



**UDRUŽENJE VETERINARA
PRAKTIČARA SRBIJE**



**DEPARTMAN ZA VETERINARSKU
MEDICINU-POLJOPRIVREDNI
FAKULTET NOVI SAD**

ZDRAVSTVENA ZAŠTITA I REPRODUKCIJA ŽIVOTINJA

ZBORNİK RADOVA

Novi Sad, Online Webinar, 17-23.10.2020.godine



**Održavanje skupa podržao je
Pokrajinski sekretarijat za visoko
obrazovanje i naučno-istraživačku
delatnost AP Vojvodine**

ZDRAVSTVENA ZAŠTITA I REPRODUKCIJA ŽIVOTINJA-ZBORNİK RADOVA

Datum održavanja:

17-23.10.2020.

Organizatori:

Udruženje veterinara praktičara Srbije i Departman za veterinarsku medicinu Novi Sad

Izdavač:

Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Za izdavača:

Prof.dr Nedeljko Tica, dekan

Urednik zbornika:

Prof.dr Marko Cincović

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

636.082.4(082)

636:619(082)

ZBORNİK [sa skupa] "Zdravstvena zaštita i reprodukcija životinja" : 17-23.10.2020. /
[urednik Marko Cincović]. - Novi Sad : Poljoprivredni fakultet, 2020 (Beograd : Donatgraf). -
173 str. : ilustr. ; 25 cm

Tiraž 500. - Bibliografija uz svaki rad. - Rezime na engl. jeziku uz svaki rad.

ISBN 978-86-7520-490-9

а) Домаће животиње - Здравствена заштита - Зборници б) Домаће животиње -
Репродукција - Зборници

COBISS.SR-ID 20563721

PROGRAMSKI ODBOR

Prof.dr Marko Cincović, predsednik

Prof.dr Branislava Belić, Prof.dr Nikolina Novakov, Prof.dr Romeo Teodor Cristina, prof.dr Radojica Đoković, Prof.dr Jože Starič, Prof.dr Dragica Stojanović, Prof.dr Bojan Toholj, Prof.dr Ramiz Ćutuk, Doc.dr Jožica Ježek, Prof.dr Aleksandar Potkonjak, Prof.dr Marko Pećin, Doc.dr Andrija Musulin, Doc.dr Mihajlo Erdeljan, Prof.dr Nada Plavša, Prof.dr Božidar Savić, Prof.dr Ivan Stančić, Prof.dr Ivana Davidov, Prof.dr Plamen Trojačanec, Prof.dr Miodrag Radinović, prof.dr Mario Kreszinger, Doc.dr Ognjen Stevančević, Doc.dr Nenad Stojanac, Prof.dr Zdenko Kanački, Prof.dr Slobodan Stojanović, Doc.dr Marija Pajić, Doc.dr Stanislav Simin, Doc.dr Zorana Kovačević.

ORGANIZACIONI ODBOR

Dr vet.med.spec. Bojan Blond, predsednik

dr sc. Mira Majkić, dr vet. med. Miloš Jovičić, dr vet. med. spec. Vladimir Ćitaković, dr vet. med. Saša Marković, dr vet. med. Zoran Knežević, dr vet. med. Goran Đmura, dr vet. med. spec. Ivan Jeremić, dr vet. med spec. Marko Katić.



HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA I JEDINJENJA SA ANTIHELMINTIČKIM POTENCIJALOM

Filip Štrbac^{1*}, Dragica Stojanović¹, Radomir Ratajac²

¹Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

²Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad

*Autor za kontakt: strbac.filip@gmail.com

Sažetak

Neracionalna upotreba komercijalnih antihelmintika je dovela do razvoja antihelmintičke rezistencije kod mnogih vrsta endoparazita domaćih životinja. Zbog toga se intenzivno istražuju potencijalne alternative, među kojima često i etarska ulja različitih biljaka. Etarska ulja predstavljaju sekundarne metabolite biljaka sa veoma složenim hemijskim sastavom koji najčešće obuhvata veliki broj jedinjenja različitih hemijskih grupa. Najčešće su u pitanju različita terpeniska, terpenoidna ili fenilpropanoidna jedinjenja od kojih je veliki broj i identifikovan, pri čemu je važno napomenuti da hemijski sastav etarskih ulja može da varira u zavisnosti od mnogo endogenih i egzogenih faktora. Poznata su mnogobrojna lekovita svojstva etarskih ulja, među kojima i antimikrobno, antiinflamatorno, antioksidativno dejstvo, zbog čega su ovi biljni proizvodi svoju primenu našli u terapiji mnogobrojnih oboljenja. U različitim *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima je kod mnogih etarskih ulja dokazan i antihelmintički potencijal, a koji potiče od različitih jedinjenja koja ulaze u njihov sastav. Među ovim sastojcima se posebno ističu karvakrol, timol, anetol, cinamaldehyd, karvon, limonen, pinen, terpinen, kariofilen, cimen, linalool, geraniol, mentol, borneol, citral, kamfor, eukaliptol, eugenol i mnogi drugi. Njihov izolovani antihelmintički potencijal je takođe potvrđen u mnogim istraživanjima, a ispitane su i njihove različite sinergističke kombinacije. Prisustvo velikog broja jedinjenja sa različitim mehanizmom delovanja pored efikasnosti govori u prilog i manjoj mogućnosti razvoja rezistencije kod samih parazita, a s obzirom da su u pitanju prirodni preparati, i manjoj toksičnosti za životinje u poređenju sa sintetskim preparatima. Zbog toga etarska ulja i njihovi sastojci predstavljaju obećavajuću alternativu u rešenju problema antihelmintičke rezistencije.

Ključne reči: etarska ulja, jedinjenja, antihelmintici, efikasnost, rezistencija

Abstract

The irrational use of commercial anthelmintics has led to the development of anthelmintic resistance in many species of domestic animals endoparasites. Therefore, potential alternatives, such as the essential oils of various plants, are being intensively explored. Essential oils are secondary metabolites of plants with a very complex chemical composition that usually includes a large number of compounds of different chemical groups. These are usually various terpene, terpenoid or phenylpropanoid compounds, many of which have been identified, whereby it is important to note that the chemical composition of essential oils can vary depending on many endogenous and exogenous factors. There are numerous documented medicinal attributes of essential oils, including antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant effects, which is why these herbal products have found their application in the treatment of many diseases. In various *in vitro* and *in vivo* examinations, essential oils have been shown to have anthelmintic potential, which originates from various compounds that are part of their chemical composition. Among these ingredients, carvacrol, thymol, anethole, cinnamaldehyde, limonene, pinene, terpinene, caryophyllene, cymene, linalool, geraniol, menthol, borneol, citral, camphor, eucalyptol, eugenol and many others stand out. Their isolated anthelmintic potential has also been confirmed in many studies, and their various synergistic combinations have been investigated. In addition to an increase in efficiency, the presence of a large number of compounds with different mechanisms of action can contribute also to less possibility of the development of resistant helminth strains. Also, the natural origin

of essential oils can contribute to their less toxicity to animals compared to synthetic preparations. Therefore, it can be concluded that essential oils and their ingredients represent a promising alternative in combating anthelmintic resistance.

Keywords: essential oils, compounds, anthelmintics, efficiency, resistance

Uvod

Antihelmintička rezistencija kod helminata domaćih životinja se javila kao posledica neracionalne primene komercijalnih preparata u smislu preučestalih tretmana, hiperdoziranja ili subdoziranja lekova koji se koriste u praksi. To je dovelo do smanjene efikasnosti lekova iz grupa benzimidazola, makrocikličnih laktona i imidazotiazola i velikih ekonomskih gubitaka prouzrokovanih različitim helmintima (1,2,3). Zbog toga se danas aktivno traga za novim aktivnim principima, među kojima se sve više ispituju različiti prirodni preparati biljnog porekla kao što su etarska ulja (4,5).

Etarska (esencijalna) ulja predstavljaju kompleksnu mešavinu različitih organskih supstanci čija uloga u samim biljkama još uvek nije dovoljno razjašnjena (6,7). Kao sekundarni metaboliti biljaka jakog i karakterističnog mirisa, etarska ulja se smatraju nekom vrstom biljnih hormona ili tečnom manifestacijom imunog sistema biljaka čija je uloga je prevashodno zaštita od različitih štetoina i predatora, dok sa druge strane privlače različite vrste insekata i ptica kao oprašivače (6). Ove isparljive supstance se sintetišu u različitim delovima biljaka, najčešće u listovima i cvetovima, ali i u rizomima, semenima, plodovima, korenu i stablu (8). Zbog svojih osobina, etarska ulja se koriste u kozmetičkoj industriji, industriji hrane, ali i za terapiju različitih oboljenja što je poznato kao aromaterapija (2,8).

U dosadašnjim istraživanjima su dokazana brojna lekovita svojstva različitih etarskih ulja kao što antimikrobno, antiinflamatorno, antioksidativno i mnoga druga dejstva (8,9). U pojedinim ispitivanjima je dokazan i antihelmintički efekat pojedinih etarskih ulja protiv različitih helminata od značaja za veterinarsku medicinu. Pri svemu tome je važno napomenuti da je za navedena svojstva etarskih ulja zaslužan njihov bogat hemijski sastav. Zbog toga je cilj ovog rada prikaz hemijskog sastava etarskih ulja i ukazivanje na značaj pojedinih sastojaka sa antihelmintičkim potencijalom, što je bitno kako za razumevanje mehanizma dejstva etarskih ulja, tako i za njihovu selekciju za buduća antihelmintička i druga ispitivanja.

Hemijski sastav etarskih ulja i faktori koji na njega utiču

Hemijski sastav etarskih ulja je izuzetno složen s obzirom na veliki broj jedinjenja koja pripadaju različitim hemijskim grupama. Zbog toga je i teško napraviti tačnu klasifikaciju sastojaka etarskih ulja, kao i njihovu generalnu podelu. Prema Butnariu i Sarac (2018), etarska ulja zapravo predstavljaju kompleksnu mešavinu velikog broja sastojaka čiji broj je različit, ali u pojedinim slučajevima može da se kreće i do nekoliko stotina. Među njima dominiraju monoterpeni i seskviterpeni, ali takođe sadrže i aromatična jedinjenja, među kojima najčešće derivate fenilpropena (6). Slično tvrde i Fokou i sar. (2020), koji navode da su terpenoidna i fenilpropanoidna jedinjenja glavne komponente etarskih ulja (7). Morsy (2016) deli sastojke etarskih ulja u četiri glavne grupe: 1. terpeni (osnovu predstavljaju izoprenske jedinice); 2. jedinjenja ravnog lanca koja ne sadrže nijedan bočni lanac; 3. fenilpropanoidi (derivati benzena) i 4. ostala jedinjenja koja se ne mogu svrstati ni u jednu od prethodne tri (npr. jedinjenja koja sadrže sulfurne i azotne grupe). Isti autori dalje deli same terpene na ugljovodonične terpene i njihove oksigenisane derivate koji zapravo predstavljaju terpenoide i mogu se dalje podeliti na alkohole, fenole, aldehide, ketone, estre, etre i epokside (10). Sa ovakvom podelom terpenkih jedinjenja se slažu i Butnariu i Sarac (2018) (6).

Da ne bi došlo do zabune, potrebno je napraviti razliku između terpena i terpenoida. Terpeni predstavljaju ugljovodonike koji nastaju kombinacijom nekoliko izoprenskih jedinica, na osnovu čijeg broja se mogu dalje klasifikovati. Pri tome, kombinacija od dve izoprenske jedinice čini osnovnu jedinicu

terpena, pa tako pomenuti monoterpeni sadrže dve, dok seskviterpeni sadrže tri izoprenske jedinice (10). Sa druge strane, terpenoidi zapravo predstavljaju terpene kod kojih su metil grupe uklonjene ili pomerene, ili su dodati atomi kiseonika pa se kao rezultati dobijaju pomenuti oksigenisani (kiseonični) derivati. Kao i terpeni, i terpenoidi se takođe mogu podeliti na monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide itd (10,11,12). Važno je napomenuti da neki autori koriste termin terpen u širem smislu, podrazumevajuće time i terpenoide. Sa druge strane, fenilpropanoidi predstavljaju najznačajniju ne-terpensku grupu jedinjenja etarskih ulja koja obuhvata sastojke derivate n-propil benzena od kojih neki imaju visok farmakološki potencijal (10). Ipak, može se reći da terpeni i terpenoidi predstavljaju najbrojniju grupu sastojaka etarskih ulja, dok su fenilpropanoidi i ostala jedinjenja zastupljena u manjem procentu (2,10).

Veliki broj sastojaka etarskih ulja je izolovan i identifikovan. Za mnoge od njih su otkrivne brojne farmakološke aktivnosti, između ostalih i antihelmintičke. Neki od najpoznatijih sastojaka etarskih ulja su (2,7,8,10,13):

- Ugljovodonični terpeni – limonen, α i β -pinen, kamfen, α i γ -terpinen, sabinen, mircen, β -kariofilen, germakren B i D, α i β -selinen, farnesen, o i p-cimen i dr.;
- Oksidisani derivati (terpenoidi)
 - a) Fenoli – timol, karvakrol;
 - b) Alkoholi - linalool, citronelol, geraniol, mentol, farnesol, bisabolol, α -terpineol terpinen-4-ol, borneol, nerolidol;
 - c) Aldehidi – citral, citronelal, sinensal;
 - d) Ketoni – α i β -tujon, kamfor (2-bornanon), fenhon, menton, karvon;
 - e) Oksidi – eukaliptol (1,8-cineol);
 - f) Estri – linalil acetat, geraniol acetat, kedril acetat;
- Fenilpropanoidi - anetol, eugenol, estragol, dilapiol, vanilin, cinamaldehyd, miristicin.

Hemijski sastav etarskih ulja zavisi i može se menjati pod uticajem mnogo faktora. Njihov sastav se razlikuje od jedne taksonomske grupe biljaka do druge, tako da pre svega zavisi od biljne vrste od koje se ekstrahuje. Međutim, hemijski sastav se može razlikovati od biljke do biljke unutar same vrste, čak i unutar same biljke u zavisnosti iz kog dela se uzima. Generalno, faktori koji utiču na hemijski profil etarskih ulja se mogu podeliti na abiotske i biotske faktore. Abiotski faktori podrazumevaju sve nežive faktore koji utiču na proizvodnju sekundarnih metabolita, kao što je količina vode u zemljištu, pH i salinitet zemljišta, kao i klima i mikroklima staništa u kome biljka raste. Biotički faktori podrazumevaju žive organizme koje utiču na same biljke uključujući različite mikroorganizme u zemlji, kao i organizme koje žive u ekosistemu u kome se gaji biljka. Naime, sastav i količina sekundarnih metabolita biljaka je jednim delom specifičan za samu biljku, dok drugim delom varira pod uticajem spoljašnje sredine, što pre svega zavisi od prisustva predatora protiv kojih se biljka brani, zatim prisustva insekata koje biljka privlači zbog oprašivanja, kao i različitih drugih organizama sa kojima biljka stupa u simbiozu (7).

Sa druge strane, Barra (2009) faktore koji utiču na hemijsku varijabilnost etarskih ulja deli na egzogene i endogene. Egzogeni faktori su pre svega vezani za okruženje biljke i uključuju količinu svetlosti, padavine, nadmorsku visinu na kojoj biljka raste, kao i već pomenute osobine zemljišta. U ovom slučaju se u egzogene faktore ubraja i godišnje doba odnosno sezona kada se vrši berba biljaka i sa tim prateće faktore (npr. temperatura), zbog čega se intenzivno vrše istraživanja u cilju pronalaska idealnog perioda godine sakupljanja pojedinih biljaka kada će etarska ulja dobijena od njih imati najbogatiji sastav. Endogeni faktori su povezani sa samim biljkama i uključuju mesto proizvodnje i akumulacije etarskih ulja u samim biljkama, starost biljke kao i genetske karakteristike koji regulišu sekundarni metabolizam (14). Sličnu podelu nude i Dhifi i sar. (2016), koji su faktore koji utiču na hemijski sastav etarskih ulja podelili na unutrašnje koji su vezani za biljku, i spoljašnje, koji su vezani za okruženje (8). U svakom slučaju, sve navedene faktore treba imati u vidu prilikom sakupljanja biljaka i ekstrakovanja etarskih ulja.

Sastav etarskih ulja zavisi i od procedura koja se sprovede pre same ekstrakcije, način ekstrakcije, kao i čuvanja etarskih ulja nakon ekstrakcije. Tako su, na primer, neka dosadašnja istraživanja pokazala da sušenje biljnog materijala pre ekstrakcije može dovesti do bogatijeg hemijskog sastava etarskih ulja. Metoda ekstrakcije kao što su parna ekstrakcija, ekstrakcija rastvaračem, superkritična fluidna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, hidrodestilacija itd., takođe u manjoj ili većoj utiče na hemijskih sastav etarskih ulja. Na kraju, etarska ulja su veoma osetljiva, zbog čega ih treba pažljivo čuvati nakon ekstrakcije kako bi zadržala svoje osobine. Naime, većina sastojaka etarskih ulja su nezasićena (sadrži dvostruke veze), zbog čega su osetljiva na svetlost (fotosenzibilna) i kiseonik (oksidirajuća), pa bi etarska ulja trebalo čuvati u odgovarajućem okruženju kako bi zadržala svoj hemijski sastav i samim tim farmakološke osobine (7).

Sastojci etarskih ulja sa antihelmintičkim potencijalom

Za veliki broj sastojaka etarskih ulja je ispitana i dokazana antihelmintička efikasnost. U nekim ispitivanjima je direktno ispitivan efekat pojedinih jedinjenja, dok je u drugim ispitivanjima indirektno pokazano njihovo dejstvo putem ispitivanja samih etarskih ulja. André i sar. (2016) su ispitivali antihelmintički efekat karvakrola i njegovog acetilovanog derivata karvakrol-acetata (CA) protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Pri tome su korišćeni *in vitro* testovi, tzv. *egg hatch test* (EHT), *larval development test* (LDT) i *adult worm motility test* (AWMT), kao i *in vivo* test, *faecal egg count reduction test* (FECRT). Rezultati su pokazali visoku *in vitro* efikasnost oba jedinjenja (EC₅₀ vrednosti 0,17 i 1,7 kod EHT, LC₅₀ vrednosti 0,2 i 0,3 mg/mL kod LDT za karvakrol i CA, redom, visoka inhibicija pokretljivosti adulta kod AWMT), kao i solidnu *in vivo* efikasnost karvakrol-acetata (35,4% i 65,9% redukcija broja jaja 8 i 16 dana nakon tretmana, redom) (15). U sličnom istraživanju, André i sar. (2017) su ispitivali i efekat timola i timol-acetata (TA) protiv pomenutih parazita, gde je takođe dokazana visoka *in vitro* efikasnost (EC₅₀ vrednosti 0,08 i 1,9, LC₅₀ vrednosti 1,0 i 0,8 mg/mL za timol i TA, redom, visoka inhibicija pokretljivosti adulta kod AWMT) i solidna, ali nešto manja *in vivo* efikasnost u poređenju sa prethodnim istraživanjem (redukcija broja jaja od 25,5% i 59,8%, 7 i 14 dana nakon tretmana timolom, redom) (16). Pri svemu tome, u ovim istraživanjima je dokazana manja toksičnost acetilovanih derivata u odnosu na sam karvakrol i timol kod miševa, što se objašnjava zamenom hidroksilnih radikala sa acetilnim radikalom kod ovih jedinjenja. To ukazuje da acetilovanje može dodatno smanjiti toksičnost i neželjene efekte karvakrola i timola prilikom eventualne primene kod samih ovaca (15,16).

Visoku antihelmintičku aktivnost pomenutih fenola i njihovih acetilovanih derivata André i sar. objašnjavaju na nekoliko načina. Višestruke efekte timola i karvakrola povezuju sa njihovim mogućim interakcijama sa SER-2 tiraminskim receptorima koji kod nematoda regulišu brojne procese uključujući i aktivnost ždrela, lokomociju i polaganje jaja, a pri tome su ovi receptori prisutni u svim fazama životnog ciklusa nematoda. Inhibiciju polaganja jaja pomenuti autori objašnjavaju i mogućim strukturnih promena spoljašnjih reproduktivnih organa ženki. Takođe, inhibiciju pokretljivosti adultnih oblika autori povezuju i sa stvaranjem mehurića u kutikuli nematoda, delujući pri tome na organizaciju i elektrostatička svojstva površine membrane, čime menjaju njenu propustljivost i inhibišu aktivnost membranskih proteina kao što su ATP-aze. Sa druge strane, niska molekulaska težina ovih jedinjenja im omogućava lakšu penetraciju u helminte putem transkutikularne difuzije, omogućavajući im time njihovo dejstvo. Dalje, kutikularne promene izazvane karvakrolom i moguća neurotoksičnost mogu ometati propustljivost kutikule i pokretljivost, ometajući održavanje homeostaze kod ovih parazita. Nešto bolju efikasnost karvakrola u poređenju sa timolom pri tome objašnjavaju prodorom same kutikule nematoda i izazivanjem ultrastrukturnih lezija (15,16).

In vitro efikasnost timola je dokazana i protiv cestode *E. granulosus*, pri čemu je utvrđeno dejstvo na protoskolekse. Maksimalan protoskolecidni efekat je pri tome zabeležen pri koncentraciji timola od 10 µg/mL sa smanjenjem vijabilnosti protoskoleksa na 53,5% 12 dana nakon inkubacije, odnosno na 11,5% 42 dana nakon inkubacije. Protoskolecidni efekat se pri tome povezao sa oštećenjima tegumenta povezanih sa morfološkim promenama kao što su formiranje mehurića, gubitak kuka, uništavanje mikrotriha, kontrakcija pojedinih regiona itd (17). Takođe, ispitana je i dokazana dozno i vremenski zavisna cestocidna aktivnost timola protiv adultnih oblika i tetratiridijuma *Mesocestoides corti*, pri čemu

je timol prouzrokovao ozbiljna oštećenja na strukturnom i ultrastrukturnom nivou, kao i promene u pokretljivosti, a oštećenja su bila veća kod potpuno segmentiranih crva (18).

Katiki i sar. (2017) su ispitivali ovcidno dejstvo 10 različitih sastojaka etarskih ulja i njihovih različitih binarnih, tercijarnih i kvaternih kombinacija u jednakoj srazmeri protiv *H. contortus*. Njihova komparativna efikasnost izražena u letalnim koncentracijama koje prouzrokuju smrtnost 50% jaja je bila sledeća: cinamaldehyd 0,018; anetol 0,070; karvon 0,085; karvakrol 0,11; timol 0,13; linalool 0,29; eugenol 0,57; vanilin 0,57; cineol 4,74 i limonen 207,56. Kada su u pitanju njihove kombinacije, kombinacionim indeksom (CI) su utvrđene sledeće kategorije: jak sinergizam, sinergizam, aditivni efekat, antagonizam i jak antagonizam, pri čemu je cilj kombinacija bio da njihov zajednički efekat bude veći od pojedinačnih efekata jedinjenja koje ulaze u njihov sastav. Tako su se, na primer, među binarnim najbolje pokazale sinergističke kombinacije cinamaldehyd:karvakrol i anetol:karvon sa EC_{50} vrednostima od 0,012 odnosno 0,013, među tercijarnim cinamaldehyd + karvon + karvakrol sa EC_{50} od 0,050, za koju je utvrđen aditivni efekat, dok je među kvaternim najbolji rezultat dala sinergistička kombinacija (anetol + karvon) + (cinamaldehyd + karvon) sa EC_{50} od 0,02 (19).

Rezultati pomenutog istraživanja Katiki i sar. (2017) se mogu objasniti na sledeći način: kada su u pitanju pojedinačni sastojci, najbolji efekat su pokazali fenilpropanoidi cinamaldehyd i anetol. Ova dva jedinjenja su veoma slična u strukturi, ali je cinamaldehyd rastvorljiv u vodi dok anetol nije. Pomenuti autori objašnjavaju da je ova osobina razlog većeg *in vitro* efekta cinamaladehida, dok bi pri *in vivo* testiranju anetol mogao imati bolji efekat, s obzirom da njegova nepolarna priroda može favorizovati njegovu interakciju sa ćelijskom membranom parazita. To ukazuje na činjenicu da su pored hemijske strukture sastojaka etarskih ulja za efekat bitne i njihove osobine. Veoma visoka efikasnost kombinacije cinamaldehyd:karvakrol se može objasniti povećanjem propustljivosti citoplazmatske membrane od strane karvakrola omogućavaju time cinamaldehydu da se bolje transportuje u ćeliju (19). Drugo moguće objašnjenje jeste vezivanje cinamaladehida za proteine ćelijske membrane, čime se povećava broj, veličina i trajanje postojanja pora a samim tim i bolji transport ovih jedinjenja u ćeliju (20). Međutim, to je dokazano u ispitivanju efekate ove kombinacije protiv salmonela, pa je pitanje koliko se rezultati dobijeni za efekat na bakterijsku ćeliju mogu primeniti i u ovom slučaju. Sa druge strane, kombinacija anetol:karvon je jedna od retkih za koju je ispitano i dokazano *in vivo* efekat, s obzirom da je njena primena u vidu inkapsuliranih formi dovela do značajnog smanjenja broja parazitskih jaja kod jaganjaca. Ovaj efekat se pri tome objasnio uticajem na smanjenje veličine mužjaka parazita i fertiliteta ženki (21). Tercijarne i kvaternarne kombinacije u istraživanju Katiki i sar. (2017) su pokazale manju efikasnost od binarnih, pri čemu smanjenu antihelminitičku aktivnost u ovom slučaju pomenuti autori objašnjavaju razblaživanjem aktivnih komponenti ovih kombinacija ili antagonizmom (19). Međutim, mehanizmi antagonizma u ovom slučaju nisu dovoljno poznati.

Različite kombinacije navedenih sastojaka su ispitivane i u drugim istraživanjima. Tako su Barbieri i sar. (2014) ispitivali ovcidni efekat različitih kombinacija cinamaladehida, karvona, karvakrola i anetola protiv *H. contortus*, pri čemu se najefikasnijom pokazala kombinacija cinamaladehida (25%) + karvakrola (50%) + anetol (25%) sa izračunatom EC_{50} vrednošću od 0,02 mg/mL (22). To pokazuje da je za krajnji efekat ovakvih kombinacija bitna i srazmera pojedinih komponenti. U svakom slučaju, navedena istraživanja su pokazala da se kombinovanjem određenih aktivnih sastojaka etarskih ulja može povećati antihelminitička efikasnost i eventualno smanjiti doza što može biti značajno kako se finansijskog aspekta, tako i sa aspekta smanjenja toksičnosti i neželjenih efekata ovih jedinjenja kod samih životinja u budućim *in vivo* ispitivanjima.

Pomenuti cinamaldehyd je najznačajniji sastojak etarskog ulja i drugih proizvoda cimeta (*Cinnamomum verum*), koji je u istraživanju Williams i sar. (2015) pokazao visoku *in vitro* efikasnost protiv *A. suum* nematode svinja. U ovom slučaju, ekstrakt kore cimeta čiji je glavni sastojak bio trans-cinamaldehyd, je pokazao aktivnost protiv L_3 stadijuma larvi tako što je inkubacija ovog stadijuma preko noći u ekstraktu cimeta u koncentracijama između 0,125-1 mg/mL rezultovala 100% inhibicijom migracije larvi. Dodatno, pri koncentracijama većim od 0,250 mg/mL ekstrakta cimeta, sve larve su uginule u roku od 2-3 sata od početka inkubacije. Ovaj rezultat je potvrđen i u drugom eksperimentu sa L_4 stadijumom larvi, kada je ponovo došlo do smrtnosti larvi u roku od nekoliko sati od početka inkubacije.

U daljem toku istraživanja, autori su testirali čist trans-cinamaldehyd protiv L₃ stadijuma *T. suis* i L₁ stadijuma *O. dentatum*, pri čemu su dokazali potentnu aktivnost ovog sastojaka takođe i protiv larvi ovih vrsta parazita. Time je dokazan visok antihelmintički potencijal cinamaldehyda protiv različitih gastrointestinalnih nematoda svinja (23). U drugim ispitivanjima je dokazan efekat cinamaldehyd i protiv nekih drugih nematoda, kao što je parazit riba *D. intermedius* (24).

Anetol je glavni sastojak etarskog ulja biljke *Croton zehneri*, aromatične biljke karakteristične za severoistok Brazila čiji antihelmintičke efekat je dokazan u istraživanju Camurça-Vasconcelos (2007). U ovom slučaju se ispitivao uticaj ovog etarskog ulja sakupljenog u dva navrata (C1 i C2) protiv *H. contortus*, pri čemu je u oba navrata glavni sastojak bio anetol sa procentualnom zastupljenošću od 39,34% odnosno 63,88%. Ispitivano etarsko ulje je pokazalo visoku antihelmintički potencijal sa EC₅₀ vrednošću u EHT testu od 0,55 (C1) i 0,74 (C2) mg/mL, odnosno LC₅₀ vrednošću u LHT testu od 1,17 (C1) i 1,37 (C2). Ispitana je i primena čistog anetola, koji je takođe pokazao solidnu, ali nešto manju efikasnost sa EC₅₀ od 0,69 i LC₅₀ vrednošću od 2,11 mg/mL u poređenju sa celim etarskih uljem. Poređenja radi, u istom ispitivanju je ispitan i dokazan efekat i etarskog ulja *Lipia sidoides*, sa glavnim sastojkom timolom (59,65%), koji je kao čist primenjen pokazao bolji larvicidni efekat od celog etarskog ulja (25). Za razliku od toga, u istraživanju Ferreira i sar. (2016), gde se ispitivao efekat primene etarskog ulja timijana (*Thymus vulgaris*) i njegovog glavnog sastojka (50,22%) timola, etarsko ulje je pokazalo nešto veći i ovicidni i larvicidni efekat u poređenju sa timolom (2). Ipak, iz ovih istraživanja se može zaključiti da je među velikim brojem sastojaka etarskih ulja moguć sinergizam, ali i antagonizam, zbog čega antihelmintički efekat etarskog ulja zapravo u najvećoj meri zavisi od njegovog glavnog sastojka, što potvrđuju i André i sar. (2018) (5).

Glavni sastojci etarskih ulja koja su pokazala *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca u različitim istraživanjima su bili eugenol (*Ocimum gratissimum*), limonen (*Citrus sinensis*), mentol (*Mentha piperita*), geraniol (*Cymbopogon martinii* i *Cymbopogon schoenanthus*), eukaliptol (*Artemisia lancea*, *Piper aduncum* i *Rosmarinus officinalis*), linalool (*Arisaema franchetianum*), borneol (*Zanthoxylum simulans*), citral (*Cymbopogon citratus*), terpinen-4-ol (*Melaleuca alternifolia*), α -pinen (*Juniperus communis*) itd, sugerišući da su ovi sastojci etarskih ulja zaslužni za njihovo antihelmintičko dejstvo (3,5,26). Limonen je bio glavni sastojak (28,82%) i etarskog ulja *Eucalyptus staigeriana* koji je pokazao visoku *in vitro* (EC₅₀ kod EHT od 0,324 i LC₅₀ kod LDT od 1,702 mg/mL), ali i *in vivo* efikasnost (76,57% redukcija broja jaja u fecesu 15 dana nakon tretmana) protiv gastrointestinalnih nematoda koza (27). Sa druge strane, najbolji efekat protiv gastrointestinalnih nematoda kod goveda su pokazala esencijalna ulja *C. citratus* i *C. martini*, sugerišući na značaj citrala i geraniola protiv ovih vrsta parazita kod goveda (28). Esencijalno ulje *C. citratus* i sam citral su pokazali dejstvo i protiv velikog metilja ovaca (*Fasciola hepatica*) inhibišući njegovu pokretljivost pri svim testiranim koncentracijama, pri čemu je efekat povezan sa gubitkom jednog dela integumenta kod metilja (29). Sličan efekat na pokretljivost i strukturne promene kod velikog metilja pokazali su i eugenol, timol i karvakrol (30).

Na kraju, pomenuti sastojci su identifikovani i u našim istraživanjima, gde je putem tzv. *egg hatch test*-a ispitivan ovicidni efekat različitih etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Kao glavni sastojak etarskih ulja koja su se pokazala najefikasnijim su bili upravo karvakrol, timol, anetol, kao i p-cimen. Važno je pri tome naglasiti ulogu karvakrola, koji je praktično kod svih najefikasnijih ulja ili bio glavni sastojak, ili je bio jedan od glavnih sastojaka. U drugim slučajevima kod ulja koja su se takođe pokazala efikasnim, kao glavni sastojak identifikovani su α i β -pinen, eukaliptol i piperiton. Sa druge strane, od ostalih jedinjenja identifikovanih u ovim istraživanjima, značajni su bili i γ -terpinen, β -kariofilen, kamfor, borneol, α -terpinen, α -terpineol, terpinen-4-ol, linalool, limonen i drugi. Zanimljiv rezultat ovih istraživanja je bio i to što je ukupan broj identifikovanih jedinjenja kod ulja često bio obrnuto proporcionalan pokazanim ovicidnim efektom prilikom međusobnog poređenja ovih ulja. Takođe, u ispitivanju dva hemotipa etarskog ulja hajdučke trave (*Achillea millefolium*) koja su nabavljena sa dva različita mesta (planine Radan i Golija), GC-MS analize su pokazale izvesne razlike u hemijskom sastavu između ovih hemotipova što je dovelo i do nešto drugačijeg ovicidnog efekta, sugerišući time na varijabilnost hemijskog sastava u zavisnosti od hemotipova i geografskog područja. U jednom slučaju je

ispitana i kombinacija odnosno smeša pojedinih sastojaka, konkretno linalool i estragol, koja je sa EC₅₀ od 0,98 pokazala značajan ovoidni efekat (Štrbac i sar., neobjavljeno).

Zaključak

Etarska ulja i njihovi sastojci su u različitim istraživanjima pokazali efikasnost protiv različitih nematoda, trematoda i cestoda domaćih životinja, za šta je zaslužan njihov bogat hemijski sastav. Pri tome bi, između ostalih, posebnu pažnju trebalo obratiti na karvakrol, timol, anetol, cinamaldehyd, p-cimen, citral, geraniol, eukaliptol, mentol, linalool, kamfor, karvon, limonen a trebalo bi imati u vidu i mogućnost primene različitih sinergističkih kombinacija ovih jedinjenja. Pored potencijalne visoke efikasnosti, etarska ulja poseduju i mnoge druge osobine dobrog antihelmintika, kao što su verovatna manja mogućnost razvoja rezistencije kod parazita, niska toksičnost za životinje i manje količine rezidua, zbog čega predstavljaju obećavajuću alternativu u borbi protiv antihelmintičke rezistencije. Međutim, potrebna su dodatna *in vivo* ispitivanja, kao i studije toksičnosti kako bi se ovi zaključci potvrdili.

Literatura

1. Shalaby H.A. 2013. Anthelmintics resistance: how to overcome it?. *Iranian Journal of Parasitology*, 8, 1, 18-32.
2. Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., França S.C., Contini S.S.H.T., Chagas A.C.S., Belebani R.O. 2016. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Parasitology*, 228, 70-76.
3. Pinto N.B., de Castro L.M., Azambuja R.H.M., Capella G.D.A., de Moura M.Q., Terto W.D., Freitag R.A., Jeske S.T., Villela M.M., Cleff M.B., Leite F.P.L. 2019. Ovicidal and larvicidal potential of *Rosmarinus officinalis* to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 28, 4, 807-811.
4. Veerakumari L. 2015. Botanical anthelmintics. *Asian Journal of Science and Technology*, 6, 10, 1881-1894.
5. André W.P.P., Ribeiro W.L.C., de Oliveira L.M.B., Macedo I.T.F., Rondon F.C.R., Bevilaqua C.M.L. 2018. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Scientiae Veterinari*, 46, 1522, 1-14.
6. Butnariu M., Sarac I. 2018. Essential oils from plants. *Journal of biotechnology and biomedical science*, 1, 4, 35-43.
7. Fokou J.B.H., Dongmo P.M.J., Boyom F.F. 2020. Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In: *Essential Oils – Oils of Nature*, edited by Hany El-Shemy, IntechOpen.
8. Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines (Basel)*, 3, 4, 25.
9. Sharifi-Rad J., Sureda A., Tenore G.C., Daglia M. 2017. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*, 2017, 22, 70.
10. Morsy N.F.S. 2016. Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. In: *Active Ingredients from aromatic and medicinal plants*, edited by Hany El-Shemy, IntechOpen.
11. Salminen A., Lehtonen M., Suuronen T., Kaarniranta K., Huuskonen J. 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 2979-2999.
12. Zwenger S., Chhandak B. 2008. Plant terpenoids: application and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 3, 1, 1-7.
13. Ligan K. 2018. A review of major constituents of various essential oils and its application. *Translational Medicine (Sunnyvale)*, 8, 201.
14. Barra A. 2009. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural Products Communications*, 4, 8, 1147-1154.
15. André W.P.P., Ribeiro W.L.C., Cavalcante G.S., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Paula H.C.B., de Freitas R.M., de Morais S.M., de Melo J.V., Bevilaqua C.M.L. 2016. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*, 218, 15, 52-58.
16. André W.P.P., Cavalcante G.S., Ribeiro W.L.C., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Paula H.C.B., de Morais S.M., de Melo J.V., Bevilaqua C.M.L. 2017. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep

- gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 26, 3, 323-330.
17. Elissondo M.C., Albani C.M., Gende L., Eguaras M., Denegri G. 2008. Efficacy of thymol against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitology International*, 57, 2, 185-190.
 18. Maggiore M., Elissondo M.C. 2014. In vitro cestocidal activity of thymol on *Mesocostoides corti* tetrathyridia and adult worms. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 4, 268135.
 19. Katiki L.M., Barbieri A.M.E., Araujo R.C., Veríssimo C.J., Louvandini H., Ferreira J.F.S. 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*, 243, 2017, 47-51.
 20. Zhou F., Ji B., Zhang H., Jiang H., Yang Z., Li J., Yan W. 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food borne pathogen *Salmonella typhimurium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 1, 311-316.
 21. Katiki L.M., Araujo R.C., Ziegelmeyer L., Gomes A.C.P., Gutmanis G., Rodrigues L., Bueno M.S., Veríssimo C.J., Louvandini H., Ferreira J.F.S., Amarante A.F.T. 2019. Evaluation of encapsulated anethole and carvone in lambs artificially- and naturally-infected with *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 197, 2019, 36-42.
 22. Barbieri A.M.E., Louvandini H., de Araujo R.C., da Costa R.L.D., Fornazari B.C., Katiki L.M. 2014. Formulation containing essential oils: potential for anthelmintic activity against sheep gastrointestinal nematodes. *Boletim de Industria Animal*, 71, 2014.
 23. Williams A.R., Ramsay A., Hansen T.V.A., Ropiak H.M., Mejer H., Nejsum P., Mueller-Harvey, Thamsborg S.M. 2015. Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Scientific Report*, 5, 14791.
 24. Ling F., Jiang C., Liu G., Li M., Wang G. 2015. Anthelmintic efficacy of cinnamaldehyde and cinnamic acid from cortex cinnamon essential oil against *Dactylogyrus intermedius*. *Parasitology*, 142, 14, 1-7.
 25. Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Moraes S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Braga R.R., Silva R.A., Vieira L.S. 2007. Anthelmintic activity of *Croton Zehneri* and *Lippia Sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, 148, 3-4, 288-294.
 26. Štrbac F., Bosco A., Amadesi A., Rinaldi L., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Krnjajić S., Ratajac R. 2020. In vitro ovicidal effect of common juniper (*Juniperus communis* L.) essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinarski Pregled*, 1, 1, 152-159.
 27. Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.I., de Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Vieira L.S., Oliveira F.R., Queiroz-Junior E.M., Tome A.R., Nascimento N.R.F. 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 173, 93-98.
 28. Saha S., Lachance S. 2020. Effect of essential oils on cattle gastrointestinal nematodes assessed by egg hatch, larval migration and mortality testing. *Journal of Helminthology*, 94, e111, 1-7.
 29. Temporim Novaes M. 2017. Chemical characterization and in vitro anthelmintic activity of citral and the essential oils *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon wynterianus* on adults of *Fasciola hepatica*. 2017. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.
 30. Vieira F.D.R.D. 2017. In vitro effects and chemical characterization of essential oils from *verum*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* and its main compounds against *Fasciola hepatica*. 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.