (6.4)	91 (30.5)	9.03 (6.28)	0.33 (1.46)	0.0
1.5	40.65 (12.75)	40.15 (7.3)	59.85 (7.3)	84.41 (12.65)	21.58 (7.46)	0.58 (1.29)	0.18 (0.53)	35.06 (16.48)	44.25 (8.12)	55.75 (8.12)	122.28 (16.55)	34.25 (16.41)	0.46 (1.12)	0.0
1	26 (5.9)	51.28 (8.61)	48.72 (8.61)	79.27 (12.04)	38.03 (8.63)	-	-	27.21 (7.16)	44.03 (8.65)	55.97 (8.65)	131.93 (11.27)	38.62 (18.96)	0.0	0.0
0.5	18.89 (9.57)	91.74 (7.56)	8.26 (7.56)	105 (15.95)	14.96 (6.71)	0.0	0.54 (1.03)	13.21 (3.04)	89.07 (8.27)	10.93 (8.27)	147.14 (18.51)	12.5 (8.38)	0.0	0.28 (0.74)
0.25	15 (5.53)	95.76 (3.64)	4.24 (3.64)	118.09 (15.07)	0.52 (0.5)	0.0	0.31 (0.66)	9.86 (3.0)	87.95 (7.91)	12.05 (7.91)	152.86 (18.84)	0.69 (0.64)	0.0	0.0
HexFr (mg/mL)														
16	6.25 (4.03)	100.0	0.0	47.25 (10.63)	0.0	0.0	4.58 (9.17)	4 (1.83)	100.0	0.0	33.25 (14.55)	0.0	0.0	5.83 (11.67)
8	8.5 (3.11)	95.45 (9.09)	4.54 (9.09)	117.75	0.0	0.0	3.1 (6.19)	13.14 (3.09)	82.36 (19.21)	17.64 (3.03)	72.86 (11.03)	0.0	1.75 (2.93)	0.0
4	2.25 (0.83)	100.0	0.0	129.5 (7.37)	0.0	0.0	0.0	13.1 (9.0)	86.17 (14.65)	13.83 (14.65)	100.7 (19.41)	0.15 (0.48)	1.25 (2.18)	0.19 (0.4)
2	5.88 (4.67)	99.17 (2.36)	0.83 (2.36)	94.75 (26.14)	0.0	0.0	0.0	13.4 (7.59)	85.45 (7.45)	14.55 (7.45)	113.3 (31.19)	0.0	0.77 (1.71)	0.0
1	6.57 (4.35)	98.41 (4.2)	1.59 (4.2)	97.43 (21.44)	0.0	0.0	0.28 (0.48)	9.09 (6.35)	97.04 (6.11)	2.96 (6.11)	105.45 (39.84)	0.0	0.0	0.0
0.5	2.25 (0.43)	100.0	0.0	127 (10.93)	0.0	0.0	0.0	15.63 (6.0)	93.45 (6.85)	6.55 (6.85)	156.13 (30.06)	0.17 (0.32)	0.0	0.0
EtAcFr (mg/mL)														

3	185.86 (8.98)	15.9 (2.69)	84.1 (2.69)	185.86 (19.68)	0.0	0.0	0.0	107 (6.96)	23.54 (6.36)	76.46 (6.36)	0.0	0.0	0.0	0.0
2.5	120.71 (56.37)	18.19 (6.64)	81.81 (6.64)	34.86 (35.25)	0.89 (1.82)	0.21 (0.72)	0.83 (2.89)	-	-	-	-	-	-	-
2	134.42 (16.68)	12.66 (1.52)	87.34 (1.52)	63.33 (32.24)	2.34 (5.12)	1.06 (1.32)	0.0	170.63 (33.7)	10.25 (2.85)	89.75 (2.85)	7 (13.22)	0.0	0.0	4.99 (11.56)
1.5	72.57 (5.77)	17.13 (4.08)	82.87 (4.08)	132.71 (84.0)	13.12 (3.19)	5.8 (1.91)	0.87 (1.46)	65.91 (20.35)	30.51 (6.11)	69.49 (6.11)	131.91 (35.9)	8.51 (4.62)	7.72 (6.4)	1.5 (2.75)
1	56.09 (8.65)	28.9 (5.09)	71.1 (5.09)	146.18 (34.61)	34.02 (7.66)	6.61 (3.22)	0.79 (2.04)	57 (14.05)	27.64 (4.38)	72.36 (4.38)	144.83 (28.67)	15.4 (5.59)	12.69 (3.08)	1.74 (2.05)
0.5	18.33 (5.21)	78.72 (7.16)	21.28 (7.16)	197.67 (24.51)	22.1 (6.17)	1.02 (1.16)	0.15 (0.4)	20.33 (5.91)	64.01 (9.8)	35.99 (9.8)	195.08 (24.21)	22.3 (6.1)	6.75 (3.52)	0.82 (0.86)
0.25	12.45 (4.91)	95.48 (4.78)	4.52 (4.78)	215.91 (16.38)	4.81 (2.62)	0.15 (0.35)	0.16 (0.35)	14.08 (4.72)	94.79 (6.38)	5.21 (6.38)	204.25 (47.32)	4.96 (3.93)	1.0 (1.19)	2.59 (3.06)
isobFr (mg/mL)														
3	153.92 (30.78)	33.56 (4.34)	66.44 (4.34)	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
2.5	153.58 (35.6)	29.27 (3.98)	70.73 (3.98)	17.08 (16.86)	1.91 (3.07)	0.0	0.0	156.15 (51.46)	44.97 (7.42)	55.03 (7.42)	0.0	0.0	0.0	0.0
2	127.69 (34.19)	28.47 (4.89)	71.53 (4.89)	51.81 (24.18)	5.53 (4.02)	2.74 (4.02)	1.78 (2.31)	167.65 (38.21)	38.24 (4.58)	61.76 (4.58)	2.41 (5.39)	0.0	0.57 (1.6)	0.0
1.5	77.88 (17.8)	30.29 (5.28)	69.71 (5.28)	104.53 (32.05)	30.86 (11.62)	8.65 (4.14)	0.74 (2.09)	97.71 (21.37)	33.13 (5.29)	66.87 (5.29)	77.35 (27.71)	14.42 (8.73)	1.94 (2.21)	15.71 (19.35)
1	67 (10.73)	35.85 (6.49)	64.05 (6.49)	126 (12.25)	55.87 (6.91)	3.1 (2.21)	0.72 (1.97)	59.27 (9.03)	38.14 (4.93)	61.86 (4.93)	119.09 (12.19)	50.40 (18.06)	2.95 (2.3)	1.64 (3.47)
0.5	24.43 (6.62)	75.3 (5.26)	24.72 (5.26)	162.5 (28.38)	31.57 (13.46)	1.08 (0.86)	1.14 (2.03)	21.33 (2.16)	88.68 (5.41)	11.32 (5.41)	162.33 (21.49)	30.59 (15.22)	0.92 (0.46)	1.42 (2.05)
0.25	17.55 (4.34)	97.17 (4.62)	2.83 (4.62)	176.27 (17.32)	3.52 (1.97)	0.32 (0.55)	2.18 (2.78)	17.67 (4.03)	96.97 (7.42)	3.03 (7.42)	151.5 (30.79)	2.06 (1.61)	0.0	0.96 (1.02)
HalcFr mg/mL														
3	-	-	-	-	-	-	-	100.81 (21.61)	39.98 (9.54)	60.02 (9.54)	33.19 (33.8)	0.78 (1.44)	10.56 (17.48)	0.0
2.5	-	-	-	-	-	-	-	99.06 (36.35)	41.71 (6.97)	58.29 (6.97)	63.44 (47.51)	5.38 (12.58)	9.19 (13.43)	0.05 (0.21)



2	103 (7.95)	24.56 (1.9)	75.44 (1.9)	0.0	0.0	0.0	0.0	66.5 (31.48)	49.12 (8.14)	50.88 (8.14)	94.55 (36.49)	5.95 (3.25)	4.19 (3.88)	1.58 (4.29)
1.5	112.78 (17.62)	23.05 (5.56)	76.95 (5.56)	1.89 (3.02)	0.0	0.0	0.0	32.47 (16.64)	46.57 (8.01)	53.43 (80.1)	141.37 (19.37)	21.32 (11.51)	5.47 (6.01)	0.37 (0.93)
1	59.4 (27.7)	42.04 (8.39)	57.96 (8.39)	73.1 (20.77)	13.1 (9.6)	2.61 (3.89)	0.31 (0.66)	22.73 (10.69)	76.3 (6.17)	23.7 (6.17)	128.5 (24.5)	23.77 (12.11)	1.27 (2.67)	0.97 (1.65)
0.75	24 (3.32)	66.99 (9.43)	33.01 (9.43)	90.83 (9.3)	53.53 (3.51)	0.0	0.0	14 (6.89)	-	-	-	-	-	-
0.5	23.5 (3.29)	74.16 (4.62)	25.84 (4.62)	109.58 (14.36)	50.8 (6.18)	0.07 (0.24)	0.64 (1.5)		92.99 (6.93)	7.01 (6.93)	155.63 (15.58)	3.46 (3.54)	0.04 (0.16)	0.81 (3.24)
0.25	15.78 (7.14)	93.81 (5.61)	6.19 (5.61)	114.89 (29.55)	4.09 (4.06)	0.08 (0.23)	1.0 (1.71)	12.23 (4.57)	97.16 (5.88)	2.84 (5.88)	157.31 (8.2)	0.59 (0.96)	0.0	0.25 (0.73)
0.125	16.4 (3.78)	98.18 (4.07)	1.81 (4.07)	132.2 (16.71)	0.13 (0.29)	0.0	0.48 (1.08)	-	-	-	-	-	-	-
NC DMSO														
0.5%	2.75 (2.99)	95.83 (12.39)	4.17 (12.39)	151.07 (29.49)	0.0	0.0	0.39 (1.68)							
Thiabendazole														
0.1 mg/mL	99.54 (61.48)	99.82 (0.8)	0.18 (0.8)	4.26	0.0	0.0	0.0							

# Eggs: total number of eggs counted; %ME: percentage of morulated eggs; %LFE: percentage of eggs with L<sub>1</sub> formed; #L<sub>1</sub>: total 1<sup>st</sup>-stage larvae of *H. contortus* counted; %L<sub>1</sub>Alt-1: percentage hatched L<sub>1</sub> eviscerated or with disrupted cuticle and tissue release; %L<sub>1</sub>Alt-2: percentage hatched L<sub>1</sub> with detachment of cuticle from the internal subjacent tissue; %L<sub>1</sub>Alt-3: percentage of L<sub>1</sub> with adhesions of extract material to the cuticle in the cuticle with external alterations. NC: negative control with distilled water and 0.5% Dimethylsulfoxide (DMSO).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste projeto demonstram a atividade biológica sobre ovos, larvas e nematoides adultos parasitos de derivados vegetais de plantas endêmicas da Hispaniola que não haviam sido avaliadas previamente. Todos os extratos brutos das plantas avaliadas (*Croton coronatus*, *C. poitaie*, *L. dominguensis*, *S. berteroana*, *P. haitiensis*, *P. racemosa* var. *ozua*) foram submetidos ao teste de inibição da eclosão de ovos (TEO), sendo o teste básico para selecionar as plantas mais promissoras para continuar com os outros testes de atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* e de toxicidade. Desta forma, os extratos brutos das plantas *C. coronatus*, *C. poitaie* e *L. dominguensis*, apresentaram baixa atividade *in vitro* ovicida no TEO e, conseqüentemente, foram excluídos das avaliações seguintes. Os extratos e frações das plantas *P. racemosa* var. *ozua* e *S. berteroana* possuem fenólicos, taninos e flavonoides, sendo quantificados pela primeira vez nestas espécies. Os maiores teores destes metabólicos foram encontrados nos derivados vegetais da *S. berteroana*, com destaque nas frações isobutanol e acetato de etilo.

O efeito *in vitro* observado sobre os ovos e as larvas de *H. contortus*, dos extratos e frações de Ozua e *S. berteroana* podem ser atribuídos a efeitos de compostos fenólicos presentes, porém, não exclusivamente. Isto pode ser considerado a partir da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas que mostrou que os extratos da *S. berteroana* possuem quassinoides, alcaloides, quinonas terpenoides, lípidos de fitosteróis e a naftoquinona javanicina D, vários dos quais já possuem atividade anti-helmíntica comprovada. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas dos óleos essenciais mostrou que os compostos majoritários do óleo essencial da *L. dominguensis* da 1ª coleta (OELD1) foram: linalol (33,85%) e 1,8-cineol (30,88%), do óleo essencial da Ozua 1ª coleta (OEPo1): 1,8-cineol (93,7%), e do óleo essencial da *P. haitiensis* (OEPH): estragol (66,32%) e mentatrieno <1,3,8- $\rho$ -> (17,66%), sendo monoterpenos e sesquiterpenos já identificados em óleos essenciais de outras espécies da Myrtaceae e Verbenaceae.

Os óleos essenciais apresentaram atividade de inibição de eclosão de ovos de *H. contortus* Kokstad mais potente do que os extratos e frações (IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> menores), o que os coloca como derivados vegetais mais promissores diante dos extratos, sendo os óleos essenciais de *P. haitiensis* e de *L. dominguensis* da 2ª coleta os mais ativos (IC<sub>50</sub> = 0,294 mg/mL e 0,313 mg/mL, respectivamente). A fração hexânica de *P. racemosa* var. *ozua* da 2ª coleta foi mais ativa de todas as frações de todas as plantas em inibir a eclosão de ovos (IC<sub>50</sub> = 0,626 mg/mL), sendo inclusive mais potente do que alguns óleos essenciais. No teste de inibição *in vitro* da

motilidade de nematoides adultos, tanto o OELd1, quanto o OEPO1 inibiram a motilidade (> 95%) com 3 horas de exposição a 1 mg/mL.

Da mesma forma, os extratos e frações da Ozua e de *S. berteriana* inibiram o desembainhamento de larvas de 3º estágio de *H. contortus* a 0,3 mg/mL em 60 minutos, a exceção das frações de hexano que não mostraram este efeito.

Foi avaliada a toxicidade oral aguda em camundongos dos derivados vegetais mais promissores nos testes de inibição *in vitro* da eclosão de ovos. Desta forma, foi determinado que toxicidade oral aguda dos óleos essenciais de *L. domingensis* é baixa, sendo o óleo essencial da primeira coleta levemente menos tóxico do que a segunda. Além disso, considerou-se que estes óleos essenciais, assim como os óleos essenciais da Ozua e de *P. haitiensis*, e os extratos brutos (2ª coleta) da Ozua e de *S. berteriana* são substâncias de categoria 3 ou de toxicidade moderada, segundo a escala de Schuartsman (1980), por possuírem DL<sub>50</sub> em camundongos acima de 1.100 mg/kg.

No teste de avaliação de atividade anti-helmíntica *in vivo* com caprinos foi observado que o Sb2 teve uma alta eficácia, reduzindo significativamente a carga parasitaria, sendo estas de 61,4% e 71% nas concentrações de 100 e 350 mg/kg, mostrando assim um efeito dependente da concentração. Estes resultados mostraram o grande potencial dos derivados da *S. berteriana* para o controle de NGI em pequenos ruminantes. No entanto, é importante destacar que a fração de hexano da Ozua coletada em julho de 2021 apresentou um grande potencial anti-helmíntico por seu efeito ovicida *in vitro* semelhante ao dos óleos essenciais; portanto, merece ser estudado mais a fundo com testes de eficácia anti-helmíntica *in vivo*, incluindo os devidos testes de toxicidade.

De forma geral, estes resultados mostraram que houve variação em maior ou menor grau da atividade biológica e do perfil químico dos derivados vegetais estudados, em relação às duas coletas realizadas, nas quais foram observados diferentes estados fenológicos das plantas em relação à floração e presença de frutos. Portanto, sugere-se continuar avaliando (em outros projetos) qual época e estado fenológico proporciona um perfil de metabolitos mais adequado para a atividade anti-helmíntica desejada com cada uma destas plantas. Desta forma, poderá ser conhecido seu máximo potencial como fontes de vermífugos herbários para serem utilizados em programas de controle de nematoides de ovinos e caprinos.

#### 4.1 ETAPAS FUTURAS

- a) Submissão de artigo de atividade ovicida e larvicida *in vitro* e perfil químico de extratos e frações da *S. berteroana* à revista Veterinary Sciences MDPI;
- b) Realizar a anotação de compostos químicos obtidos nas análises químicas por LC-MS dos extratos brutos e frações mais ativas de *P. racemosa* var. *ozua*;
- c) Submissão de artigo com atividade ovicida *in vitro*, microscopia e perfil químico de derivados vegetais da Ozua, provavelmente à revista Chemistry and Biodiversity;
- d) Submissão de artigo com resultados de testes de toxicidade e de atividade anti-helmíntica *in vivo* com extrato bruto da *S. berteroana*;
- e) Submissão de artigo com resultados de teste de inibição da eclosão de ovos, microscopia e toxicidade *in vivo* de óleos essenciais de *L. dominguensis* e *P. haitiensis*;

## REFERÊNCIAS

- [PPA], P. P. A. **Guía de arboles maderables en la República Dominicana**. Santo Domingo, RD: [s. n.], 2012. Disponível em: <https://bvearmb.do/handle/123456789/1674>. Acesso em: 6 dez. 2024.
- ABONGWA, M.; MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. **Acta Veterinaria**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 137–152, 2017. Disponível em: <https://www.sciendo.com/article/10.1515/acve-2017-0013>. Acesso em: 20 ago. 2023.
- AGUILAR-CABALLERO, A. J. *et al.* El control de los nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿dónde estamos?. **Bioagrobiencias**, [S. l.], n. October, 2011.
- AGUILAR-CABALLERO, A. J. *et al.* La contribución del sector pecuario a la seguridad alimentaria en México. *In:* , 2013, Mexico. **Reunión de la asociación mexicana para la producción animal y seguridad alimentaria, a.c (ampa), 40.: seminario internacional de ovinos en el trópico**. 9., Mexico: [S. n.], 2013.
- AHMED, H. *et al.* An Inventory of Anthelmintic Plants across the Globe. **Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 131, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/12/1/131>.
- ALCALÁ CANTO, Y. *et al.* **Diagnostico de Parásitos de interés en medicina veterinaria**. 1st eded. Mexico: Universidad Autónoma de Mexico, 2019.
- ALDERS, R. G. *et al.* Livestock across the world: diverse animal species with complex roles in human societies and ecosystem services. **Animal Frontiers**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 20–29, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/af/article/11/5/20/6404341>. Acesso em: fev. 2024.
- ALONSO-DÍAZ, M. A. *et al.* In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 153, n. 3–4, p. 313–319, 2008.
- ALVES, I. A. B. S. *et al.* Simaroubaceae family: botany, chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 481–501, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X14000581>. Acesso em: fev. 2024.
- ANDRÉ, W. P. P. *et al.* Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 323–330, 2017.
- ANDRÉ, W. P. P. *et al.* Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 1–14, 2018.
- ANGÓN, E. *et al.* Caprine farms in northwest region of Dominican republic: Typologies according to livestock management and economic variables. **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 139–149, 2013.

ANIM-JNR, A. S. *et al.* Sustainable Small Ruminant Production in Low- and Middle-Income African Countries: Harnessing the Potential of Agroecology. **Sustainability**, [S. l.], v. 15, n. 21, p. 15326, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/15/21/15326>. Acesso em: set. 2023.

ARAÚJO-FILHO, J. V. de *et al.* Phenotypic and genotypic approaches for detection of anthelmintic resistant sheep gastrointestinal nematodes from Brazilian northeast. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 30, n. 2, 2021. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612021000200316&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612021000200316&tlng=en). Acesso em: 10 ago. 2023.

ARSENOPOULOS, K. V. *et al.* Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. **Animals**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 363, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/2/363>. Acesso em: jul. 2024.

ASSOUMA, M. H. *et al.* How to better account for livestock diversity and fodder seasonality in assessing the fodder intake of livestock grazing semi-arid sub-Saharan Africa rangelands. **Livestock Science**, [S. l.], v. 216, p. 16–23, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871141318301975>. Acesso em: 14 fev. 2024.

AZEEZ, S. *et al.* Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of filarial nematodes. **Journal of Molecular Modeling**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 151–163, 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00894-011-1035-2>. Acesso em: 10 fev. 2024

BABJÁK, M. *et al.* Multidrug resistance in *Haemonchus contortus* in sheep - can it be overcome?. **Journal of Veterinary Research**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 575–581, 2023. Disponível em: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/jvetres-2023-0057>. Acesso em: 10 ago. 2023.

BAIAK, B. H. B.; LEHNEN, C. R.; DA ROCHA, R. A. Anthelmintic resistance in cattle: A systematic review and meta-analysis. **Livestock Science**, [S. l.], v. 217, p. 127–135, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871141318304311>. Acesso em: ago. 2023.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. Acesso em: 15 set. 2022.

BARBOSA, M. L. F. *et al.* In vitro anthelmintic activity of *Lippia alba* essential oil chemotypes against *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 244, p. 108439, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489422002338>. Acesso em: jul. 2023

BELECKĚ, A. *et al.* Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 18, 2021. Disponível em: <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-021-00583-1>. Acesso em: ago. 2023.

BERNUCI, K. Z. *et al.* Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, [S. l.], v. 21, n. 12, 2016.

BEZERRA, F. W. F. *et al.* Bioactive Compounds and Biological Activity of Croton Species (Euphorbiaceae): An Overview. **Current Bioactive Compounds**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 383–393, 2020. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/167668/article>. Acesso em: jul. 2022.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. *et al.* Anthelmintic activity of Croton zehntneri and Lippia sidoides essential oils. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 148, n. 3–4, p. 288–294, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401707002907>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CANIGUERAL, S. La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio?. [s. l.], n. September 2002, 2002. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/228863288\\_La\\_Fitoterapia\\_una\\_therapeutica\\_para\\_el\\_tercer\\_milenio](https://www.researchgate.net/publication/228863288_La_Fitoterapia_una_therapeutica_para_el_tercer_milenio). Acesso em: ago. 2021.

CASTILLO-MITRE, G. F. *et al.* Caffeoyl and coumaroyl derivatives from Acacia cochliacantha exhibit ovicidal activity against Haemonchus contortus. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 204, p. 125–131, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117310802>. Acesso em: 20 jul. 2022.

CAVALCANTE, G. S. *et al.* Chemical composition and in vitro activity of Calotropis procera (Ait.) latex on Haemonchus contortus. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 226, p. 22–25, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401716302205>. Acesso em: ago. 22.

CEPEDA MARTÍNEZ, E. R. **Estudio parasitológico de nematodos gastrointestinales en ovinos del municipio de Ubaté, Cundinamarca**. 2017. 64 f. - Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/handle/001/2312/TGT-947.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 21 ago. 2021.

CHAGAS, A. C. de S. *et al.* Target selected treatment with levamisole to control the development of anthelmintic resistance in a sheep flock. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 1131–1139, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4844-x>. Acesso em: jul. 2022.

CHARLIER, J. *et al.* Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 361–367, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492214000750>. Acesso em: 15 ago. 2022.

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**, [S. l.], v. 182, p. 105103, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587720301902>. Acesso em: 15 ago. 2022.

CHARVET, C. L. *et al.* Nicotine-sensitive acetylcholine receptors are relevant pharmacological targets for the control of multidrug resistant parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 540–549, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.11.003>. Acesso em: nov. 2022.

COLES, G. C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

(W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 44, n. 1–2, p. 35–44, 1992. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030440179290141U>. Acesso em: 15 ago. 2021.

COMPADRE, C. M.; ROBBINS, E. F.; KINGHORN, A. D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 89–106, 1986. Acesso em: nov. 2022.

CONTRERAS-MORENO, B. Z. Chemical Composition of Essential Oil of Genus *Pimenta* (Myrtaceae): Review. **Potential of Essential Oils**, [S. l.], 2018. Acesso em: ago. 2021.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. *et al.* **Parasitologia Veterinaria**. España: MacGraw-Hill-Interamericana de España, 2001.

CORTES-MORALES, J. A. *et al.* In vitro ovicidal activity of *Baccharis conferta* Kunth against *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 197, n. August 2018, p. 20–28, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.01.003>. Acesso em: nov. 2022.

CORTES-MORALES, J. A. *et al.* In vitro ovicidal activity of *Brongniartia montalvoana* against small ruminant gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 240, n. July, 2022. Acesso em: nov. 2022.

CUELLAR, J. El sistema FAMACHA , una opción eficaz para el control de nematodos gastroentéricos en los ovinos . **Universidad Nacional Autónoma de México**, [S. l.], p. 1–18, 2003. Acesso em: ago. 2021.

DE ARAÚJO, F. F. *et al.* **Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620313972>. Acesso em: 15 nov. 2023.

DE ARAÚJO, G. G. L. *et al.* Water and small ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 39, n. SUPPL. 1, p. 326–336, 2010. Acesso em: ago. 2022.

DE MELO, A. R. B. *et al.* *Lippia sidoides* and *Lippia origanoides* essential oils affect the viability, motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Micron**, [S. l.], v. 129, p. 102781, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432819302641>. Acesso em: nov. 2022.

DESRUES, O. *et al.* Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on in vitro anthelmintic activity against bovine nematodes. **Parasitology**, [S. l.], v. 143, n. 4, p. 444–454, 2016. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182015001912/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182015001912/type/journal_article). Acesso em: ago. 2023.

DEVKOTA, K. P. *et al.* Compounds from *Simarouba berteriana* which inhibit proliferation of NF1-defective cancer cells. **Phytochemistry Letters**, [S. l.], v. 7, p. 42–45, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390013001651>. Acesso em: 14 set. 2021.

DILRUKSHI HERATH, H. M. P. *et al.* Screening of a small, well-curated natural product-



based library identifies two rotenoids with potent nematocidal activity against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 244, p. 172–175, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401717303047>. Acesso em: fev. 2024.

DOS SANTOS, M. C. *et al.* Bioactivity of essential oil from *Lippia gracilis* Schauer against two major coconut pest mites and toxicity to a non-target predator. **Crop Protection**, [S. l.], v. 125, n. July, 2019.

DUTRA, F. L. *et al.* Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum* chagasi within macrophages. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 164, p. 69–76, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X16306659>. Acesso em: fev. 2024.

ECURED. **Croton coronatus**. [S. l.], 2022. Disponível em: [https://www.ecured.cu/Croton\\_coronatus](https://www.ecured.cu/Croton_coronatus). Acesso em: ago. 2023.

EHATA, M. T. *et al.* &lt;i&gt;In Vitro&lt;/i&gt; Antiprotozoal and Cytotoxic Activity of the Aqueous Extract, the 80% Methanol Extract and Its Fractions from the Seeds of &lt;i&gt;Brucea sumatrana&lt;/i&gt; Roxb. (Simaroubaceae) Growing in Demo. **Chinese Medicine**, [S. l.], v. 03, n. 01, p. 65–71, 2012. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/cm.2012.31011>. Acesso em: ago. 2022.

ELBALOLA, A. A.; ABBAS, Z. K. Chemotaxonomy, antibacterial and antioxidant activities of selected aromatic plants from Tabuk region-KSA. **Heliyon**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e23641, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844023108498>. Acesso em: ago. 2022.

FAIZI, S. *et al.* Isolation of Nematicidal Compounds from *Tagetes patula* L. Yellow Flowers: Structure–Activity Relationship Studies against Cyst Nematode *Heterodera zae* Infective Stage Larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 17, p. 9080–9093, 2011. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf201611b>. Acesso em: fev. 2024.

FRAGA-CORRAL, M. *et al.* **By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: A review of tannins' biological activities and their potential for valorization**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/1/137>. Acesso em: ago. 2023.

FRANÇA, K. R. da S. *et al.* In vitro fungitoxic potential of *Lippia gracilis* (Schauer) essential oil against phytopathogens. **Australian Journal of Crop Science**, [S. l.], n. 14(04):2020, p. 667–674, 2020. Disponível em: [https://www.cropj.com/franca\\_14\\_4\\_2020\\_667\\_674.pdf](https://www.cropj.com/franca_14_4_2020_667_674.pdf). Acesso em: ago. 2022.

FTHENAKIS, G. C.; PAPADOPOULOS, E. Impact of parasitism in goat production. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 163, p. 21–23, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448817300871>. Acesso em: 25 ago. 2023.

GARCIA-BUSTOS, J. F.; SLEEBES, B. E.; GASSER, R. B. An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 306, 2019. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3537-1>. Acesso em: 20 fev. 2024.

GEARY, T. G.; SAKANARI, J. A.; CAFFREY, C. R. Anthelmintic Drug Discovery: Into the

Future. **Journal of Parasitology**, [S. l.], v. 101, n. 2, p. 125–133, 2015. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/10.1645/14-703.1>. Acesso em: ago. 2020.

GERMOSEN-ROBINEAU, L. **Farmacopea vegetal Caribeña**. República Dominicana: [s. n.], 2005.

GERMOSEN-ROBINEAU, L. **Farmacopea Vegetal Caribeña**. Tercera eded. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., 2014.

GRANDO, T. H. *et al.* In vitro activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. **Journal of Helminthology**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 377–382, 2016. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022149X15000401/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022149X15000401/type/journal_article). Acesso em: ago. 2022.

GUIMARÃES, V. P. *et al.* The future of small ruminants in Brazil: Lessons from the recent period and scenarios for the next decade. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 209, p. 106651, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448822000402>. Acesso em: 16 set. 2022.

HADI, R. F. *et al.* In vitro anthelmintic activities of shrub plants extracts for *Haemonchus contortus* worms. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S. l.], v. 712, n. 1, 2021.

HANSEN, T. V. A. *et al.* Proanthocyanidins inhibit *Ascaris suum* glutathione-S-transferase activity and increase susceptibility of larvae to levamisole in vitro. **Parasitology International**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 336–339, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576916300708>. Acesso em: 13 fev. 2024.

HERATH, H. M. P. D. *et al.* Advances in the discovery and development of anthelmintics by harnessing natural product scaffolds. In: ROLLINSON, D.; STOTHARD, J. R. (org.). **Advances in Parasitology**. United Kindom: [S. n.], 2021. p. 203–251. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X20301093>. Acesso em: 15 fev. 2024.

HERNANDEZ-ALVARADO, JERELLY; ZARAGOZA-BATISTA, ADRIAN, LÓPEZ-RODRÍGUEZ, GABINO; PELÁEZ-ACERO, ARMANDO; OLMEDO-JUÁREZ, AGUSTÍN AND ROVERO-PEREZ, N. Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. **Abanico Veterinario**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 14–27, 2018. Disponível em: <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-veterinario/article/view/157>. Acesso em: ago. 2020.

HERRERO, M.; THORNTON, P. K. Livestock and global change: Emerging issues for sustainable food systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 110, n. 52, p. 20878–20881, 2013. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1321844111>. Acesso em: 11 set. 2023.

HOSTE, H. *et al.* The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 253–261, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492206000997>. Acesso em: 12 fev. 2024.

IBGE. **Rebanho de Caprinos (Bodes e cabras)**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/caprinos/br>. Acesso em: 20 oct. 2024.

IBGE. **Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso em: 20 oct. 2024.

JARIĆ, S. *et al.* Ethnobotanical and ethnomedicinal research into medicinal plants in the Mt Stara Planina region (south-eastern Serbia, Western Balkans). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 7, 2024. Disponível em: <https://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13002-024-00647-2>. Acesso em: 19 oct. 2024.

JAYAWARDENE, K. L. T. D.; PALOMBO, E. A.; BOAG, P. R. Natural Products Are a Promising Source for Anthelmintic Drug Discovery. **Biomolecules**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 1457, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/10/1457>. Acesso em: fev. 2024.

JEMBERU, W. T. *et al.* Population, biomass, and economic value of small ruminants in Ethiopia. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 9, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.972887/full>. Acesso em: fev. 2024.

KATIKI, L. *et al.* Anthelmintic activity of anethole, carvone, carvacrol, thymol, linalool, limonene, eucalyptol, vanillin, cinnamaldehyde and eugenol in in vitro tests. **Planta Medica**, [S. l.], v. 80, n. 16, p. 1415–1415, 2014. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1394672>. Acesso em: 11 set. 2022.

KELLER, I. M.; LISSARRAGUE, C.; FIEL, C. A. **Estudio de la resistencia antihelmíntica en cría y recría de bovinos de carne**. 2018. 38 f. - Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), [S. l.], 2018. Disponível em: <https://ridaa.unicen.edu.ar:8443/server/api/core/bitstreams/d3fb6cd1-0321-4d0d-9b90-0df4dbb7061b/content>. Acesso em: 13 fev. 2024.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. **Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus. History, Mechanisms and Diagnosis**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2016-. ISSN 0065308X.v. 93 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>. Acesso em: 20 ago. 2023.

LIMA, C. S. *et al.* Anthelmintic effect of *Pterogyne nitens* (Fabaceae) on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*: Analyses of structure-activity relationships based on phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 164, p. 113348, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669021001126>. Acesso em: ago. 2022.

LIOGIER, H. A. **Diccionario Botánico de nombres vulgares de La Española**. República Dominicana: Editora Corripio, 2000.

LIOGIER, A. H. **Lippia dominguensis**. In: LA FLORA DE LA ESPAÑOLA VI. Santo Domingo, RD: Universidad Central del Este, 1994.

LIU, M. *et al.* Bioassay-guided isolation of three anthelmintic compounds from *Warburgia ugandensis* Sprague subspecies *ugandensis*, and the mechanism of action of polygodial. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 48, n. 11, p. 833–844, 2018. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751918301516>. Acesso em: 17 fev. 2024.

LIU, M.; PANDA, S. K.; LUYTEN, W. Plant-Based Natural Products for the Discovery and Development of Novel Anthelmintics against Nematodes. **Biomolecules**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 426, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/3/426>. Acesso em: fev. 2024.

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, G. *et al.* Nematodos gastrointestinales en ovinos y su resistencia antihelmíntica. Un tema en discusión de México. **Journal of the Selva Andina Animal Science**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 116–129, 2023. Disponível em: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2311-25812023000200116&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2311-25812023000200116&lng=es&nrm=iso&tlng=es). Acesso em: 12 fev. 2024.

LÓPEZ, Y. Canelilla de Jaragua: del crimen ambiental a la sostenibilidad. **Listín Diario**, Santo Domingo, RD, 2022. Disponível em: <https://listindiario.com/la-vida/2022/09/22/739867/canelilla-de-jaragua-del-crimen-ambiental-a-la-sostenibilidad.html>. Acesso em: ago. 2022.

LUU-DAM, N. A. *et al.* Chemistry and Bioactivity of Croton Essential Oils: Literature Survey and Croton hirtus from Vietnam. **Molecules**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 2361, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/5/2361>. Acesso em: set. 2021.

M. CHÁVEZ, L. W.; MOCTEZUMA, P. S.; HERERRA, T. F. Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. **Cuadernos Geográficos**, [S. l.], v. 56, p. 27–30, 2017. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=17152020002>. Acesso em: ago. 2020.

MAESTRINI, M. *et al.* In Vitro Anthelmintic Activity of Saponins Derived from Medicago spp. Plants against Donkey Gastrointestinal Nematodes. **Veterinary Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 35, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-7381/6/2/35>.

MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C. *et al.* Ultrastructural study of adult Haemonchus contortus exposed to polyphenol-rich materials under in vivo conditions in goats. **Parasite**, [S. l.], v. 26, 2019.

MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C. *et al.* Scanning electron microscopy of Haemonchus contortus exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 133, n. 3, p. 281–286, 2013.

MAVROT, F. Livestock Nematode Infection in a Changing World: Investigating the European Situation. [S. l.], p. 70–130, 2016.

MAYARA KLOSTER, F. **Metabolismo primário e secundário das plantas: Entenda o que é e suas funções**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://elevagro.com/blog/metabolismo-primario-e-secundario-das-plantas/>. Acesso em: 2 out. 2024.

MEDINA, A.; FIGUEROA, E.; ESPINO-UREÑA, M. J. **Determinación de la eficacia de cuatro desparasitantes frente a nemátodos gastrointestinales mediante el monitoreo de parámetros clínicos antes y después de los tratamientos en cabras lecheras de la Estación Experimental Pedro Brand del DIAF**. 2017. 79 f. - UASD, [S. l.], 2017.

MEJÍA, R. M. **Evaluación de la efectividad de Extractos Botánicos y Aceites Esenciales de la Familia Myrtaceae Frente a la Roya del Café (*Hemileia vastatrix* Berk. and Br) en la República Dominicana**. 2017. - Universidad Autónoma de Santo Domingo, [S. l.], 2017.

MEJÍA, I.; DE JESUS MOSQUEA, F.; ESPINO-UREÑA, M. **Determinación del nivel de resistencia *In vivo* de nemátodos gastrointestinales a tres familias de antiparasitarios en cabras en la Estación Experimental ovino-caprina Las Tablas de Baní**. 2019. - UASD, [S. l.], 2019.

MENDEZ, B. *et al.* Simalikalactone D, a Potential Anticancer Compound from *Simarouba tulae*, an Endemic Plant of Puerto Rico. **Plants**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 93, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/1/93>.

MICKIEWICZ, M. *et al.* The first report of multidrug resistance in gastrointestinal nematodes in goat population in Poland. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 270, 2020. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-020-02501-5>.

MMARD. **Cuarto informe nacional de Biodiversidad República Dominicana**. [S. l.: s. n.], 2010.

MOLINO, S. **Bioactivity and effect on gut microbiota**. 2021. 287 f. - Universidad de Granada, [S. l.], 2021.

MOLINO, S. *et al.* **Natural Tannin Wood Extracts as a Potential Food Ingredient in the Food Industry**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b00590>. Acesso em: jul. 2022

MONTEIRO, A. L. G. *et al.* The role of small ruminants on global climate change. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 43124, 2018. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/43124>. Acesso em: set. 2022

MORAIS, S. M. de V.; PINTO, Í. G. **Introdução à Prospecção de Produtos Naturais**. 1st. ed. Belo Horizonte: Editora Poisson, 2021. Disponível em: [https://poisson.com.br/livros/individuais/Produtos\\_Naturais/Produtos\\_Naturais.pdf](https://poisson.com.br/livros/individuais/Produtos_Naturais/Produtos_Naturais.pdf). Acesso em: fev. 2024

MORALES, G. *et al.* Clasificación por el método Famacha y su relación con el valor de hematocrito y recuento de h.p.g. de ovinos criados en condiciones de pastoreo. **Zootecnia Tropical**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 545–555, 2010. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf?zt10054>. Acesso em: jul. 2020

MOREIRA, R. R. D. *et al.* Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [S. l.], v. 61, n. December 2018, p. 1–7, 2019.

MUELLER-HARVEY, I. *et al.* Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. **Crop Science**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 861–885, 2019. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2135/cropsci2017.06.0369>. Acesso em: set. 2022.

MUKHERJEE, N. *et al.* Phenolics and Terpenoids; the Promising New Search for Anthelmintics: A Critical Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 17, p. 1415–1441, 2016. Acesso em: fev. 2024.

NARI, A. *et al.* Resistencia a los antiparasitarios Estado actual con énfasis Resistencia a los antiparasitarios. **Agriculture and Agricultural Science And Technology Information-FAO**, [S. l.], v. 157, n. 51, p. 1–59, 2003. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris>. Acesso em: ago. 2020.

NDJONKA, D. *et al.* Anthelmintic activity of phenolic acids from the axlewood tree *Anogeissus leiocarpus* on the filarial nematode *Onchocerca ochengi* and drug-resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Helminthology**, [S. l.], v. 88, n. 4, p. 481–488, 2014. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022149X1300045X/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022149X1300045X/type/journal_article). Acesso em: set. 2021.

NICIURA, S. C. M. *et al.* In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. **Journal of Helminthology**, [S. l.], v. 94, p. e46, 2020. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022149X19000221/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022149X19000221/type/journal_article). Acesso em: ago. 2021.

NOLLET L, L. M.; GUITIERREZ-URIBE, J. A. **Phenolic Compounds in food characterization and analysis**. Boca Raton: Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018. Acesso em: jul. 2022.

NUNOMURA, R. de C. S. *et al.* In vitro studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). **Acta Amazonica**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 327–330, 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59672006000300006&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672006000300006&lng=en&tlng=en). Acesso em: fev. 2024.

NWANOSIKE, E. *et al.* Phytochemistry and ethnopharmacology of *Lippia* genus with a statement on chemotaxonomy and essential oil chemotypes. **Article in International Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 201–211, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.3>. Acesso em: jul. 2022.

OLIVEIRA SANTOS, F. *et al.* Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: a review. **Parasitology**, [s. l.], v. 146, n. 10, p. 1233–1246, 2019. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182019000672/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182019000672/type/journal_article). Acesso em: jul. 2022.

OLMEDO-JUÁREZ, A. *et al.* In Vitro Nematocidal Properties from Two Extracts: *Lippia graveolens* Leaves and *Delonix regia* Flowers Against Eggs and Infective Larvae of *Haemonchus contortus*. **Journal of Medicinal Food**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 329–337, 2022. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2021.0066>. Acesso em: out. 2022

PAULA, J. A. . *et al.* Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 363–379, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-)

05722010000300015&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: jul. 2020.

PIZZI, A. Tannins medical / pharmacological and related applications: A critical review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [S. l.], v. 22, p. 100481, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235255412100108X>. Acesso em: ago. 2022.

PLANTS OF THE WORLD ONLINE, P. **Croton coronatus Urb.** [S. l.], 2023. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:70078-2>. Acesso em: fev. 2024.

QI, H. *et al.* In vitro anthelmintic activity of *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 211, n. 3–4, p. 223–227, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401715002782>. Acesso em: ago. 2021.

QUEZADA DELGADO, P. josé. **Programa de innovación para el desarrollo de ventajas competitivas BID 2433 OC/DR: Proyecto de asistencia técnica para el programa de apoyo a la política de competitividad II.** [S. l.], 2016. Disponível em: <http://www.competitividad.org.do/wp-content/uploads/2016/05/Estrategia-de-Mercadeo-Clúster-Ovino-y-Caprino.pdf>. Acesso em: fev. 2024.

QUIJADA, J. *et al.* Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 28, p. 6346–6354, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b00831>. Acesso em: ago. 2022.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 603–613, 2001.

ROBERTS, F.; O’SULLIVAN, P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 99, 1950. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/?paper=AR9500099>. Acesso em: fev. 2024.

RODRÍGUEZ DIEGO, J. G. *et al.* Antihelmínticos, resistencia y método FAMACHA: Experiencia cubana en ovinos. **Revista de Salud Animal**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 57–63, 2015. Acesso em: set. 2022.

ROMERO-BENAVIDES, J. C. *et al.* Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 129, p. 209–217, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417300703>. Acesso em: ago. 2022.

ROPIAK, H. M. *et al.* Structure–Activity Relationship of Condensed Tannins and Synergism with trans -Cinnamaldehyde against *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 46, p. 8795–8805, 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b03842>. Acesso em: fev. 2024.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. de P. **Panorama da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes no Brasil.** [S. l.: s. n.], 2016.

SANDERS, J. *et al.* A new paraprobiotic-based treatment for control of *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S. l.], v. 14, p. 230–236, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320720300464>. Acesso em: ago. 2022.

SANTOS, J. M. L. *et al.* *Haemonchus contortus*  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 248, n. August, p. 90–95, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.003>. Acesso em: 20 fev. 2024.

SANTOS, J. M. L. dos *et al.* High levels of benzimidazole resistance and  $\beta$ -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State, Brazil. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 146, p. 48–52, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092144881630339X>. Acesso em: fev. 2024.

SANTOS, J. M. L. dos *et al.* Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 199, n. 3–4, p. 160–164, 2014. Acesso em: fev. 2024.

SARGISON, N. D. **The critical importance of planned small ruminant livestock health and production in addressing global challenges surrounding food production and poverty alleviation**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2020. Acesso em: ago. 2022.

SIMIONATTO, E. *et al.* Bioactivity and Chemical Composition of the Essential Oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 250–261, 2009. Acesso em: jul. 2021.

SOLANO, W.; DÍAZ, L.; ESPINO-UREÑA, M. **Evaluación del nivel de resistencia in vivo de nemátodos gastrointestinales a tres familias de antiparasitarios en ovejas en dos estaciones del año**. 2018. 79 f. - UASD, [S. l.], 2018.

SOUZA, A. L. da C. *et al.* In vitro anthelmintic activity of *Lippia gracilis* Schauer essential oil against egg-hatching of goat gastrointestinal nematodes. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 87, p. 1–4, 2020.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *lippia* (verbenaceae)— a literature review. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 471–485, 1996.

THOMAS, W. W. The American genera of Simaroubaceae and their distribution. **Acta Botanica Brasilica**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 11–18, 1990.

TIMON, V. M. **Small ruminant production in the developing countries - synthesis and recommendations of the consultation**. [S. l.], 1985. Disponível em: <https://www.fao.org/4/ah221e/AH221E22.htm>. Acesso em: 3 out. 2024.

TONTINI, J. F. *et al.* Respostas na fisiologia da digestão ruminal ao uso de taninos na alimentação de ruminantes. **Pubvet**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 1–14, 2021.

TRUJILLO MASCIA, N. Elementos de Etnomedicina Veterinaria en la Historia de Venezuela.



**Revista del colegio DEL médicos veterinarios del estado de Lara**, [S. l.], n. 0251, p. 18, 2013.

TUCKER, A. O. *et al.* Volatile leaf oils of caribbean myrtaceae. I. three varieties of *Pimenta racemosa* (Miller) J. Moore of the Dominican Republic and the commercial bay oil. **Journal of Essential Oil Research**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 323–329, 1991.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4ta. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998.

URQUHART, G. M. *et al.* **Parasitología veterinaria**. 1ra ediciced. Zaragoza, España: Editorial Acribia, 2001.

VALERIO CABRERA, D. **Sistemas de producción de ovinos y caprino en la República Dominicana. Análisis de competitividad de las explotaciones comerciales**. España: Editorial Académica Española, 2012. Disponible em: <https://www.amazon.com/Sistemas-producción-caprinos-República-Dominicana/dp/3847365622>. Acesso em: ago. 2022.

VAN WYK, J. A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 1–14, 2013.

VUNDA, S. L. L. *et al.* Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli*(Euphorbiaceae) essential oils. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 111, n. 3, p. 961–966, 2012. Disponible em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-012-2918-6>. Acesso em: jul. 2020.

WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **TAXON**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 793–823, 1993. Disponible em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2307/1223265>. Acesso em: ago. 2020.

WILLIAMS, A. R. *et al.* Co-operative suppression of inflammatory responses in human dendritic cells by plant proanthocyanidins and products from the parasitic nematode *Trichuris suis*. **Immunology**, [S. l.], v. 150, n. 3, p. 312–328, 2017. Disponible em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.12687>. Acesso em: fev. 2024.

WODAJO, H. D. *et al.* Contribution of small ruminants to food security for Ethiopian smallholder farmers. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 184, p. 106064, 2020. Disponible em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448820300195>. Acesso em: set. 2023.

YAPU, D. G. *et al.* Evaluación de la actividad antiplasmódica in vitro de extractos de *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia* y *Croton lechleri* Evaluation of the in vitro antiplasmodic activity of extracts from *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia* and *Croton lechleri*. **Biofarbo**, [S. l.], p. 16–20, 2008.

ZELLER, W. E. Activity, Purification, and Analysis of Condensed Tannins: Current State of Affairs and Future Endeavors. **Crop Science**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 886–904, 2019. Disponible em: <http://doi.wiley.com/10.2135/cropsci2018.05.0323>. Acesso em: ago. 2022.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - RESULTADO DOS TESTES DE EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA *IN VIVO* COM EXTRATO BRUTO DE SIMAROUBA BERTEROANA

#### A1 - METODOLOGIA DOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIHELMITICA *IN VIVO*

O teste de avaliação de atividade anti-helmíntica *in vivo* foi realizado em duas etapas ou fases. Primeiro, foi avaliado o efeito do extrato bruto Sb2 sobre os nematoides gastrointestinais de cabras. Foram utilizadas 27 fêmeas de cabras mestiças da raça Núbia com peso médio de  $25,8 \pm 7,1$  kg e idade entre 6 e 24 meses.

As cabras foram criadas em uma fazenda experimental localizada em uma região semiárida na parte centro-sul da República Dominicana (Las Tablas, Província de Peravia), com coordenadas geográficas  $18^{\circ} 16' N$  e  $70^{\circ} 25' W$ . As cabras são criadas em um sistema semiextensivo com 6-7 horas de pastagem livre e o restante do tempo confinado com água *ad libitum*. Os caprinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais foram selecionados de acordo com o número de ovos nas fezes (opg), sendo este número superior a 400 e avaliado pela técnica de McMaster (Ueno; Gonçalves, 1998), considerando também a idade ( $> 6 < 24$  meses), e que não fossem fêmeas prenhas ou lactantes. Posteriormente, os caprinos foram divididos em 3 grupos homogêneos ( $n = 8$ ) de acordo com o opg e distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos 1: 100 mg/kg de Sb2 (extrato bruto da 2ª coleta de *S. berteroana*); 2: água como controle negativo e 3: 2,5 mg/kg de monepantel (Zolvix®, Novartis, Nova Zelândia) como controle positivo. As fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais nos dias 0, 7, 14, 21 e 27, e o FAMACHA® (cor da mucosa ocular) e os volumes de células compactadas (hematócrito) também foram avaliados nos dias 0, 14 e 27. A avaliação do FAMACHA® foi realizado de acordo com a metodologia descrita em estudos anteriores (Cuellar, 2003; Morales *et al.*, 2010), que correlacionou a cor da mucosa ocular com a gravidade da anemia. Cinco categorias foram consideradas na avaliação.

Na segunda fase, um ano após o primeiro teste, o efeito anti-helmíntico do mesmo extrato bruto a 350 mg/kg foi avaliado na mesma fazenda. Foram selecionadas 21 fêmeas de cabras mestiças núbias naturalmente infectadas com nematódeos gastrointestinais ( $opg \geq 500$ ), pesando em média  $22,94 \pm 0,95$  kg e com idade entre 8 e 20 meses. As cabras foram divididas em três grupos homogêneos ( $n = 7$ ) de acordo com o epg e a idade como realizado no primeiro teste e foram tratadas com os seguintes tratamentos 1: 350 mg/kg de Sb2; 2: água como controle

negativo e 3: 8 mg/kg de levamisol (15% Levamisol, Servinsumos®, Colômbia).

Em ambos os experimentos, as amostras fecais foram coletadas diretamente do reto dos animais nos dias 0, 7, 14, 21 e 27 ou 28 após o tratamento para determinar o ovo por grama (opg) de fezes. Além disso, o teste de redução da contagem de ovos fecais (RCOF) ou FECRT por suas siglas em inglês (*Fecal Egg Count Reduction Test*), foi calculado semanalmente de acordo com a metodologia proposta por Coles *et al.* (1992). Ademais, em ambos os experimentos o FAMACHA® foi avaliado juntamente com o escore de condição corporal e o hematócrito ou PVC (volume de células compactadas) nos dias 0, 14 e 27 ou 28, bem como o peso corporal (dias 0 e 28). As coproculturas foram realizadas de acordo com Roberts; O'Sullivan (1950) nos dias 0, 14 e 27 ou 28. Foi realizada uma coprocultura de larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) usando três pools de fezes de cada grupo em cada coleta para identificar os gêneros de nematoides e determinar sua prevalência. Os gêneros de L<sub>3</sub> foram determinados por identificação com base em Ueno & Gonçalves (1998) e de acordo com van Wyk; Mayhew (2013). No segundo experimento, os valores hematológicos também foram avaliados (dias 0 e 28).

### **A1.1 - Estatísticas dos experimentos de eficácia anti-helmíntica *in vivo***

A eficácia anti-helmíntica do extrato bruto de *S. berteroana* nos dois ensaios *in vivo* foi determinada pelo FECRT com base na média aritmética da contagem de ovos fecais de cada grupo usando a seguinte fórmula:  $FECRT = 100 \times [1 - (XT/XC)]$ ; XC foi a média aritmética da contagem de ovos fecais das cabras de controle e XT foi a média aritmética da contagem de ovos fecais das cabras tratadas (Sb2, monepantel ou levamisol) antes (dia 0) e 7, 14, 21 e 27 ou 28 dias após a vermifugação, de acordo com (Coles *et al.*, 1992). Para mais, em ambos os experimentos, o FAMACHA® foi avaliado juntamente com o escore de condição corporal e o PVC (volume de células compactadas) nos dias 0, 14 e 27 ou 28, bem como o peso corporal (dias 0 e 28). As culturas fecais foram realizadas de acordo com Roberts & O'Sullivan, (1950) nos dias 0, 14 e 27 ou 28. Uma cultura de larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) usando três pools de fezes de cada grupo foi realizada em cada coleta para identificar os gêneros de nematoides e determinar sua prevalência. Os gêneros de L<sub>3</sub> foram determinados por identificação com base em Ueno & Gonçalves (1998) e de acordo com van Wyk e Mayhew (2013). No segundo experimento, os valores hematológicos também foram avaliados (dias 0 e 28).

Antes da ANOVA, os dados do FECRT foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para análise de normalidade ( $P < 0,05$ ). Como os valores de epg não passaram no teste de

normalidade, no primeiro experimento os valores de epg foram analisados por Kruskal-Wallis e as comparações de médias foram feitas pelo teste de Dunn. No segundo experimento *in vivo*, os valores de epg foram transformados em log (Log10(Y)) e, após confirmar a normalidade da transformação, os valores foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) usando o software GraphPad Prism® 8.0.2.

Os parâmetros clínicos, como o FAMACHA®, também foram submetidos ao teste de normalidade e, caso passassem no teste de normalidade, eram analisados por ANOVA e, caso não passassem no teste de normalidade, eram analisados por Kruskal Wallis (2º experimento *in vivo*).

Os valores de PVC e outros valores hematológicos foram analisados por ANOVA, com a realização do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); no entanto, quando os parâmetros não eram normais, eles foram transformados em Log(y) para realizar suas análises.

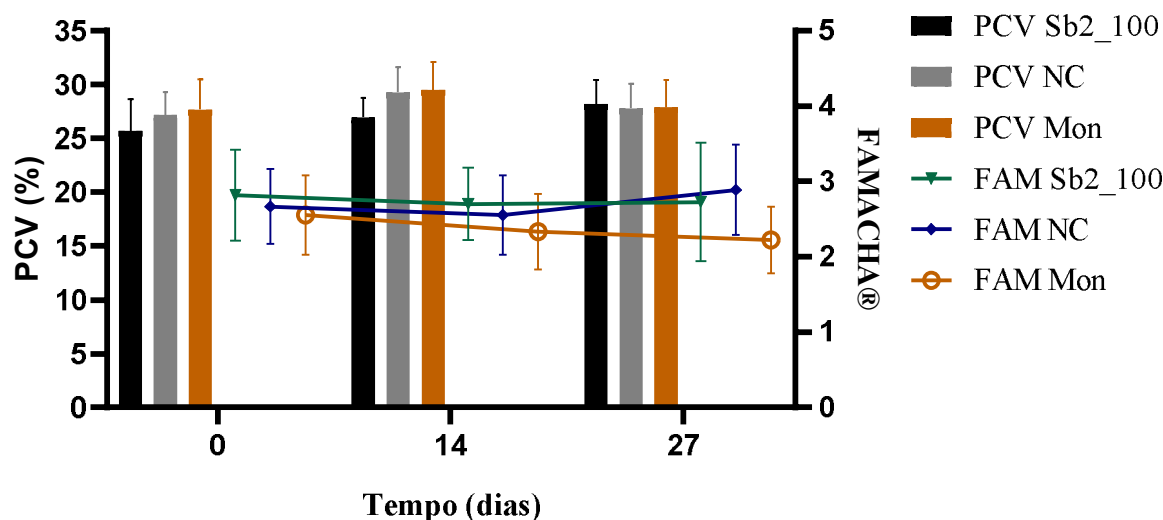
## A2 - PRIMEIRO TESTE ANTI-HELMÍNTICO EM CABRAS

Primeiramente 24 cabras foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: O Grupo 1 recebeu 100 mg/kg de Sb2, o Grupo 2 recebeu água (controle negativo) e o Grupo 3 recebeu 2,5 mg/kg de monepantel (controle positivo). A eficácia do Sb2 foi avaliada em um período de 27 dias, com avaliações semanais realizadas por meio da medição da contagem fecal de epg (ovos por grama) e do cálculo dos valores de FECRT. Além disso, foram monitorados outros parâmetros clínicos, inclusive o FAMACHA®, o peso corporal, o escore de condição corporal (BCS) e hematócrito (PCV) ou volume de células compactadas, para assim obter informações mais detalhadas sobre o impacto do extrato nos indivíduos.

### A2.1 - FAMACHA® e PVC do primeiro estudo com extrato bruto de *S. berteroana* em cabras

Após um período de avaliação de 27 dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores do FAMACHA® dos caprinos nos grupos de tratamento no momento em consideração (dias 0, 14 e 27). Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais em relação ao PCV. Os valores do FAMACHA® e do PCV são apresentados como médias e desvios padrão em um gráfico combinado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Hematócrito (PCV) e FAMACHA® (média e desvio padrão) de cabras tratadas com extrato de *Simarouba berteroana* da 2ª coleta (junho 2021).



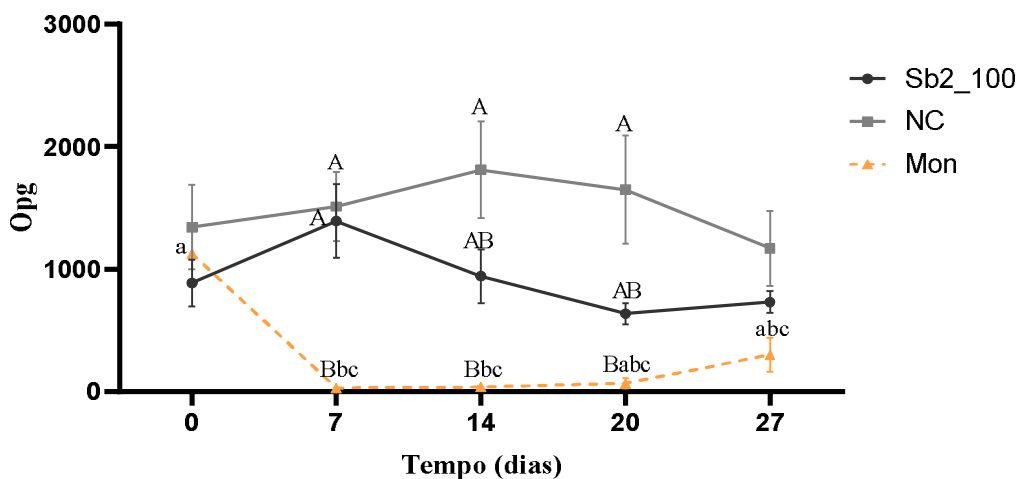
Fonte: Autor (agosto, 2024).

Legenda: PCV: hematócrito no eixo Y esquerdo e o FAMACHA® (FAM) no eixo Y direito; Sb2\_100: extrato bruto de *Simarouba berteroana* administrado a 100 mg/kg; NC: controle negativo com água e Mon: monepanel (controle positivo).

## A2.2 - Opg e FECRT do primeiro estudo com extrato bruto de *Simarouba berteroana* em cabras

Após a quantificação dos ovos fecais das cabras, a análise de Kruskal-Wallis demonstrou que, após a semana inicial, o monepanel reduziu significativamente o opg das cabras em comparação com o Sb2 a 100 mg/kg e com o controle negativo, com um opg médio de 31,3 contra >1.390 dos outros tratamentos. Após a segunda semana, os opg das cabras tratadas com Sb2 (a 100 mg/kg, Sb2\_100) mostraram uma redução notável, atingindo um nível de semelhança estatística com o do controle positivo (622,5). No entanto, não foi observada diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre esses valores e os opg das cabras do grupo de controle negativo. No 20º dia, os opg das cabras tratadas com Sb2\_100 permaneceram em um nível mais baixo, apresentando semelhança estatística com os opg das cabras tratadas com monepanel (Gráfico 2). Na última semana (dia 27), não foram observadas diferenças estatísticas nos opg dos grupos tratados. Vale ressaltar que a eficácia do Sb2\_100 nos dias 7, 14, 20 e 27 foi de 7,85%, 47,9%, 61,4% e 36,3%, respectivamente, enquanto a eficácia do monepanel foi de 98,16%, 98,2%, 96,3% e 59,89%, respectivamente, nos mesmos dias.

Gráfico 2 - Ovos por grama de fezes (média e erro padrão) de nematoides gastrointestinais de cabras tratadas com extrato de *Simarouba berteriana* da 2ª coleta (junho 2021) durante 27 dias.



Fonte: Autor (agosto, 2024).

Legenda: Sb2\_100: Sb2 a 100 mg/kg; NC: controle negativo (água destilada) e Mon: monepantel como controle positivo. Letras maiúsculas comparam a média entre diferentes grupos em um momento; letras minúsculas comparam a média de diferentes momentos em um mesmo grupo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ , teste de comparações múltiplas de Dunn) com análise de Kruskal Wallis.

### A2.3 - Gêneros de larvas de terceiro estágio recuperadas de coproculturas do 1º experimento *in vivo*

As coproculturas de fezes foram realizadas a cada 14 dias para a identificação dos gêneros de nematoides gastrointestinais e para verificar se sua prevalência relativa apresentava alterações após a administração dos tratamentos.

Antes da administração dos tratamentos, os gêneros predominantes de nematoides observados foram *Haemonchus* sp. seguido por *Trichostrongylus* sp. e, em um grau muito menor, *Oesophagostomum* sp. e *Strongyloides* sp. (*Haemonchus* > *Trichostrongylus* > *Oesophagostomum* > *Strongyloides*) (Tabela 1). Após a administração dos tratamentos, observou-se que a prevalência de *Haemonchus* permaneceu a mais alta nas cabras do grupo de controle negativo e nas cabras tratadas com Sb2\_100 no 14º dia. No entanto, nas cabras tratadas com monepantel, foi observado um declínio notável na prevalência de *Haemonchus* (de 83% para 38%), enquanto um aumento acentuado foi evidente na prevalência de *Oesophagostomum* sp.

No ponto de amostragem final (dia 27), a prevalência de nematoides permaneceu

comparável à observada no início nas cabras do grupo de controle negativo. No entanto, nas cabras tratadas com Sb2\_100, a proporção de *Haemonchus* versus *Trichostrongylus* foi quase idêntica (48,9 versus 43,1%, respectivamente), o que foi consistente com os achados observados nas cabras tratadas com monepantel. Por outro lado, notou-se de maneira geral que, após a aplicação dos tratamentos, a prevalência de *Oesophagostomum* aumentou do início ao fim do estudo, enquanto a proporção de *Strongyloides* diminuiu.

Tabela 1 - Porcentagem de nematoides gastrointestinais recuperados em coproculturas de cabras tratadas com extrato bruto de *Simarouba berteroana* da 1ª coleta (fevereiro 2020) em um período de 27 dias

Tratamentos	Gênero de L <sub>3</sub>	% de L <sub>3</sub>		
		Dia 0	Dia 14	Dia 27
Sb2_100	<i>Haemonchus</i> sp.	66,6	73,5	48,9
	<i>Trichostrongylus</i> sp.	31,9	24,5	43,1
	<i>Oesophagostomum</i> sp.	1,3	1,8	7,9
	<i>Strongyloides</i> sp.	...	...	...
Água destilada	<i>Haemonchus</i> sp.	87,3	55,5	54,6
	<i>Trichostrongylus</i> sp.	...	31,1	26,8
	<i>Oesophagostomum</i> sp.	...	13,3	18,5
	<i>Strongyloides</i> sp.	12,6	...	-
Monepantel	<i>Haemonchus</i> sp.	83,0	38,2	48,5
	<i>Trichostrongylus</i> sp.	...	12,7	42,7
	<i>Oesophagostomum</i> sp.	...	48,9	8,7
	<i>Strongyloides</i> sp.	16,9	...	...

Fonte: Autor (agosto, 2024).

Legenda: Sb2\_100: Extrato bruto de *Simarouba berteroana* da 2ª coleta administrado a 100 mg/kg; L<sub>3</sub>: larvas de 3º estágio de nematoides gastrointestinais.

### A3 - SEGUNDO TESTE ANTI-HELMÍNTICO EM CABRAS

Dada a dose relativamente baixa de Sb2 avaliada no experimento inicial em comparação com sua DL<sub>50</sub>, considerou-se apropriado avaliar uma dose mais alta, mas que ainda fosse segura para as cabras e mais eficaz na redução da carga de nematoides. Um teste piloto foi realizado antes do segundo experimento para definir a dose a ser utilizada. O teste envolveu a administração de doses crescentes do extrato (200, 250, 300 e 350 mg/kg) por via oral a quatro cabras que foram observadas por um período de 10 dias. Como não foram observadas mortes ou indicações de toxicidade ou alterações comportamentais relevantes, o segundo experimento foi realizado com uma dosagem de 350 mg/kg.

Para verificar se um aumento na dose do extrato de Sb2 aumentaria a eficácia anti-helmíntica em cabras, um segundo experimento foi realizado com outras cabras (n = 21) da

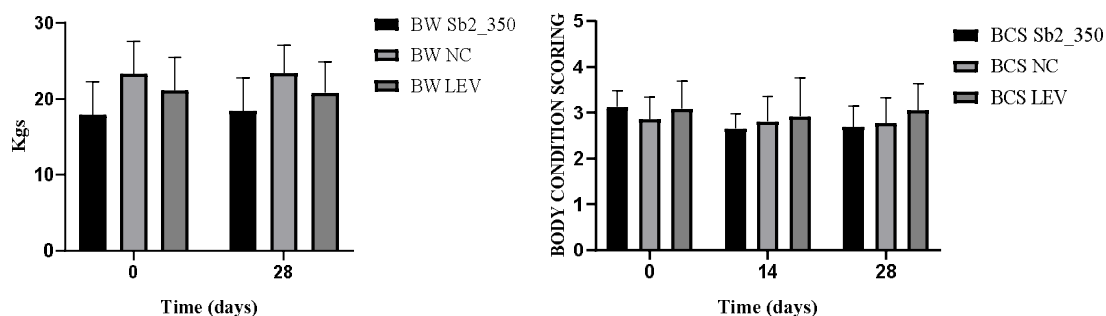
mesma fazenda um ano depois. Nesse caso, as cabras foram distribuídas aleatoriamente em um dos três grupos (n = 7) de acordo com o opg. O grupo 1 recebeu Sb2 na dose de 350 mg/kg, administrado misturado farelo de milho. O grupo 2 recebeu água na dose de 15 mL por via oral e o grupo 3 recebeu levamisol na dose de 8 mg/kg, administrado por via oral em uma única dose

A eficácia do tratamento foi avaliada com base na redução do número de ovos por grama de fezes (opg e o FECRT) e na avaliação dos parâmetros clínicos, incluindo o FAMACHA®, o volume de células concentradas (PCV), a condição corporal e o peso. Além disso, os parâmetros hematológicos (hemograma) foram monitorados nos dias 0 e 28 para avaliar o impacto do extrato sobre o estado fisiológico das cabras.

### A3.1 - Peso corporal e escore da condição corporal das cabras do segundo experimento *in vivo*

Com relação à avaliação da pontuação ou escore da condição corporal e do peso corporal, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos em nenhum momento avaliado (dias 0, 14 e 28) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Peso corporal e escore de condição corporal (média e desvio padrão) de cabras tratadas com extrato de *Simarouba berteriana* da 2ª coleta (junho 2021).



Fonte: Autor (agosto, 2024).

Legenda: PC: peso corporal (gráfico à esquerda); BCS: escore de condição corporal (gráfico à direita); Sb2: extrato bruto de *Simarouba berteriana* (2ª coleta); NC: água destilada; LEV: levamisol.

### A3.2 - FAMACHA® e PCV de cabras do segundo experimento *in vivo*

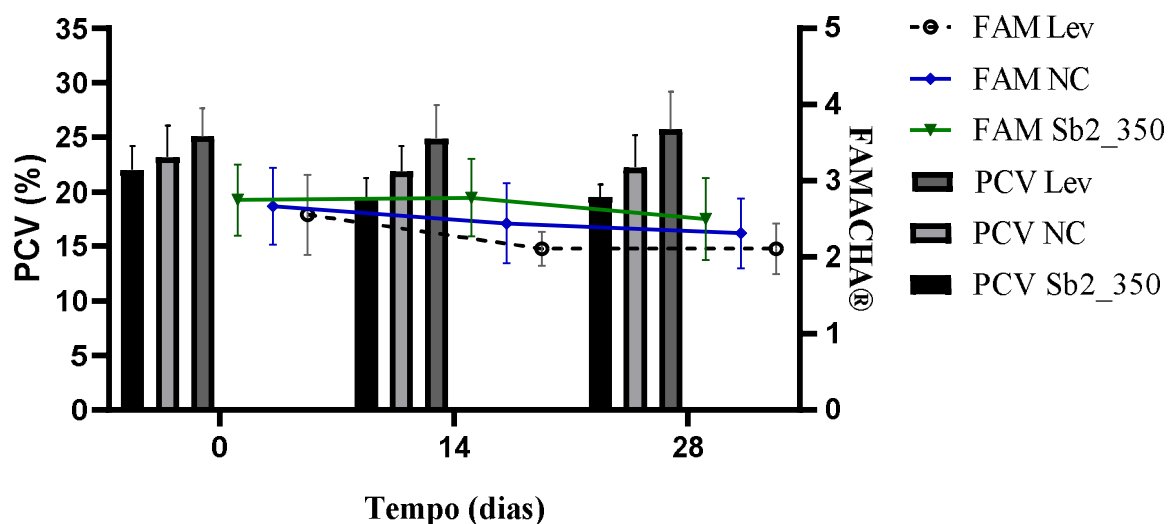
Os valores de PCV ou hematócrito foram transformados em Log(y) e suas análises demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias de PCV dos caprinos para cada tratamento em nenhum momento (Tukey  $P < 0,05$ , Gráfico 9).

O teste de Kruskal-Wallis revelou que não houve valores do FAMACHA® significativamente



diferentes entre os tratamentos nos pontos de tempo avaliados (dias 0, 14 e 28). A média e o desvio padrão para as classificações do FAMACHA® são apresentados no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Hematócrito (PCV) e FAMACHA® (média e desvio padrão) de cabras tratadas com extrato de *Simarouba berteroana* da 2ª coleta (junho 2021).



Fonte: Autor (agosto, 2024).

Legenda: PVC: volume de células compactadas ou hematócrito (no eixo Y esquerdo); FAM: FAMACHA® (no eixo Y direito); NC: água destilada e LEV: levamisol; Sb2: extrato bruto de *Simarouba berteroana* (2ª coleta). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ , teste de Tukey).

### A3.3 - Valores hematológicos de cabras do segundo experimento *in vivo*

Para verificar se o extrato de Sb2 a 350 mg/kg exerce alguma influência sobre os parâmetros do hemograma como imunomodulação e/ou alterações específicas em qualquer contagem de células sanguíneas, os parâmetros hematológicos de cabras de todos os tratamentos foram avaliados nos dias 0 e 28. Além disso, foram realizados esfregaços de sangue para determinar as contagens relativas e absolutas dos tipos de leucócitos.

Os parâmetros da série de eritrócitos (PCV, Hgb, RBC) das cabras tratadas com Sb2 no início (dia 0) exibiram valores ligeiramente reduzidos em relação aos outros grupos, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). No dia 28, as diferenças entre os grupos se tornaram mais pronunciadas, resultando em uma redução estatisticamente significativa na contagem de glóbulos vermelhos (RBC) nas cabras tratadas com Sb2\_350 em comparação com as cabras tratadas com levamisol e o grupo de controle negativo (Tabela 2).

Com relação à série de leucócitos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos no sangue total

das cabras nos grupos de tratamento nos dias avaliados. No dia 0, observou-se que os neutrófilos segmentados do grupo tratado com extrato de *S. berteroana* eram estatisticamente menores do que os do grupo tratado com levamisol. Entretanto, após 28 dias, não foram observadas diferenças entre os neutrófilos dos grupos de tratamento. As plaquetas precisaram ser transformadas em  $\log(Y)$  e a análise ANOVA demonstrou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no momento da avaliação.

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos (média e desvio padrão) de cabras tratadas com o extrato bruto de *Simarouba berteroana* da 2ª coleta (junho 2021).

Parâmetros hematológicos (Unidades)	Dias	Tratamentos		
		Sb2_350	CN	Levamisol
PCV ou Htc (%)	0	21,75 (1,57)	23,17 (2,89)	25,10 (2,57)
	14	19,68 (2,34)	21,64 (2,33)	24,36 (2,77)
	28	19,51 (1,18)	22,24 (2,98)	25,73 (3,44)
Hemoglobina (Hgb) (g/dL)	0	6,56 (0,51)	6,93 (1,56)	7,79 (0,78)
	28	5,93 (0,35)	6,68 (0,92)	7,67 (0,95)
RBCs ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	0	...	...	...
	28	5,43 (0,31) <sup>b</sup>	6,94 (0,72) <sup>a</sup>	7,27 (2,13) <sup>a</sup>
WBCs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	15,18 (5,70)	16,17 (4,40)	21,15 (8,40)
	28	17,79 (6,40)	15,28 (2,98)	17,24 (4,84)
Neutrófilos segmentados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	7,46 (3,37) <sup>Bb</sup>	9,46 (3,02) <sup>ab</sup>	10,94 (5,88) <sup>a</sup>
	28	10,68 (2,98) <sup>A</sup>	9,38 (3,39)	9,89 (4,14)
Neutrófilos Bandas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	0,009 (0,02)	0,016 (0,05)	0,033 (0,07)
	28	0,079 (0,15)	0,053 (0,12)	0,031 (0,06)
Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	8,04 (3,64)	7,56 (2,96)	7,30 (3,97)
	28	5,59 (3,07)	4,88 (1,61)	6,6 (2,51)
Eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	0,84 (0,83)	0,67 (0,57)	0,85 (0,33)
	28	1,70 (1,88)	1,02 (0,79)	1,07 (0,75)
Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	0,374 (0,28)	0,455 (0,28)	0,484 (0,41)
	28	0,192 (0,16)	0,144 (0,13)	0,297 (0,36)
Basófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	0,00	0,008 (0,03)	0,008 (0,03)
	28	0,00	0,00	0,00
Plaquetas ( $/\mu\text{L}$ )	0	207,1 (150,9)	220,4 (128,2)	180,9 (70,65)
	28	386,4 (209,5)	362,9 (272,3)	278,8 (217,2)

Fonte: Autor (setembro, 2024).

Legenda: Sb2\_350: extrato bruto de *S. berteroana* (2ª coleta) administrado a 350 mg/kg; PCV: volume de células compactadas ou hematócrito (Htc), RBC: hemácias, WBC: leucócitos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) entre as linhas e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) entre as colunas (dias), utilizando o teste de Tukey, com relação a cada parâmetro hematológico.

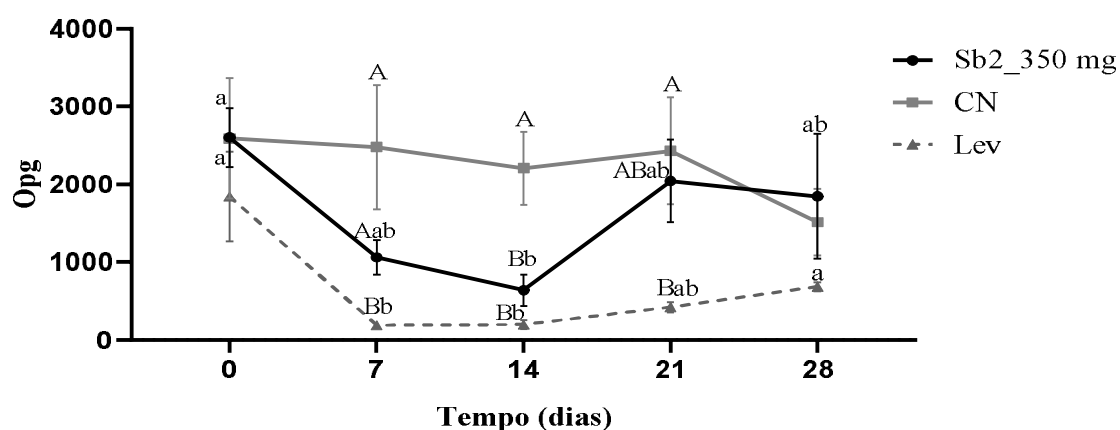
#### A3.4 - Opg e FECRT do primeiro estudo com extrato bruto de *S. berteroana* em cabras

Alguns valores não atenderam aos critérios de normalidade (teste de Shapiro-Wilk,  $P < 0,05$ ), o que exigiu uma transformação de  $\log(Y = \log(Y))$  para facilitar a comparação das

médias por ANOVA com o teste de Tukey. Inicialmente, observou-se que todas as cabras apresentavam níveis comparáveis de opg. Uma semana após a administração dos tratamentos observou-se que o número de ovos por grama de fezes (opg) das cabras tratadas com Sb2\_350 apresentou um leve declínio, embora não estatisticamente significativo em comparação com os opg das cabras do grupo de controle negativo. No entanto, os opg das cabras do grupo do levamisol apresentou uma redução estatisticamente significativa em comparação com os opg das cabras do grupo de controle negativo e das cabras tratadas com Sb2\_350. Além disso, no dia 7, a eficácia anti-helmíntica do Sb2\_350 foi de 57,14%, enquanto o levamisol demonstrou uma eficácia de 92,35%. No 14º dia, foi observada uma redução significativa nos opg das cabras tratadas com Sb2\_350 em comparação com os opg das cabras do grupo de controle negativo. Uma tendência semelhante foi observada nos opg das cabras tratadas com levamisol (Gráfico 5).

Os opg das cabras tratadas com Sb2\_350 e levamisol foram estatisticamente semelhantes. Conseqüentemente, o FECRT no dia 14 foi de 71,04% e 91,02%, respectivamente, para o Sb2\_350 e o levamisol. No dia 21, os opg das cabras do grupo Sb2\_350 foram estatisticamente semelhantes aos opg das cabras do grupo de controle negativo e significativamente maiores do que os do grupo com levamisol (eficácias de 15,88% e 82,65% para Sb2 e levamisol, respectivamente). Na última semana (dia 28), os opg de todos os grupos tornaram-se estatisticamente semelhantes. O Gráfico 5 mostra as comparações de opg em cada semana entre os tratamentos e entre as semanas em cada tratamento.

Gráfico 5 - Ovos por grama de fezes (média e erro padrão) de nematoides gastrointestinais de cabras tratadas com extrato de *Simarouba berteroana* da 2ª coleta (junho 2021) durante 28 dias



Fonte: Autor (setembro, 2024).

Legenda: Sb2\_350: Sb2 a 350 mg/kg; NC: controle negativo (água destilada) e Lev: levamisol como controle positivo. Letras maiúsculas comparam a média entre diferentes grupos em um único momento; letras minúsculas comparam a média de diferentes momentos em um único grupo. Letras diferentes indicam

diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ).

### A3.5 - Gêneros de larvas de terceiro estágio recuperados de coproculturas de cabras do segundo experimento *in vivo*

Antes da administração dos tratamentos, as coproculturas demonstraram uma prevalência de gêneros semelhantes à observada no estudo inicial. *Haemonchus* sp. foi o mais prevalente (75,7 - 82,8%), seguido por *Trichostrongylus* sp. (16,9 - 22,4%) e uma prevalência mínima de *Oesophagostomum* sp. (0,3 - 2,1%). No 14º dia da coprocultura a prevalência de *Haemonchus* foi significativamente reduzida, atingindo um nível ligeiramente acima de 50% (51,1 - 52,8%). Por outro lado, a prevalência de *Trichostrongylus* aumentou para um nível próximo a 50% em ambos os grupos de cabras tratadas com Sb2\_350 e naquelas tratadas com levamisol. Notavelmente, a prevalência de *Oesophagostomum* chegou a 0%. No grupo de controle negativo, a prevalência de *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum* permaneceu consistente em relação aos achados iniciais. No 28º dia as prevalências haviam retornado a um estado semelhante ao observado no início do experimento (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de nematoides gastrintestinais (média e desvio padrão) recuperados em coproculturas de cabras tratadas com extrato bruto de *Simarouba berteriana* da 2ª coleta (junho 2021) por 28 dias

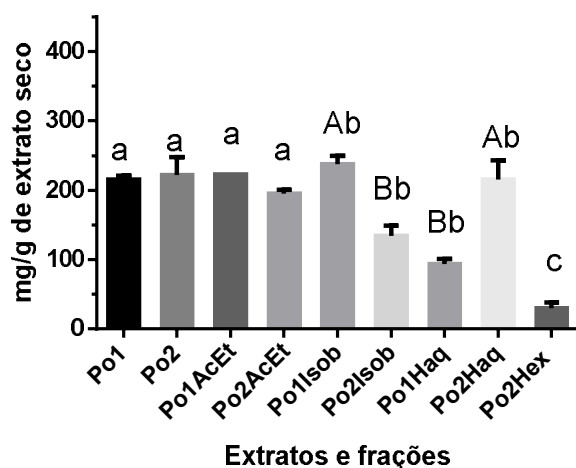
Tratamentos	Generos de L3	% de L3		
		Dia 0	Dia 14	Dia 28
Sb2_350	<i>Haemonchus</i> sp.	75,69 (2,45)	52,81 (9,01)	74,81 (2,07)
	<i>Trichostrongylus</i> sp.	22,23 (3,33)	47,19 (9,01)	22,90 (1,71)
	<i>Oesophagostomum</i> sp.	2,09 (2,01)	0,0	2,66 (1,53)
Água destilada	<i>Haemonchus</i> sp.	82,82 (8,02)	75,74 (2,25)	78,80 (3,06)
	<i>Trichostrongylus</i> sp.	16,89 (8,33)	23,75 (2,0)	19,98 (3,29)
	<i>Oesophagostomum</i> sp.	0,29 (0,39)	0,51 (0,62)	1,22 (0,62)
Levamisol	<i>Haemonchus</i> sp.	78,38 (5,22)	51,11 (8,62)	70,39 (6,33)
	<i>Trichostrongylus</i> sp.	20,40 (4,48)	48,89 (8,62)	28,58 (6,68)
	<i>Oesophagostomum</i> sp.	1,22 (0,87)	0,0	1,03 (1,52)

Fonte: Autor (setembro, 2024).

Legenda: Sb2\_350: extrato bruto de *Simarouba berteriana* (2ª coleta), administrado a 350 mg/kg. L3: larvas de terceiro estágio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) entre os dias (linhas) e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos (colunas) com relação aos gêneros de nematoides.

## APÊNDICE B – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E FLAVONOIDES TOTAIS DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *PIMENTA RACEMOSA* VAR. *OZUA*

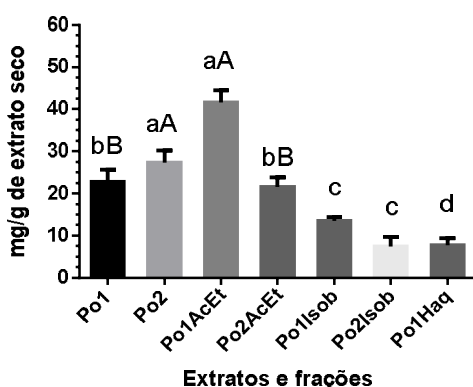
Gráfico 6 - Teor de taninos totais (média e desvio padrão) de extratos de *Pimenta racemosa* var. *ozua* das coletas de março de 2020 e julho de 2021 expressados em mg de equivalentes de ácido tânico/g de extrato.



Fonte: Autor (março, 2024).

Legenda: Po1 e Po2, extratos brutos de *P. racemosa* var. *ozua* da 1ª coleta (março de 2020) e 2ª coleta (julho de 2021), respectivamente; Po2Hex, Po1AcEt, Po2AcEt, Po1Isob, Po2Isob, Po1Haq, Po2Haq: frações de hexano, acetato de etila, isobutanol e hidroalcoólico obtidas de *P. racemosa* var. *ozua* da 1ª e da 2ª coleta, respectivamente. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre extratos e frações da mesma coleta, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre extratos e frações de coletas diferentes.

Gráfico 7 - Teor de flavonoides (média e desvio padrão) de extratos de *Pimenta racemosa* var. *ozua* das coletas de março 2020 e julho 2021, expressados em mg de equivalentes de quercetina /g de extrato.

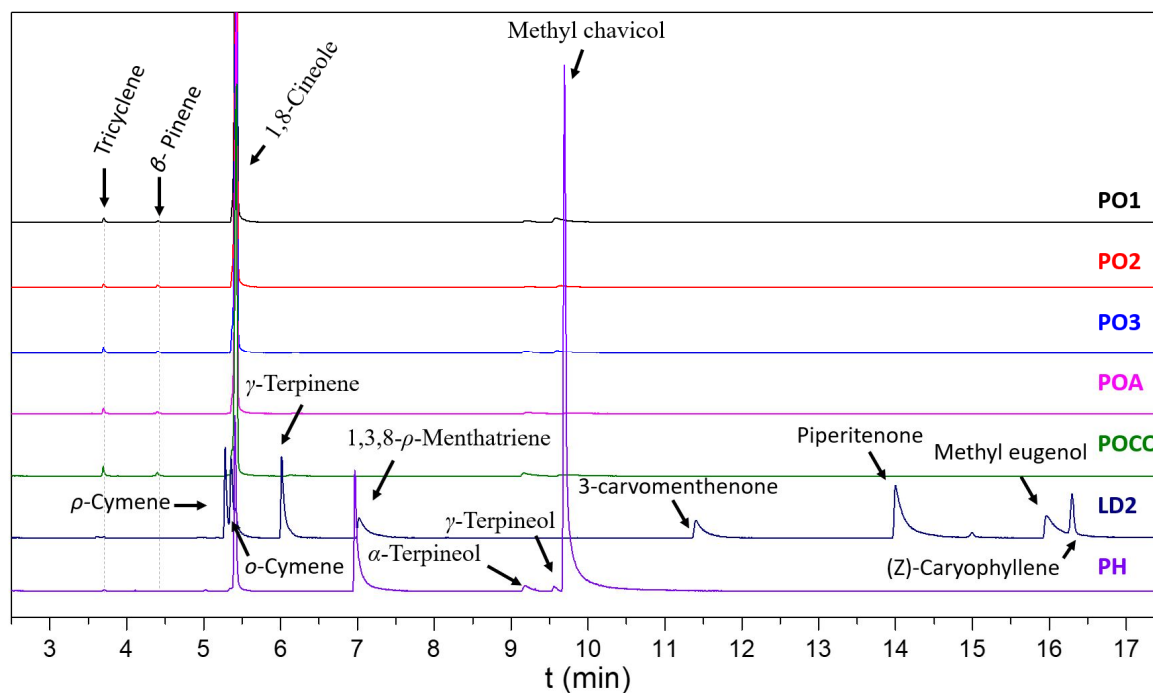


Fonte: Autor (março, 2024).

Legenda: Po1 e Po2: Extratos brutos de *Pimenta racemosa* var. *ozua* da 1ª coleta (março de 2020) e 2ª coleta (julho de 2021), respectivamente; Po1AcEt, Po2AcEt, Po1Isob, Po2Isob, Po1Haq, frações de acetato de etila, isobutanol e hidroalcoólico obtidas de *P. r.* var. *ozua* da 1ª e da 2ª coleta, respectivamente. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre extrato e frações da mesma coleta e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre extratos brutos de coletas diferentes.

**APÊNDICE C – RESULTADO DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. RACEMOSA* VAR. *OZUA*, *P. HAITIENSIS* E *L. DOMINGUENSIS* (2ª COLETA)**

Gráfico 8 - Cromatogramas de CG-MS das amostras de óleos essenciais.



Fonte: Pinho Ribeiro, Melo e Silva (2023).

Legenda: LD2: *Lippia dominguensis* 2ª coleta; PO1: *Pimenta racemosa* var. *ozua* coletada em março de 2020 em Santiago Rodríguez; PO2: *Pimenta racemosa* var. *ozua* coletada em julho de 2021 em Santiago Rodríguez; PO3: *P. racemosa* var. *ozua* coletada em dezembro de 2022 em Santiago Rodríguez; POA: *P. racemosa* var. *ozua* coletada por terceiro e obtido de forma artesanal 2022 em Santiago Rodríguez. POCO: *P. racemosa* var. *ozua* coletada em Cotuí, em dezembro de 2022; PH: *Pimenta haitiensis* coletada em fevereiro 2020 em Pedernales.

Tabela 4 - Perfil químico de amostras de óleos essenciais de várias plantas obtidos por CG-EM

	Compostos	Rep	TR	m/z	IR <sub>cal</sub>	IR <sub>lit</sub>	Compostos (%)						
							PO1	PO2	PO3	POA	POCO	LD2	PH
1	Triciclono	a,b, c	3,696	93,1	920	921	0,7	0,6	1,0	1,0	1,9	0,6	-
2	Pinene <β->	a,b, c	4,396	93,1	973	974	0,4	0,5	0,4	0,5	1,0		
3	Cimeno <ρ->	a,b, c	5,286	119,1	1026	1020						8,6	
4	Cimeno <o->	a,b, c	5,362	119,1	1029	1022						13,4	
5	Cineol <1,8->	a,b, c	5,426	43,1	1032	1031	93,7	95,4	94,1	95,8	90,4		13,9
6	Terpineno <γ->	a,b, c	6,018	119,1	1061	1054						12,5	
7	Mentatrieno <1,3,8-ρ->	a,b, c	7,048	93,09	1108	1108						9,1	17,7
8	Terpineol <α->	a,b, c	9,186	44	1186	1186	1,3	0,9	1,4	1,4	3,4		
9	Terpineol <γ->	a,b, c	9,555	91,06	1199	1199	3,8	2,5	2,9	1,2	3,1		
10	Metil chavicol (estragol)	a,b, c	9,695	148,1	1204	1195							66,3
11	3-Carvomentenona	a,b, c	11,432	82,07	1258	1249						8,7	
12	Piperitenona	a,c	14,021	150,1	1337	1340						24,5	
13	Metil eugenol	a,b, c	16	178,11	1396	1403						11,9	
14	Cariofileno <(Z)->	b,c	16,299	91,08	1405	1408						8,6	
							99,9	99,9	99,8	99,9	99,8	97,9	97,9

Fonte: Adaptado de Pinho Ribeiro, Melo e Silva (2023).

Legenda: TR - Tempo de retenção (min); IR cal - Índice de retenção calculado através de n-alcanos homólogos (C8 - C18). a - Biblioteca NIST (versão 2.0 de 2008); b - Comparação espectral com a biblioteca Adams (2017); c - Pesquisa na literatura ((Compadre; Robbins; Kinghorn, 1986; dos Santos *et al.*, 2019).

**APÊNDICE D – RESULTADO DO TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS DE EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS DA *PIMENTA RACEMOSA* VAR. *OZUA***

Os resultados da inibição da eclosão larvar de extratos e frações da *P. racemosa* var. *ozua* da 1ª coleta foram analisados através do ANOVA, já os dados da 2ª coleta foram analisados por Kruskal Wallis. A comparação estatística de dados do teste de da inibição da eclosão de ovos com óleos essências da Ozua também foram também analisados por ANOVA, e a determinação da concentração inibitória de 50% e 90% de cada derivado vegetal da Ozua foi determinado usando o software IBM® SPSS® Statistic versão 22 (tabelas 5).

Tabla 5 - Concentração efetiva (média e desvio padrão) de extratos, frações e óleos essenciais de *Pimenta racemosa* var. *ozua* para inibir 50 e 90% a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*

Ano de colecta	Derivado vegetal	IC <sub>50</sub> mg/mL	IC <sub>90</sub> mg/mL
<b>2020</b>	Bruto	7,584 (6,08 – 9,43)	13,407 (11,137 – 17,859)
	FrHex	27,164 (17,69 – 75,96)	64,633 (41,11 – 233,20)
	FrAcEt	1,695 (1,277 – 2,367)	2,461 (1,978 – 4,390)
	FrIsob	13,751 (12,535 – 15,210)	24,382 (22,108 – 27,371)
	FrHaq	25,988 (18,392 – 48,349)	54,946 (38,216 – 117,788)
	Óleo Es	0,617 (0,332 – 0,828)	1,22 (0,970 - 1,954)
<b>2021</b>	Bruto	1,151 (1,075 – 1,23)	1,867 (1,75 – 2,013)
	FrHex	0,626	1,137
	FrAcEt	2,28 (1,65 – 3,07)	3,562 (2,85 – 5,56)
	FrIsob	4,406 (2,94 – 7,78)	7,456 (5,37 – 15,74)
	FrHaq	16,295 (13,98 – 19,98)	31,607 (26,33 – 40,61)
	Óleo Es	0,804 (0,536 – 1,068)	1,398 (1,120 – 2,057)
<b>2022</b>	Óleo Es DDSR	1,384 (0,863 – 1,899)	2,986 (2,358 – 4,369)
	Óleo Es DDCo	1,145 (1,075 – 1,216)	1,749 (1,647 – 1,907)

Fonte: Autor (atualizado em março de 2024).

Legenda: Os extratos brutos foram obtidos por maceração/percolação das folhas da planta com etanol 95% como solvente. IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>: concentração necessária para inibir 50% e 90% a eclosão de ovos, respectivamente; FrHex: fração de hexano; FrAcEt: fração de acetato de etila; FrIsob: fração de isobutanol; FrHaq: Fração residual ou hidroalcoólica; Óleo Es: óleo essencial; DDSR: óleo essencial obtido por destilação artesanal em Santiago Rodríguez; DDCo: óleo essencial obtido por destilação artesanal em Cotuí.



## APÊNDICE E – RESULTADO DO TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS DE DERIVADOS VEGETAIS DE *LIPPIA DOMINGUENSIS*, *CROTON CORONATUS*, *C. POITAIE* E *PIMENTA HAITIENSIS*

### E.1 RESULTADOS DO TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS DO EXTRATO BRUTO E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA DOMINGUENSIS*

Os valores dos resultados da inibição de 50% e 90% da eclosão de ovos de *H. contortus* com os óleos essenciais de *L. dominguensis* apresentam-se na tabela 6.

Tabela 6 - Concentração efetiva (média e desvio padrão) de extratos e óleos essenciais de *Lippia dominguensis* para inibir 50 e 90% a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus* Kokstad

Planta (ano de colecta)	Derivado vegetal	IC <sub>50</sub> mg/mL	IC <sub>90</sub> mg/mL
<i>Lippia dominguensis</i> (2020) (Ld1)	Bruto	4,36 (3,373 – 5,486)	6,723 (5,573 – 9,274)
	Óleo Es	0,783 (0,556 – 1,032)	1,445 (1,160 – 2,099)
<i>L. dominguensis</i> (2021) (Ld2)	Óleo Es	0,313 (0,168 – 0,475)	0,613 (0,458 – 1,079)

Fonte: Autor (setembro, 2023). O extrato bruto foi obtido por maceração/percolação com etanol 95% como solvente.

Legenda: IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>: concentração necessária para inibir 50% e 90% a eclosão de ovos, respectivamente; Óleo Es: óleo essencial. Ld1: Planta de *L. dominguensis* coletada em 2020 e Ld2: planta de *L. dominguensis* coletada em 2021.

### E.2 RESULTADO DO TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS DE EXTRATOS DE *CROTON CORONATUS* E *CROTON POITAIE*

Os valores dos resultados da inibição de 50% e 90% da eclosão de ovos de *H. contortus* com os extratos brutos de *Croton poitaie* e *C. coronatus* apresentam-se na tabela 7.

Tabela 7 - Concentração efetiva (e intercalo de confiança de 95%) de extratos de espécies de *Croton* para inibir 50 e 90% (IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>) a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus* Kokstad

Planta (ano de colecta)	Derivado vegetal	IC <sub>50</sub> mg/mL	IC <sub>90</sub> mg/mL
<i>Croton coronatus</i> (2020)	Bruto	12,380 (10,533 – 15,139)	21,344 (17,826 – 28,169)
<i>Croton poitaie</i> (2020)	Bruto	7,009 (5,832 – 8,214)	11,112 (9,63 – 13,982)

Fonte: Do autor (atualizado em março de 2024). Os extratos brutos foram obtidos por maceração/percolação com etanol

95% como solvente.

### E.3 - RESULTADO DO TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *PIMENTA HAITIENSIS*

Os valores dos resultados do teste de inibição da eclosão de ovos do óleo essencial da

planta *P. haitiensis* (Canelilla) e os valores das concentrações inibitórias de 50% e 90% apresentam-se na tabela 8.

Tabela 8 – Porcentagens de inibição da eclosão de ovos (media  $\pm$  desvio padrão) e concentração efetiva do óleo essencial de *Pimenta haitiensis* para inibir 50 e 90% da eclosão de ovos (e intercalo de confiança 95%).

Concentração (mg/mL)	Media $\pm$ DP
<b>1</b>	100,0 $\pm$ 0,0 <sup>A</sup>
<b>0,75</b>	100,0 $\pm$ 0,0 <sup>A</sup>
<b>0,5</b>	97,38 $\pm$ 2,49 <sup>A</sup>
<b>0,375</b>	63,05 $\pm$ 7,09 <sup>B</sup>
<b>0,25</b>	38,51 $\pm$ 5,59 <sup>C</sup>
<b>0,125</b>	13,78 $\pm$ 6,14 <sup>D</sup>
<b>Tween 80 (1,5%)</b>	1,69 $\pm$ 1,52 <sup>E</sup>
<b>Tiabendazol (0,1)</b>	96,60 $\pm$ 3,71 <sup>A</sup>
<b>IC<sub>50</sub></b>	0,294 (0,24 – 0,35)
<b>IC<sub>90</sub></b>	0,473 (0,41 – 0,62)

Fonte: Autor (atualizado em outubro de 2024). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $P < 0.05$ ). IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>: concentração efetiva para inibir 50 e 90% e eclosão de ovos, respectivamente.

## APÊNDICE G - RESULTADO DOS TESTES DE TOXICIDADE ORAL AGUDA DE EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS

### G1 - TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA DOMINGUENSIS* (2ª COLETA)

Realizou-se também a avaliação da toxicidade oral aguda do óleo essencial de *L. dominguensis* da 2ª coleta (Ld2), sendo esta desenvolvida pelo princípio de teste principal segundo a OECD 425 (2022) com um valor signa de 0,4 para definição das concentrações testadas. Desta forma, iniciou-se com a administração de 175 mg/kg num camundongo de 21 g. Como não apresentou mortes nem sinais de toxicidade, escolheu-se outro camundongo e foi dosificado com 440 mg/kg e mortes ou sinais de toxicidade não foram observados. O terceiro animal ao ser dosificado com 1.100 mg/kg apresentou sinais leves de hiperatividade, pilo-ereção e leve dor. Um quarto animal foi tratado com 2.000 mg/kg e morreu dentro das primeiras 24 horas. Posteriormente, um 5º animal foi tratado com 1.100 mg/kg sem observações de mortes e/ou sinais importantes de toxicidade. Posteriormente um 6º animal foi tratado com 2.000 mg/kg e morreu igualmente ao primeiro animal que recebeu esta dose, assim, foi-se necessário tratar um 7º animal com 1.100 mg/kg, que não morreu. Finalmente, um 8º camundongo recebeu 2.000 mg/kg, morrendo. O teste foi finalizado mostrando que a DL<sub>50</sub> do óleo essencial da Ld2 é superior a 1.100 mg/kg e inferior a 2.000 mg/kg.

### G2 - TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO BRUTO DE *SIMAROUBA BERTEROANA* (2ª COLETA)

A avaliação de toxicidade do extrato bruto de *S. berteroana* da 2ª coleta foi realizada de acordo com o teste principal da OECD 425, ação semelhante ao que foi feito com o óleo essencial de *L. dominguensis* (2ª coleta). Iniciou-se com um camundongo que recebeu 440 mg/kg e, como este animal não morreu nas primeiras 48 horas, outro camundongo foi utilizado recebendo a dose de 1.100 mg/kg. Este animal apresentou alguns sinais de desconforto, como postura encurvada e letargo após 4 horas da administração do extrato e posteriormente seu quatro foi-se normalizando. Após 48h outro camundongo foi medicado com 2.000 mg/kg, o qual apresentou os mesmos sinais clínicos que o segundo, entretanto morreu em 24 horas. Outro camundongo de 22 gramas foi escolhido e da mesma forma que os anteriores, recebeu 1.100 mg/kg do extrato por sonda oro-gástrica. Após 4-8 horas apresentou os leves sinais clínicos já descritos, porém não morreu em 48h. Um quinto animal foi adicionado ao estudo e medicado com 2.000 mg/kg e morreu entre 24 e 48 horas. Finalmente, um sexto camundongo

recebeu 1.100 mg/kg do extrato e, como este não morreu, foi determinado que a DL<sub>50</sub> do extrato bruto de *S. berteriana* da 2ª coleta está entre 1.100 mg/kg e 2.000 mg/kg.

### G3 - TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO BRUTO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *PIMENTA RACEMOSA* VAR. *OZUA* DA 2ª COLETA

Devido ao fato de que o extrato bruto e o óleo essencial da 2ª coleta de Ozua foram avaliados da mesma forma e apresentaram os mesmos resultados, serão descritos de forma conjunta. O teste realizado foi o teste limite da OECD 425. Iniciaram-se os testes com camundongos jovens de 22 – 24 gramas, recebendo 440 mg/kg de cada derivado vegetal via oral (sonda ora-gástrica) e como não foram observadas mortes nem sinais de toxicidade, após 48h foram utilizados outros camundongos para administrar 1.100 mg/kg. Posteriormente, também não foram observadas mortes nem sinais de toxicidade, porém, um leve desconforto, e letargia foi observado no camundongo que recebeu o óleo essencial de Ozua. Outros camundongos receberam 2.000 mg/kg de cada fitogênico de Ozua, e após 8h somente foram observados somente sinais de letargia e desconforto, principalmente com o óleo essencial, e posteriormente seu quadro foi-se normalizando após 24h. Transcorridas 48h, como descrito no teste, outro camundongo recebeu 2.000 mg/kg de cada fitogênico e estes não mostraram diferenças dos camundongos anteriores e não morreram. Finalmente, outro camundongo recebeu 2.000 mg/kg do extrato e do óleo essencial de Ozua, sem apresentar mortes. Todos os camundongos permaneceram vivos e sem alterações comportamentais posteriores às 24h da administração dos fitogênicos. Desta forma, foi determinado que a DL<sub>50</sub> do extrato bruto e do óleo essencial de *P. racemosa* var. *ozua* (2ª coleta) resultou superior a 2.000 mg/kg, indicando que são fitogênicos seguros e pouco tóxicos.

### G4 – TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *PIMENTA HAITIENSIS*

A avaliação de toxicidade do óleo essencial de *P. haitiensis* foi realizada segundo o teste principal da OECD 425 de maneira similar a maioria dos testes de toxicidade aguda deste projeto. Iniciou-se com um camundongo que recebeu 440 mg/kg e este camundongo morreu no lapso de 36h. Posteriormente, um segundo camundongo foi tratado com 175 mg/kg, e este não morreu nas primeiras 48h, nem apresentou sinais de toxicidade. Outro camundongo foi utilizado recebendo a dose de 440 mg/kg e também não morreu em 48h; em consequência, um terceiro camundongo foi tratado com 1.100 mg/kg. Este animal foi observado com alguns sinais de desconforto, como postura encurvada e letargo após 4h da administração do óleo, entretanto,

não morreu apresentou melhora. Após 48h, outro camundongo foi medicado com 2.000 mg/kg, o qual apresentou os mesmos sinais clínicos e morreu antes de 24h. Outro camundongo (número 5) foi tratado com 1.100 mg/kg por sonda oro-gástrica com o óleo essencial. Após 4-8h apresentou os leves sinais clínicos descritos e não morreu. Após mais 48h, mais um sexto animal foi medicado com 2.000 mg/kg e morreu também antes das 24h. Finalmente, um sétimo camundongo recebeu 1.100 mg/kg do óleo da Canelilla e, como este não morreu, foi determinado que a  $DL_{50}$  do óleo essencial de *P. haitiensis* estava entre 1.100 mg/kg e 2.000 mg/kg.

## ANEXOS

**ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE USO DE ANIMAIS PARA  
EXPERIMENTOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DA COMISSÃO DE ÉTICA NO  
USO DE ANIMAIS - CEUA/UNIFAL-MG**

**I.1 - CERTIFICADO I DE APROVAÇÃO DE USO DE CAMUNDONGOS DA  
CEUA/UNIFAL-MG**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

## Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação de extratos bioativos e óleos essenciais de plantas endêmicas da República Dominicana no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes**, registrada com o nº **0051/2021**, sob a responsabilidade de **Marcos José Marques**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **07/02/2022 a 25/04/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / Swiss	72	72	0	Centro de bioterismo da unifal-mg

Alfenas, 29 de Outubro de 2024

**Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira**  
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/spp/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: c8cd6b746486ae981bac9f76d669702

I.2 - CERTIFICADO II DE APROVAÇÃO DE USO DE CAMUNGONDOS DA  
CEUA/UNIFAL-MG

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

## Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação de extratos bioativos e óleos essenciais de plantas endêmicas da República Dominicana no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Parte II**, registrada com o nº **0052/2021**, sob a responsabilidade de **Marcos José Marques**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **18/10/2021 a 15/10/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / Swiss	96	0	96	Centro de bioterismo da unifal-mg

Alfenas, 08 de Dezembro de 2021

**Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira**  
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 77861bd26d1b65c4ea4a2ddf8ae56c8

## I.3 - CERTIFICADO III DE APROVAÇÃO DE USO DE OVINOS DA CEUA/UNIFAL-MG

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

## Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação de extratos bioativos e óleos essenciais de plantas endêmicas da República Dominicana no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Parte III**, registrada com o nº **0053/2021**, sob a responsabilidade de **Marcos José Marques**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **14/02/2022 a 25/04/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/inhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Ovino / Raça mestiça - santa inês	2	1	1	Fazenda do criador - paraguaçu

Alfenas, 29 de Outubro de 2024

**Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira**  
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 45b153373a3d1b5ba6c70ba676ccde3