

**“AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR LARVAS DE NEMATÓIDES COM  
POTENCIAL ZONÓTICO EM CACHARAS (*Pseudoplatystoma  
fasciatum*, LINNAEUS, 1766) E TESTES DA AÇÃO LARVICIDA DA  
CITRONELA (*Cymbopogon* sp., SPRENG, 1815) SOB A  
APRESENTAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E *IN NATURA*”**

CHRISTIANO HENRIQUE DA SILVA JUSTINO

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em  
Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso  
para obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Enfermidades Infecciosas e Tropicais

ORIENTADOR: PROF. DR. LUCIANO ANTUNES BARROS

Cuiabá, MT

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos foto copiadores.

Assinatura:

Data:

À memória de meus avôs  
Antônio Justino e Antonio Jorge da Silva,  
que de algum lugar forma me apoiaram  
para eu chegar até aqui  
e seguir mais além...!!!

“Virá o dia em que a matança de um animal  
será considerada crime,  
tanto quanto o assassinato  
de um homem.”  
**(Leonardo da Vinci)**

## **Agradecimentos**

A Deus, por tudo que não há necessidade de ser dito;

Aos meus pais... Celso Justino, meu conselheiro, meu guardião, meu eterno ídolo, mas acima de tudo meu verdadeiro amigo e Ana Lúcia da Silva Justino, simplesmente mãe..., não havendo a necessidade de outra palavra para descrever tudo o que uma mãe é capaz pelos seus filhos. Obrigado por tudo, pois sei que mesmo apesar da distância e das dificuldades, sempre estão ao meu lado, dando-me forças a cada derrota e comemorando a cada vitória. “Sua Bênção pai e mãe..., Eu Amo Vocês!!!”;

Às minhas irmãs Cynthia e Christina, dizem que família a gente não escolhe, apenas os amigos..., me sinto um sortudo por vocês serem as duas coisas, obrigado por todo o apoio e torcida em mais essa etapa das NOSSAS VIDAS, a recíproca é verdadeira e incondicional;

À minhas avós (“Sua Bença Vó!!), tios, tias, primos, primas e agregados..., nossa família é sempre o nosso porto seguro;

À Família Alves e agregados, minha família cuiabana. Pessoas que me “adotaram”, sem precisar de fiador, comprovante de renda ou endereço, pessoas de bom coração que constituem outro importante pilar de sustentação da minha vida, que têm um lugar todo especial reservado em meu coração..., para sempre!!!;

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde que se esforçam todos os dias, nos incentivando, e transmitindo seus conhecimentos para que possamos fazer dessa apenas mais uma etapa em nossa longa jornada;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Antunes Barros, grande amigo que desde a graduação apóia e incentiva meus esforços, professor exemplar, mas acima de tudo pessoa de um excepcional caráter, no qual devemos nos espelhar;

Aos meus grandes amigos e incentivadores, Prof. Dr. Afonso Lodovico Sinkoc e aos Médicos Veterinários M.Sc. Antônio Messias Costa e M.Sc. Wanderlei de Moraes, pessoas que sempre estarão presentes, como exemplos de profissionais;

Aos Professores Dr. Edson Moleta Colodel e Dr. Luciano Nakazato, pelo fundamental apoio com a histopatologia, coleta de materiais para exames e também pelo rápido “curso teórico-prático de hipnose em coelhos”. Sem o auxílio de vocês não seria possível à realização de mais esse trabalho, muito obrigado;

A Prof<sup>a</sup>. M.Sc. Adriane Jorge Mendonça pelo importante auxílio nas análises laboratoriais utilizadas nesse estudo;

Aos Professores Dra. Maristela de Oliveira Bauer, Dr. Luciano da Silva Cabral, Dr. Joanis Tilemahos Zervoudakis que gentilmente cederam seu tempo, e seus laboratórios para apoiar na realização deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Luzinete A. Vanzeler pela importante orientação na realização deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Lúcia Aparecida de Fátima Mateus, pelo importante auxílio na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Sávio Amado da Silva, pelo grande apoio dispensado a realização desse trabalho;

Ao discente Leone de Medeiros, pelo constante auxílio em todas as etapas desse trabalho;

Aos professores e funcionários da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, por contribuir direta ou indiretamente para a realização deste estudo;

Ao Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso, por ceder os animais utilizados nesse experimento;

Ao professores, estagiários e funcionários do Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais da UFMT pelo apoio nas análises realizadas nesse experimento;

Ao Luiz Carlos de Sá Neves do Zoológico da UFMT e Domingos Antônio de Oliveira da Associação de pescadores de Barão de Melgaço, pelo auxílio na coleta de espécimes utilizados para a realização desse estudo;

A todos os meus amigos, conhecidos e agregados, não cabendo aqui citar nomes, pois todos foram e são fundamentais nessa caminhada, afinal

foram vocês que me salvaram em dias de estresse, quando a preguiça me alcançava, que aturaram crises de mau humor, que me tiraram das minhas obrigações para relaxar (afinal ninguém é de ferro!!), que me aconselharam, que me escutaram, que me confiaram segredos, mas acima de tudo que me apoiaram a todo instante sem nunca me deixar desistir, muito obrigado a todos;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte de mais um capítulo de minha história e que tornaram possível a realização de um ideal, mesmo que aqui não tenham sido mencionados, jamais serão esquecidos.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Cachara ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) proveniente do Rio Cuiabá, Barão de Melgaço, MT. ....	<b>14</b>
<b>Figura 2</b> - Necropsia de um espécime de cachara ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) .....	<b>15</b>
<b>Figura 3</b> – Exame da musculatura esquelética de cachara ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) com o auxílio de uma mesa de luz. ....	<b>16</b>
<b>Figura 4</b> - Exame da musculatura esquelética de cachara ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) com o auxílio de uma mesa de luz, mostrando a retirada de uma larva (L <sub>3</sub> ) de <i>Eustrongylides</i> sp.....	<b>16</b>
<b>Figura 5</b> – Espécimes de traíra ( <i>Hoplias malabaricus</i> ) capturadas do rio Mimoso, Distrito de Mimoso, MT. ....	<b>18</b>
<b>Figura 6</b> – Plantação de Citronela ( <i>Cymbopogon</i> sp.) no setor de Horticultura da FAMEV/UFMT. ....	<b>21</b>
<b>Figura 7</b> – Contenção de um coelho ( <i>Oryctolagus cuniculi</i> ), para a infecção <i>per os</i> com larvas de <i>Contracaecum</i> sp. ....	<b>23</b>
<b>Figura 8</b> - Infecção experimental <i>per os</i> de um coelho ( <i>Oryctolagus cuniculi</i> ) com larvas (L <sub>3</sub> ) de <i>Contracaecum</i> sp. utilizando-se de sonda.....	<b>24</b>
<b>Figura 9</b> - Relação entre o comprimento do cachara ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) e a intensidade de infecção por <i>Eustrongylides</i> sp. ...	<b>29</b>
<b>Figura 10</b> - Relação entre o comprimento do cachara ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) e a intensidade de infecção por de <i>Contracaecum</i> sp.....	<b>30</b>
<b>Figura 11</b> - Corte transversal de larva (L <sub>3</sub> ) de <i>Contracaecum</i> sp. (grupo controle), demonstrando integridade cuticular e de órgãos internos, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 µm) .....	<b>31</b>

- Figura 12** - Corte transversal de larva (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp., após decorrida 1 hora em contato com o óleo de citronela, demonstrando uma leve perda na aderência cuticular, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 µm)..... **31**
- Figura 13** - Corte transversal de larva (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp., após decorridas 2 horas em contato com o óleo de citronela, demonstrando perda total na aderência cuticular, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 µm) ..... **32**
- Figura 14** - Corte transversal de larva (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp., após decorridas 4 horas em contato com o óleo de citronela, demonstrando lise de parede intestinal e ruptura cuticular, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 µm) ..... **32**
- Figura 15** – Vista panorâmica da cavidade peritoneal, com destaque para larva (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp. aderida ao peritônio de um coelho infectado experimentalmente, em exame pós-morte 48 horas pós-infecção. .... **38**
- Figura 16** - Larva (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp. aderida ao peritônio de um coelho infectado experimentalmente, em exame pós-morte 48 horas pós-infecção. .... **38**
- Figura 17** – Corte histológico de estômago de coelho (grupo controle geral), sem alterações histológicas, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 µm)..... **39**
- Figura 18** - Corte histológico de estômago de coelho (Grupo Teste), com de larva de *Contracaecum* sp. localizada na submucosa, circundada por reação inflamatória composta por eosinófilos e neutrófilos, com espessamento de submucosa por edema e infiltrado polimorfonuclear, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 µm)..... **39**
- Figura 19** – Corte histológico de estômago de coelho (Grupo Teste), com de larva de *Contracaecum* sp. localizada na submucosa, circundada por reação inflamatória composta por eosinófilos e neutrófilos, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 5 µm)..... **40**

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros hematológicos de referência para coelhos machos adultos.....	<b>26</b>
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros bioquímicos de referência para coelhos machos adultos.....	<b>26</b>
<b>Tabela 3</b> - Intensidade média de infecção e prevalência do parasitismo por larvas de <i>Contracaecum</i> sp. e <i>Eustrongylides</i> sp. em cacharas ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) coletados do rio Cuiabá, MT, durante o período de outubro de 2004 a abril de 2006.....	<b>28</b>
<b>Tabela 4</b> - Taxa de mortalidade das larvas (L <sub>3</sub> ) de <i>Contracaecum</i> sp., verificados a cada hora, em contato com o óleo essencial de Citronela.....	<b>33</b>
<b>Tabela 5</b> – Achados hematológicos de eritrograma, de coelhos do Grupo Controle Geral (GCG).....	<b>34</b>
<b>Tabela 6</b> - Achados hematológicos de leucograma, de coelhos do Grupo Controle Geral (GCG).....	<b>34</b>
<b>Tabela 7</b> - Achados hematológicos de eritrograma, de coelhos do Grupo Controle Citronela (GCC).....	<b>35</b>
<b>Tabela 8</b> - Achados hematológicos de leucograma, de coelhos do Grupo Controle Citronela (GCC).....	<b>35</b>
<b>Tabela 9</b> - Dosagem sérica de uréia e creatinina e avaliação das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) em coelhos do Grupo Controle Geral (GCG).....	<b>36</b>
<b>Tabela 10</b> - Dosagem sérica de uréia e creatinina e avaliação das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) em coelhos do Grupo Controle Citronela (GCC).....	<b>36</b>
<b>Tabela 11</b> - Número total de larvas de <i>Contracaecum</i> sp. recuperadas no período pós-infecção de coelhos dos grupos teste (GT1, GT2 e GT3) e Grupo Controle Parasitado (GCP).....	<b>37</b>

<b>Tabela 12</b> - Avaliação da ação da citronela <i>in natura</i> , sobre larvas de <i>Contracaecum</i> sp. em coelhos infectados experimentalmente. ....	<b>37</b>
--	-----------

## RESUMO

Justino CHS. **AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR LARVAS DE NEMATÓIDES COM POTENCIAL ZONÓTICO EM CACHARAS (*Pseudoplatystoma fasciatum*, LINNAEUS, 1766) E TESTES DA AÇÃO LARVICIDA DA CITRONELA (*Cymbopogon* sp., SPRENG, 1815) SOB A APRESENTAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E *IN NATURA***. Cuiabá, 2007. [Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas da UFMT]

Os peixes são excelentes hospedeiros intermediários e paratênicos de parasitos, os quais são transmitidos principalmente para aves piscívoras, que atuam como hospedeiros definitivos, resultando em relações ecológicas eficientes para a manutenção de ciclos biológicos (VICENTE e PINTO, 1999; VICENTE *et al.*, 1995). A participação do homem como hospedeiro acidental de algumas espécies de parasitos de peixes, cada vez mais tem chamado à atenção de pesquisadores e autoridades sanitárias no mundo inteiro, por determinarem problemas de saúde pública, em infecções decorrentes do consumo de carne de peixe crua ou mal cozida. Visando conhecer a atual situação do parasitismo por larvas com potencial zoonótico em peixes provenientes do rio Cuiabá e avaliar a resistência destas larvas à fitoterapia por citronela, foram definidos os seguintes objetivos: Analisar o parasitismo por larvas de nematóides com potencial zoonótico, em cacharas provenientes do rio Cuiabá, com cálculo de prevalência, intensidade de infecção, fator de condição e correlação entre o parasitismo e os parâmetros biométricos dos peixes parasitados; avaliar a resistência de larvas de nematóides com potencial zoonótico ao óleo essencial de citronela *in vitro* e testar de eficácia da citronela *in natura*, sobre o parasitismo por larvas de *Contracaecum* sp. em coelhos infectados experimentalmente. Foram utilizados cento e quarenta e nove espécimes de cacharas capturados do rio Cuiabá, no período de outubro de 2004 à abril de 2006, para analisar o parasitismo por larvas de nematóides, encontrando-se prevalência de 100% por larvas de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp. A

análise foi feita por registro da prevalência e localização das larvas. Posteriormente, o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon* sp.) foi utilizado *in vitro* para avaliar sua ação sobre larvas (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp. Os parâmetros observados foram motilidade e integridade morfológica das larvas após contato com o produto. A avaliação da ação larvicida da planta *in natura* foi feita através da inoculação de larvas (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp. em coelhos machos, adultos. Foram utilizados 24 coelhos divididos em 6 grupos. Com intervalos regulares de 24 horas após o início do fornecimento da planta, foi necropsiado um animal de cada grupo para análise de possíveis alterações macroscópicas e microscópicas. Todos os animais foram submetidos a avaliação física, somente os animais do Grupo Controle Geral e Controle Citronela foram submetidos também a avaliação hematológica. Cinco cacharas (3,35 %) apresentaram parasitismo por larvas de *Contracaecum* sp. na musculatura esquelética e cento e quarenta e sete (98,65%) no mesentério. Cinquenta cacharas (33,55 %) apresentaram larvas de *Eustrongylides* sp. na musculatura esquelética e cento e dezessete (78,52 %) no mesentério. Foi observada uma intensidade média de infecção de 15,42 larvas/peixe para *Contracaecum* sp. e de 6,37 larvas/peixe para *Eustrongylides* sp. O óleo essencial de citronela demonstrou-se bastante eficaz, em teste *in vitro*, causando morte de todas as larvas em no máximo duas horas. Os danos causados às larvas, foram avaliados microscopicamente em cortes histológicos, encontrando-se ruptura cuticular e lise da parede intestinal das larvas. A planta *in natura* não revelou ação larvicida sobre L<sub>3</sub> de *Contracaecum* sp. em coelhos infectados experimentalmente. A Citronela *in vitro* apresentou ação larvicida contra larvas de *Contracaecum* sp., porém é necessária a realização de novos testes, utilizando seus diferentes componentes, a fim de isolar o princípio ativo e outros estudos devem ser realizados, para investigação das variáveis que possam interferir na ação larvicida da planta *in natura*.

**Palavras chave:** *Cymbopogon*.; *Contracaecum*, *Eustrongylides*, Citronela, Anisakidae.

## ABSTRACT

Justino CHS. **EVALUATION OF PARASITISM BY NEMATODE LARVAE WITH ZONOTIC POTENTIAL IN CACHARAS (*Pseudoplatystoma fasciatum*, LINNAEUS, 1766) AND TESTS OF THE LARVICIDE ACTION OF THE CITRONELLA (*Cymbopogon* sp., SPRENG, 1815) UNDER THE PRESENTATION OF THE ESSENTIAL OIL AND *IN NATURA*.** Cuiabá, 2007. [Master Dissertation – Department of Medical Sciences of the UFMT]

Fish are excellent intermediary and paratenic hosts of parasites, which are transmitted mainly to the piscivore birds that act as definite hosts, resulting in efficient and ecological relations for the maintenance of the biological cycles (VICENTE and PINTO, 1999; VICENTE *et al.*, 1995). Man's participation as an accidental host of some species of fish parasites, more and more has called the attention of researchers and sanitary authorities worldwide, because they bring public health problem in infection resulting from the consumption of raw or undercooked fish meat. Aiming at knowing the current situation of parasitism by larvae with zoonotic potential in fish found in the Cuiabá River and evaluating the resistance of these larvae to the phytotherapy by citronella, the following goals were defined: To analyze the parasitism nematode larvae with zoonotic potential in cacharas found in the Cuiabá River, with calculus of prevalence, severity of infection, condition and correlation factors between parasitism and the biometric parameters of the infected fish; to evaluate the resistance of the nematode larvae with zoonotic potential to the citronella essential oil *in vitro* and to test the efficiency of the citronella *in natura*, on the parasitism by *Contracaecum* sp. larvae in experimentally infected rabbits. A hundred and forty-nine specimens of cacharas captured in the Cuiabá River from October 2004 to April 2006 were used to analyze the parasitism by nematode larvae finding a 100% prevalence by *Contracaecum* sp. and *Eustrongylides* sp. The analysis was done through the registration of the prevalence and localization

of the larvae. Later, the Citronella essential oil (*Cymbopogon* sp.) was used *in vitro* to evaluate its action on the larvae (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp. The parameters observed were motility and morphological integrity of the larvae after having contact with the product. The evaluation of the larvicide action of the plant *in natura* was done through the inoculation of larvae (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp. in adult male rabbits. Twenty-four rabbits divided into 6 groups were used. With regular intervals of 24 hours after the beginning of the ministrations of the plant, one animal from each group went through a necropsy for analysis of possible macroscopic and microscopic alterations. All the animals were submitted to a physical evaluation, only the animals of the General Control Group and the Citronella Control were also submitted to a hematological evaluation. Five cacharas (3,35 %) presented parasitism by *Contracaecum* sp. larvae in the skeletal muscles and a hundred and forty-seven (98,65%) in the mesentery. Fifty cacharas (33,55 %) presented larvae of *Eustrongylides* sp. in the skeletal muscles and a hundred and seventeen (78,52 %) in the mesentery. A medium intensity of infection of 15,42 larvae/fish for *Contracaecum* sp. and of 6,37 larvae/fish for *Eustrongylides* sp. was observed. The Citronella essential oil showed to be very efficient, in test *in vitro*, killing all the larvae in maximum 2 hours. The damages caused to the larvae, were evaluated by microscope in histological cuts, finding cuticular rupture and lysis of the intestinal walls of the larvae. The plant *in natura* didn't show larvicide action over L<sub>3</sub> de *Contracaecum* sp. in experimentally infected rabbits. The Citronella *in vitro* presented larvicide action against the larvae *Contracaecum* sp., however, new tests are necessary, using its different components, to isolate the active principle and other studies must be done to investigate the variables that can interfere in the larvicide action of the plant *in natura*.

**Key words:** *Cymbopogon*.; *Contracaecum*, *Eustrongylides*, Citronella, Anisakidae.

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Parasitos de peixes do Brasil com potencial zoonótico .....	3
2.2 Parasitos de importância zoonótica transmitidos por pescado .....	4
2.2.1 Eustrongilidose .....	4
2.2.2 Fagicolose.....	5
2.2.3 Anisakiase .....	6
2.3 Plantas medicinais utilizadas no controle parasitário .....	9
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 Objetivo geral .....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
4.1 Primeira etapa: análise do parasitismo em peixes .....	13
4.1.1 Espécime de peixe utilizada.....	13
4.1.2 Captura dos peixes .....	14
4.1.3 Necropsia dos peixes.....	15
4.1.4 Processamento e identificação das larvas.....	17
4.2 Segunda etapa: teste de resistência <i>in vitro</i> ao óleo essencial de citronela .....	17
4.2.1 Óleo essencial de Citronela .....	17
4.2.2 Espécie de peixe utilizada para a obtenção de nematóides para o teste <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	18
4.2.3 Captura das traíras .....	18
4.2.4 Necropsia dos peixes.....	19
4.2.5 Avaliação das larvas .....	19
4.2.6 Distribuição dos grupos.....	19
4.2.7 Avaliação <i>in vitro</i> .....	19

4.3 Terceira etapa: teste do efeito larvicida do capim citronela <i>in natura</i> , sobre larvas de <i>Contracaecum</i> sp. <i>in vivo</i> .....	20
4.3.1 Dados Sobre a planta utilizada .....	20
4.3.2 Separação dos animais em grupos.....	22
4.3.3 Obtenção de larvas para infecção .....	22
4.3.4 Infecção dos coelhos .....	22
4.3.5 Pós-infecção .....	24
4.3.6 Necropsia dos coelhos.....	24
4.3.7 Exames laboratoriais.....	27
4.3.7.1 Hemograma .....	27
4.3.7.2 Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA) .....	27
4.3.7.3 Uréia e Creatinina .....	27
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
5.1 Prevalência Parasitária.....	28
5.2 Avaliação <i>in vitro</i> .....	30
5.3 Avaliação <i>in natura</i> .....	33
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO 1: Barros LA, Oliveira RL, Moraes-Filho J, Justino CHS, Mateus LAF, Análise do parasitismo por <i>Contracaecum</i> sp. (Raillet &amp; Henry, 1912) e <i>Eustrongylides</i> sp. (Jägerskiöld, 1909) em cacharas (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>, Linnaeus, 1766) (Pisces: Pimelodidae) provenientes do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Rev Bras Med Vet 2006; (No prelo).....</b>	<b>A-1</b>

**ANEXO 2: Justino CHS, Barros LA. *In vitro* evaluation of the resistance of the *Contraecum* sp. larvae (Nematoda: Anisakidae), to the essential oil of citronella (*Cymbopogon* sp). Rev Bras Med Vet 2006; (No prelo)..... A-9**

## 1 INTRODUÇÃO

Os peixes são excelentes hospedeiros intermediários e paratênicos de parasitos, os quais são transmitidos principalmente para aves piscívoras, que atuam como hospedeiros definitivos, resultando em relações ecológicas eficientes para a manutenção de ciclos biológicos (VICENTE *et al.*, 1995; VICENTE e PINTO, 1999). A participação do homem como hospedeiro acidental de algumas espécies de parasitos de peixes, cada vez mais tem chamado a atenção de pesquisadores e autoridades sanitárias no mundo inteiro, por determinarem problemas de saúde pública, em infecções decorrentes do consumo de carne de peixe crua ou mal cozida. Até o presente momento, relatos destas parasitoses em humanos no Brasil, são citados para fagicolose, difilobotriose e clonorquiose (LEITE *et al.*, 1989; CHIEFFI *et al.*, 1990; CHIEFFI *et al.*, 1992; DIAS *et al.*, 1992; SANTOS e FARO, 2005; EDUARDO *et al.*, 2005a; EDUARDO *et al.*, 2005b; EMMEL *et al.*, 2006). Acredita-se que isso se deva à falta de diagnóstico adequado e não à inexistência destas doenças no país, resultando em dificuldades no registro de casos clínicos. Para estas parasitoses, as medidas de prevenção são a inspeção sanitária e o uso de técnicas seguras de conservação por congelamento do pescado. Destaca-se também a importância da orientação do público consumidor, evitando-se a ingestão de pescados oriundos de áreas de risco.

A Anisakiase é considerada a mais preocupante dentre as parasitoses transmitidas por pescados, com inúmeros casos descritos para o continente europeu, sendo decorrente do parasitismo por larvas de *Anisakis* sp., após a ingestão de carne de peixe cru, mal passado ou defumado a frio. Os sintomas apresentados podem variar bastante, embora em sua maioria resultem em dores gástricas, seguidas ou não de vômitos, podendo evoluir para uma síndrome abdominal aguda, caracterizada por dores abdominais, com tensão anormal da musculatura e manifestações semelhantes a um quadro clínico de apendicite. A penetração das larvas na mucosa do trato gastrointestinal, pode levar a formação de abscessos ou granulomas

eosinofílicos, além de ulcerações gastroentéricas, colite eosinofílica, perfurações, obstruções e reações alérgicas (DOI *et al.*, 1989; SÃO CLEMENTE *et al.*, 1995; AUDICANA *et al.*, 1997; CUENDE *et al.* 1998; LÓPEZ-SERRANO *et al.* 2000). A ocorrência de alterações de hipersensibilidade, com urticárias e mesmo anafilaxia, tem sido relatada mesmo em pacientes com histórico de consumo de pratos à base de pescados submetidos à cocção, revelando uma manutenção de potencial alérgico em “partículas parasitárias” existentes no pescado consumido. (OKOMURA *et al.*, 1999; LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2000)

Para o Estado de Mato Grosso são relatadas prevalências altas do parasitismo por larvas de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp., em peixes dulcícolas como traíra (*Hoplias malabaricus*), piraputanga (*Brycon microlepis*), piranha (*Serrassalmus* sp.), cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e barbado (*Pinirampus pinirampu*) (BARROS *et al.*, 2004a). Ainda não há relatos da infecção de seres humanos por larvas de *Contracaecum* sp., porém através de infecções experimentais em mamíferos, revela-se uma grande possibilidade da mesma ocorrer (VIDAL-MARTINEZ *et al.*, 1994; BARROS *et al.*, 2004b). Já a infecção humana por larvas de *Eustrongylides* sp. foi inicialmente descrita por GUERIN *et al.* (1982).

Considerando o crescente aumento na indústria do pescado, no Estado de Mato Grosso, associado à pouca informação sobre métodos eficazes de tratamento para estas parasitoses, tornam-se importantes estudos sobre a resistência de larvas de nematóides encontradas em peixes às substâncias que possam ser aplicáveis ao controle.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Parasitos de peixes do Brasil com potencial zoonótico

Diversas enfermidades podem ser transmitidas através da ingestão de carne de pescado e considerando a redução dos estoques naturais, devido a pesca predatória, as populações humanas tornam-se cada vez mais dependentes da atividade de produção em cativeiro. Nessas pisciculturas, devido à restrição de espaço físico e a não ocorrência de predadores naturais, espera-se um aumento da possibilidade da ocorrência de enfermidades (THATCHER e NETO, 1994; OKOMURA *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 1999).

O peixe é um excelente mantenedor do ciclo biológico de uma série de parasitos, onde atua como hospedeiro intermediário ou paratênico, sendo geralmente predado por aves piscívoras, que atuam como hospedeiros definitivos naturais (VICENTE *et al.*, 1995; VICENTE e PINTO, 1999).

A carne de pescado é bastante consumida por seres humanos, devido à facilidade de obtenção e mais recentemente, devido às suas características nutricionais. Na manutenção de focos de zoonoses parasitárias, os fatores socioculturais são fundamentais, uma vez que o hábito de consumir a carne de pescado crua, mal cozida ou defumados à frio em pratos como *sushi* e o *sashimi* (pratos orientais), o *ceviche* (hispano-americanos) e o *green herring* (holandês), são determinantes para a transmissão destas parasitoses ao homem (SÃO CLEMENTE *et al.*, 1996; OKUMURA, *et al.*, 1999; JUGLARD *et al.*; 1998). Atualmente, o hábito de ingerir alimentos mais saudáveis, está relacionado ao não cozimento adequado da carne de pescado, em função de se preservar melhor os nutrientes. Este hábito também favorece a transmissão de zoonoses parasitárias (OKUMURA, *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 1999).

Muitas vezes, o peixe é utilizado na alimentação humana, sem que seja submetido a nenhum tipo de exame por inspeção sanitária, favorecendo o risco de transmissão de patógenos que possam vir a infectá-lo. Desse modo o homem pode assumir o papel de hospedeiro dessas parasitoses.

Torna-se oportuno então, do ponto de vista sanitário e de saúde pública, o estudo mais aprofundado destas zoonoses parasitárias, como por exemplo a eustrongilidose, a anisaquiose, a difilobotriose e a fagicolose, que dentre outras, podem resultar em manifestações clínicas relevantes, podendo mesmo culminar com a morte (LEITE *et al.*, 1989; CHIEFFI *et al.*, 1990; CHIEFFI *et al.* 1992; DIAS *et al.*, 1992; THATCHER e NETO, 1994; EDUARDO *et al.*, 2005a; EDUARDO *et al.*, 2005b; SANTOS e FARO, 2005; EMMEL *et al.* 2006).

## **2.2 Parasitos de importância zoonótica transmitidos por pescado**

### **2.2.1 Eustrongilidose**

A eustrongilidose é uma enfermidade parasitária causada por parasitos do gênero *Eustrongylides* sp.. A forma larvária é encontrada em répteis e anfíbios, além dos peixes, que são os tradicionais hospedeiros intermediários (OKOMURA *et al.*, 1999; WITTNER *et al.*, 1989; WOLFF *et al.*, 1999).

Os primeiros casos de infecção em humanos por larvas de *Eustrongylides* sp., ocorreram em Maryland, EUA (GUERIN *et al.*, 1982), outros relatos de infecção natural por este parasito foram feitos por EBERHARD *et al.*(1989) e WITTNER *et al.*(1989), também nos EUA. Todos próximo a costa do Atlântico, sendo diagnosticados por intervenções cirúrgicas, com a recuperação de larvas infectantes em laparotomia exploratória.

Em Mato Grosso, REGO e VICENTE (1988) analisaram a ecologia da parasitose em peixes e aves no Rio Cuiabá, onde puderam concluir que a piranha (*Serrasalmus nattereri*) era o hospedeiro com os maiores índices de prevalência e intensidade de infecção por *Eustrongylides ignotus*. Em um outro estudo de histopatologia de peixes também do Rio Cuiabá, realizado por EIRAS e REGO (1988, 1989), foi encontrado um número relativamente alto de traíras (*Hoplias malabaricus*) parasitadas por esta mesma espécie de

nematóide e BARROS *et al.* (2005), observaram que durante os meses de outubro e novembro, os cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) coletados do rio Cuiabá, parasitados por larvas de *Eustrongylides* sp., apresentaram os maiores índices de intensidade média de infecção.

PAVANELLI (1994) afirma que após a ingestão, as larvas de *Eustrongylides* sp. são digeridas ou eliminadas do organismo, não trazendo nenhum malefício ao hospedeiro acidental, no caso o homem. Porém, sabe-se que os seres humanos podem apresentar alguns sinais clínicos, os quais cursam principalmente com dor abdominal, os quais podem ser confundidos com apendicite aguda (EBERHARD *et al.*, 1989; NARR *et al.*, 1996), podendo haver também náusea, vômito e anorexia (WITTNER *et al.*, 1989). A hematologia pode revelar uma contagem leucocitária com elevado número de polimorfos nucleares, assim como aumento na contagem de monócitos e linfócitos (NARR *et al.*, 1996).

Em coelhos infectados experimentalmente com larvas de *Eustrongylides* sp., foram observados granulomas hepáticos, após a perfuração intestinal e peritonite (WOLFF *et al.*, 1999). SHIRAZIAN *et al.* (1984) e BARROS *et al.* (2004b) demonstraram que coelhos infectados experimentalmente, apresentaram lesões hemorrágicas por perfuração da parede gástrica, caracterizando o alto grau de patogenicidade deste parasitismo, levando alguns animais a óbito por peritonite.

### **2.2.2 Fagicolose**

A fagicolose, é a infecção causada por *Ascocotyle* (*Phagicola*) *longa*, um parasito com baixa especificidade parasitária na sua forma adulta e que tem sua etiopatogenia associada a ingestão de carne de peixes da família mugilidae, destacando-se a tainha (*Mugil platanus*) que é facilmente encontrada em toda a costa atlântica e muito utilizada na elaboração de pratos japoneses (BARROS LA, 1993; BARROS GC, 1994).

Em um estudo realizado por ARMAS DE CONROY (1986) sobre a ocorrência de *Ascocotyle* (*Phagicola*) *longa* em tainhas de águas sul americanas, foram encontradas metacercárias em alevinos provenientes de

ambiente marinho, em ciclo migratório para águas fluviais, o que sugere que a infecção por este parasito ocorra em ambiente marinho.

Segundo ANTUNES e DIAS (1994), DIAS e WOICIECHOVSKY (1994) a prevalência de metacercárias encistadas e identificadas como *Ascocotyle* sp. em peixes mugílideos é de 100%. Isto sugere um alto risco de transmissão para o consumidor deste pescado sob a forma de *sushi* ou *sashimi* (HUTTON, 1957; MATEO *et al.*, 1985).

Em seres humanos, o parasito pode causar sintomas típicos como cólicas, flatulência, diarreia, emagrecimento, dentre outros sinais característicos de helmintoses gastrointestinais (CHIEFFI *et al.*, 1990; CHIEFFI *et al.*, 1992; DIAS e WOICIECHOVSKY, 1994). Tais sinais clínicos são geralmente inexpressivos, sendo por muitas vezes ignorados e exames parasitológicos fecais, muitas vezes também são inconclusivos, em virtude da pequena quantidade de ovos liberados pelo parasito (BARROS e AMATO, 1995). Os sinais clínicos devem ser sempre associados ao histórico, principalmente quando o mesmo cursa com a ingestão de carne de pescado crua ou mal cozida, como o caso descrito por CHIEFFI *et al.* (1990), em que uma mulher apresentou dores abdominais após ingerir “sushi” confeccionado com carne de tainha. Ao exame coproparasitológico constatou-se a presença de ovos de trematódeos.

### **2.2.3 Anisakiase**

Dentre os parasitos de pescado, os anisquídeos constituem o grupo de nematóides mais importante, por serem amplamente distribuídos no mundo, parasitando tanto espécies marinhas quanto dulcícolas, com prevalência relativamente alta, quando comparada com outros helmintos. Os nematóides responsáveis pela anisquíose humana, já descritos, pertencem aos gêneros *Phoconema* sp., *Anisakis* sp. e *Pseudoterranova* sp. (CHENG, 1982; ACHA e SZYFRES, 1986; SHIRASAKA *et al.*, 1996; KOH *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2001). A anisquíose ocorre pela migração de larvas em terceiro estágio desses parasitos pela parede do trato gastrointestinal do hospedeiro

(KATES *et al.*, 1973), atingindo a forma adulta em seus hospedeiros definitivos, que podem ser aves piscívoras ou mesmo mamíferos marinhos.

Trata-se de um grupo de parasitos em que a infecção humana ocorre acidentalmente através da ingestão da carne de peixe crua ou insuficientemente cozida (KATES *et al.*, 1973; TORRES *et al.*, 1978; OKUMURA *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 1999; JUGLARD *et al.*, 1998). Uma vez ingeridas, as larvas podem morrer, entretanto caso sobrevivam, são eliminadas após algumas horas por regurgitação ou tosse (KATES *et al.*, 1973; LITTLE e MOST, 1973; CHITWOOD, 1975; LICHTENFELS e BRANCATO, 1976; KLIKS, 1983; WOLFF *et al.*, 1999), ou ainda, podem penetrar na parede gástrica ou intestinal, onde ocasionam úlcera e granuloma eosinofílico o qual pode levar a obstrução intestinal (KATES *et al.*, 1973; LITTLE e MOST, 1973; KLIKS, 1983; JUGLARD *et al.*, 1998; WOLFF *et al.*, 1999).

Os sinais clínicos apresentados geralmente são de dor abdominal branda a severa, distensão abdominal apresentando ou não surtos de vômito (JUGLARD *et al.*, 1998; TAKABE *et al.*, 1998; MUGURUMA *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 1999), podendo haver também obstrução intestinal, assim como também já foram descritos casos de dor torácica grave (WOLFF *et al.*, 1999). Por muitas vezes, o diagnóstico errôneo de apendicite aguda, abdome agudo, obstrução interna e até mesmo câncer ocorre, sendo necessário para a clínica, um diagnóstico mais acurado a fim de distinguir com mais clareza os sinais (OKUMURA, 1999; WOLFF *et al.*, 1999).

As larvas de anisquídeos em muitos casos, podem ser encontradas em locais incomuns, como descrito por LITTLE e MacPHAIL (1972), que encontraram uma larva de terceiro estágio, removida cirurgicamente de um aneurisma na artéria ilíaca de um homem. Algumas vezes a larva pode ser expelida por via oral, geralmente após o paciente sentir prurido na garganta e tossir (KATES *et al.*, 1973; LITTLE e MOST, 1973; CHITWOOD, 1975; LICHTENFELS e BRANCATO, 1976; KLIKS, 1983). A presença de larvas de *Anisakis simplex* no tecido subcutâneo e o relato de um provável caso de anisquiose pulmonar foram descritos por OSHIMA (1987). A habilidade da

larva desse nematóide causar alguma patologia em seu hospedeiro, depende de dois fatores: da sua habilidade em permanecer viva e da sua capacidade de invadir os tecidos (KATES *et al.*, 1973).

Reações de hipersensibilidade devido a presença de antígeno parasitário na carne de peixe bem cozida, são relatados em estudos mais recentes, devendo-se considerar esta parasitose no diagnóstico diferencial de urticárias em seres humanos. A severidade das reações variam desde uma simples urticária ao choque anafilático (LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2000).

Ainda não existem relatos da ocorrência de infecção humana por larvas de *Contracaecum* sp., tendo sido feito apenas infecções experimentais em mamíferos, apresentando evidências de injúrias, o que indica a possibilidade da importância zoonótica dessa espécie (VIDAL-MARTINEZ *et al.*, 1994; BARROS *et al.*, 2004b).

A prevalência do parasitismo por *Contracaecum* sp. em outras espécies de peixes dulcícolas e marinhos tem sido bastante estudada, sendo encontradas altas prevalências nos peixes examinados (BARROS, 1994; SÃO CLEMENTE *et al.* 1994; SILVA *et al.*, 2000; SILVA e SÃO CLEMENTE, 2001, MADI e SILVA, 2005). VICENTE *et al.* (1985), ao realizarem uma revisão taxonômica de nematóides encontrados em animais que vivem nos rios interiores da América do Sul tropical, observaram larvas de *Contracaecum* sp. em 18 espécies de peixes.

Para o Estado de Mato Grosso são relatadas prevalências altas do parasitismo por larvas de *Contracaecum* sp., em peixes como traíra (*Hoplias malabaricus*), piraputanga (*Brycon microlepis*), piranha (*Serrassalmus* sp.), cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e barbado (*Pinirampus pirinampu*) (BARROS *et al.*, 2004a). EIRAS e REGO (1989) estudaram a histopatologia de peixes do Rio Cuiabá, encontrando pintados (*Pseudoplatystoma coruscans*) parasitados por larvas de *Contracaecum* sp., concluindo que todos os tecidos adjacentes aos nódulos parasitários, não sofreram alterações significativas, sugerindo que os organismos destes hospedeiros intermediários não devem ser gravemente afetados pelo parasitismo.

### 2.3 Plantas medicinais utilizadas no controle parasitário

Alguns extratos de plantas, já conhecidos possuem efeito sobre alguns parasitos, como é o caso da Mirra (*Commiphora molmol*) que possui atividade anti esquistossomal (MASSOUD *et al*, 2004), outro extrato vegetal testado e que também apresentou efeito sobre formas adultas e na produção de ovos de *Schistosoma mansoni* foi produzido a partir do gengibre (*Zingiber officinale*), em estudo realizado por SANDERSON *et al* (2002), entretanto não verificaram uma redução significativa da carga parasitária na utilização do extrato *in vivo*. Outras plantas como a pimenta (*Aframomum sanguineum*) e a vassoura vermelha (*Dodonea angustifolia*) também já foram testadas para o tratamento de helmintoses em animais de produção, sendo utilizadas por fazendeiros e pastores, não apresentando resultados satisfatórios (GITHIORI *et al.*, 2003).

O *vimang*, extrato aquoso da haste da manga (*Mangifera indica*) e o *mangiferin* (polifenol também presente na haste), já foram submetidos a experimentos, a fim de verificar a sua eficácia como anti-helmíntico, no controle de *Trichinella spiralis* em camundongos, sendo observado um decréscimo significativo dos níveis séricos de IgE específicos anti-*Trichinella*, o que sugere que tais extratos podem ser úteis no tratamento dessas enfermidades (GARCIA *et al.*, 2003).

O extrato etanólico da haste de mangava brava (*Lafoensia pacari*), foi testado em camundongos infectados por *Toxocara canis*, apresentando atividade não só anti-helmíntica, mas também anti-inflamatória (ROGÉRIO *et al.*, 2003). Outros extratos vegetais, como os obtidos a partir de bagas de *Phytolacca dodecandra* (Caruru-do-campo), foram avaliados quanto as suas propriedades em combater a infecção de caramujos por cercárias e miracídios de *Schistosoma* sp., observando-se uma alta mortalidade de cercárias, bem como uma inibição completa da infecção pelos miracídios (BIRRIE *et al.*, 1998).

Alguns extratos de plantas são úteis no combate *in vivo* e *in vitro* de alguns parasitos de peixes, como foi demonstrado por EKANEM *et al.* (2004b), que utilizaram extratos obtidos a partir da semente de *Piper*

*guineense* (pimenta do reino), sobre parasitos de pele e brânquias de *Carassius auratus auratus* (peixe-dourado), em diferentes concentrações, observando-se maior eficácia desse extrato *in vitro*.

FSAKIN e ABEREJO (2002) testaram a eficácia de extratos de plantas, pulverizados sobre parasitos de peixe. No estudo realizado, foram utilizadas as folhas de *Tithonia diversifolia* (girassol silvestre ou unha de gavião) e *Nicotiana tabacum* (tabaco), e as sementes de *Aframomum melegueta* (Pimenta malagueta), *Monodora myristica* (iobó) e *Piper guineense* (pimenta do reino), as quais foram secadas e trituradas, para posteriormente serem pulverizadas sobre as diferentes fases de desenvolvimento de *Dermestes maculatus* (“besouro dos peixes”). Deste modo, foi possível demonstrar uma eficácia maior dos extratos de *Aframomum melegueta*, e *Piper guineense*, onde tais extratos poderiam ser utilizados para deter a eclodibilidade do ovo, bem como a emergência do adulto, reduzindo as perdas durante o armazenamento.

EKANEM *et al.* (2004a) avaliaram também, o efeito de extratos crus de *Mucuna pruriens* (mucuna-cinza ou feijão mucuna) e *Carica papaya* (mamão papaia) sobre o protozoário parasito de peixe, *Ichthyophthirius multifiliis*, um ciliado enquadrado como um dos parasitos mais patogênicos para peixes em cativeiro. No estudo realizado por estes autores, foi investigado o efeito do extrato de folhas de *M. pruriens* e do extrato oléico das sementes de *C. papaya*, em condições *in vivo* e *in vitro*. Nesse caso, espécimes infectados de *Carassius auratus auratus* (peixe-dourado), apresentaram uma redução de 90% na quantidade de *I. multifiliis*, após a aplicação do extrato. Consequentemente, a mortalidade “parasito-induzida” reduziu significativamente, já os testes *in vitro*, demonstraram 100% de mortalidade de *I. multifiliis*, após 6 horas de contato com os extratos de *M. pruriens* e de *C. papaya*.

Normalmente os extratos das plantas são utilizadas como inseticidas, ou apenas repelentes de insetos, produzindo excelentes resultados, como a Citronela (*Cymbopogon* sp.) (MATSUDA *et al.*, 1996; DE MENDONÇA *et al.*,

2005; WONG *et al.*, 2005), ou o Citrus (*Atlantia monophylla*) (SYVAGNANAME e KALYANASUNDARAM, 2004)

O extrato aquoso de Citronela (*Cymbopogon* sp.) já foi também utilizado *in vitro*, sobre cultivo de larvas de nematóides gastrointestinais em fezes de caprinos, demonstrando ser bastante eficaz, sendo determinado através da redução da carga parasitária verificada no exame de coproparasitológico (ALMEIDA *et al.*, 2003).

MATSUDA *et al.* (1996) e SCHANEBERG e KHAN (2002), utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa, determinaram a composição do óleo essencial de citronela, onde foram destacados alguns compostos específicos, como geraniol e o citronelol, esses mesmos compostos além de outros monoterpenos foram utilizados, *in vitro*, por HIERRO *et al.* (2004), em seu experimento, sobre larvas de *Anisakis simplex*. Posteriormente HIERRO *et al.* (2006) testaram a ação larvicida desses mesmos compostos sobre larvas (L<sub>3</sub>) de *Anisakis simplex* em um experimento *in vivo*, em fêmeas de camundongos infectadas experimentalmente com essas larvas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

1 - Estudar o parasitismo por larvas de nematóides com potencial zoonótico em cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) provenientes do Rio Cuiabá;

2 - Avaliar o efeito da Citronela (*Cymbopogon* sp.) *in vivo* e *in vitro* sobre larvas de *Contracaecum* sp..

#### 3.2 Objetivos específicos

1 - Calcular a prevalência, intensidade de infecção, fator de condição e correlação entre o parasitismo e os parâmetros biométricos dos peixes parasitados por larvas de nematóides com potencial zoonótico em cacharas provenientes do rio Cuiabá;

2 - Determinar os locais de parasitismos nos peixes examinados;

3 - Avaliar a resistência de larvas de nematóides com potencial zoonótico ao óleo essencial de citronela *in vitro*;

4 - Testar de eficácia da citronela *in natura*, sobre as larvas de *Contracaecum* sp. em coelhos infectados experimentalmente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em três etapas distintas. Na primeira etapa, foi realizada a análise do parasitismo por larvas de nematóides com potencial zoonótico, em cacharas provenientes do rio Cuiabá. Na segunda etapa, foi avaliada a resistência dessas larvas ao óleo essencial de citronela *in vitro* e na terceira etapa, realizou-se um teste de eficácia da planta *in natura*, sobre larvas de *Contracaecum* sp. em coelhos infectados experimentalmente.

### 4.1 Primeira etapa: análise do parasitismo em peixes

Para esta etapa os cacharas foram medidos e em seguida necropsiados, posteriormente procedeu-se a coleta de dados por localização do parasitismo no organismo do hospedeiro e quantificação da infrapopulação de parasitos para o cálculo de prevalência, intensidade de infecção, fator de condição e correlação entre o parasitismo e comprimento e peso de Cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) coletados do rio Cuiabá.

A correlação entre a intensidade de infecção de cada espécie de parasito e o comprimento do peixe e entre a intensidade de infecção e o fator de condição (K) foram testadas pelo coeficiente de correlação de Sperman ( $r_s$ ). O fator de condição foi estimado pelo quociente entre o peso observado e o peso esperado para um dado comprimento ( $K = P_{obs}/C^b$ ), sendo o valor de b estimado a partir da relação entre o peso e o comprimento:  $Peso = a * C^b$ , e os coeficientes a e b estimados por regressão não linear (VAZZOLER, 1996).

Os termos prevalência e intensidade de infecção foram utilizados segundo BUSH *et al.* (1997).

#### 4.1.1 Espécime de peixe utilizada

O cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) (Figura 1) é um peixe carnívoro. Pertence a família Pimelodidae, e possui hábito noturno, sendo normalmente encontrado nas partes mais fundas dos rios. Sua carne é

bastante apreciada pelo público consumidor, desse modo é bastante procurado por pescadores e facilmente encontrado no comércio em Mato Grosso, devido às suas características organolépticas, apresentando ainda importante potencial para produção.

Os peixes foram identificados segundo BRITSKI *et al.* (1999) e um espécime representativo foi depositado na coleção zoológica de vertebrados do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso. Um espécime representativo de cachara foi depositado da Coleção Zoológica de Vertebrados do Instituto de Biociências da UFMT sob o número 0788.



**Figura 1** – Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) proveniente do Rio Cuiabá, Barão de Melgaço, MT.

#### **4.1.2 Captura dos peixes**

Os locais de coleta foram trechos do rio Cuiabá, localizados no município de Barão de Melgaço, localizado à 16° 12' 59" Sul e 55° 57' 51" Oeste, e na região metropolitana, nos municípios de Várzea Grande e Cuiabá, MT, aproximadamente a 15°35'46" Sul e 56°05'48" Oeste.

Para a análise do parasitismo por nematóides, foram capturados 149 cacharas (*P. fasciatum*) com o auxílio de anzóis ou redes, sendo

posteriormente acondicionados em caixas térmicas e transportados ao laboratório de Parasitologia Veterinária da UFMT, onde foram medidos, com uso de fita métrica e pesados em balança digital<sup>1</sup>.

#### 4.1.3 Necropsia dos peixes

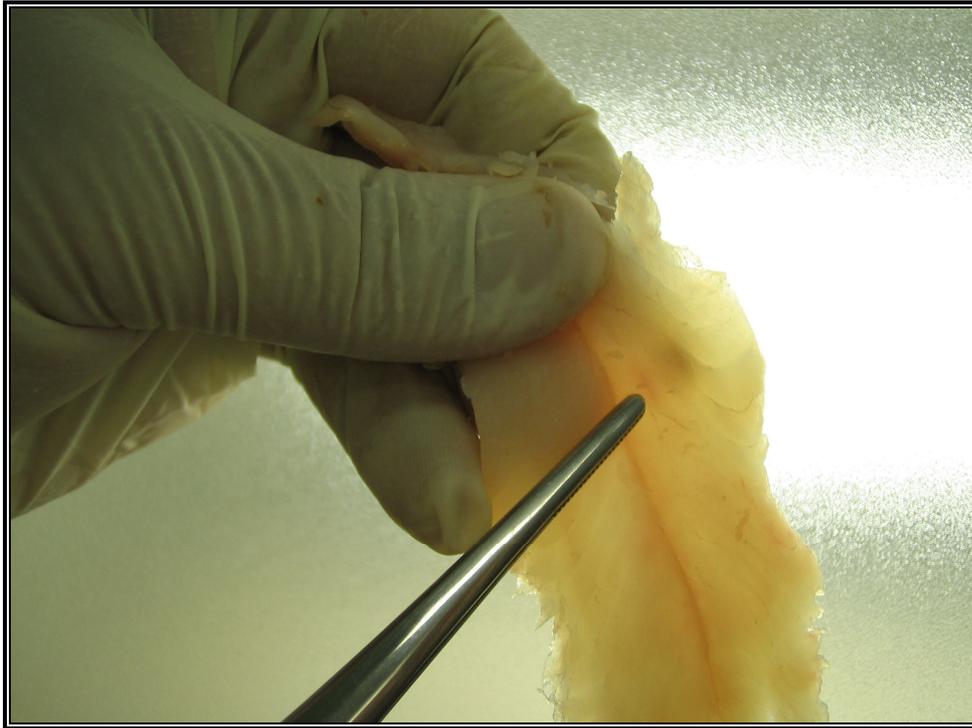
A técnica de necropsia consistiu em uma incisão ventral longitudinal da abertura cloacal à região branquial, com retirada das vísceras da cavidade celomática, para exame e coleta dos parasitos, seguindo a metodologia adotada por PAVANELLI *et al.* (1998) (Figura 2), do mesmo modo, a musculatura foi “filetada” e examinada com o auxílio de uma mesa de luz (HUSS, 1988; HALL, 1997) (Figura 3 e 4). Os dados referentes às necropsias foram anotados em fichas individuais.



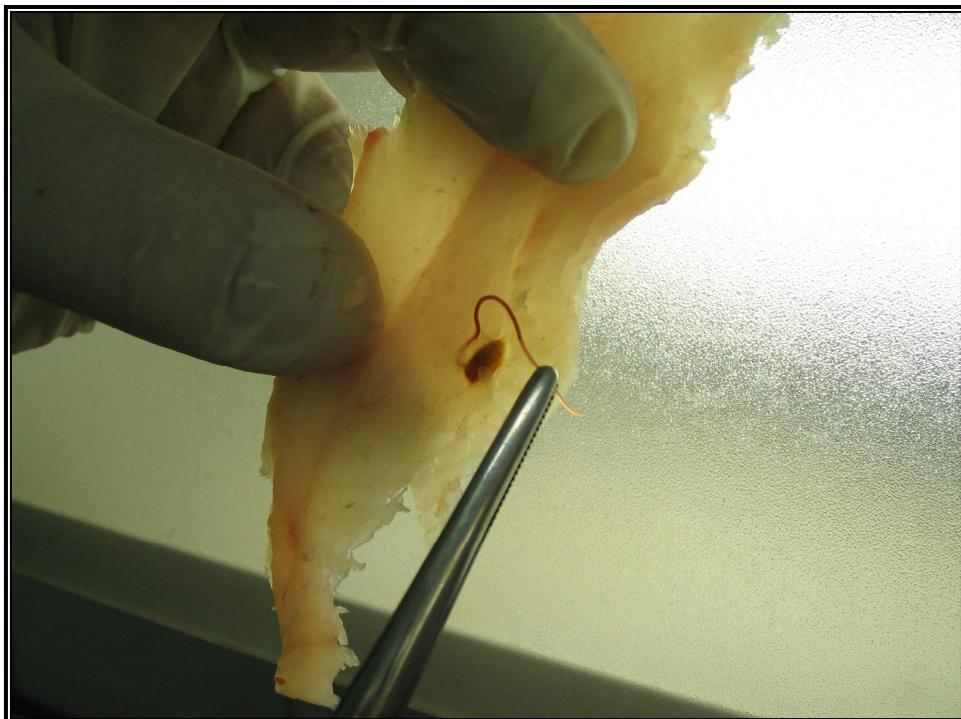
**Figura 2** - Necropsia de um espécime de cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*)

---

<sup>1</sup> Filizola® MOD BP3



**Figura 3** - Exame da musculatura esquelética de cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) com o auxílio de uma mesa de luz.



**Figura 4** - Exame da musculatura esquelética de cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) com o auxílio de uma mesa de luz, mostrando a retirada de uma larva (L<sub>3</sub>) de *Eustrongylides* sp..

#### 4.1.4 Processamento e identificação das larvas

As larvas encontradas durante a necropsia foram mantidas em placas de Petri, com solução salina fisiológica à 0,65% NaCl e posteriormente fixadas e processadas, segundo metodologia descrita por AMATO *et al.* (1991).

A identificação taxonômica foi realizada de acordo com HARTWICH (1974) e espécimes representativos foram depositados na coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz, sob os números CHIOC 35505 (*Contraecum* sp.) e CHIOC 35506 (Eustrongylides).

## 4.2 Segunda etapa: teste de resistência *in vitro* ao óleo essencial de citronela

Devido a comprovada eficácia de compostos monoterpênicos sobre larvas de *Anisakis simplex* e a existência de compostos semelhantes na composição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon* sp., Spreng, 1815), optou-se por testar este produto sobre larvas de *Contraecum* sp. e *Eustrongylides* sp. *in vitro*.

### 4.2.1 Óleo essencial de Citronela

O óleo essencial de citronela foi adquirido em farmácia de manipulação (Fórmula Certa, Cuiabá-MT, Lote N.º 000789). Os seus níveis de pureza foram garantidos através de análises sensoriais e físicas, as quais se encontravam dentro da normalidade, segundo fornecido pela EML - Distribuidora Ely Martins. Uma amostra do mesmo lote do óleo foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa<sup>2</sup> (CG-EM), a fim de determinar os compostos presentes em sua formulação.

---

<sup>2</sup> Aparelho Shimadzu® GCMS-QP5050A

#### 4.2.2 Espécie de peixe utilizada para a obtenção de nematóides para o teste *in vitro* e *in vivo*

Como fonte de larvas de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp, foram utilizados 38 traíras (*Hoplias malabaricus*, Bloch, 1794) (Figura 5), por tratar-se de um peixe carnívoro, predador de ampla distribuição em território nacional, que pode ser encontrado em ambientes lacustres e fluviais interiores. Além de ser predador de outros peixes, é facilmente utilizado por aves piscívoras, bem como por mamíferos, incluindo o homem, como fonte de alimento, conferindo a essa espécie um papel importante como hospedeiro intermediário e paratênico de helmintos.



**Figura 5** – Espécimes de traíra (*Hoplias malabaricus*) capturadas do rio Mimoso, Distrito de Mimoso, MT.

#### 4.2.3 Captura das traíras

Os espécimes de traíras foram capturados com anzol no rio Mimoso, município de Santo Antônio de Leverger, localizado a 140 km de Cuiabá, a 16° 12' 50" Sul, 55° 48' 29" Oeste. Após a coleta foram acondicionados em

caixas térmicas e transportados ao laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso.

#### **4.2.4 Necropsia dos peixes**

As traíras foram necropsiadas seguindo os mesmos procedimentos descritos para cacharas no item 4.1.3.

#### **4.2.5 Avaliação das larvas**

As larvas encontradas durante a necropsia foram mantidas em placas de Petri, com solução salina fisiológica (0,65% NaCl) e posteriormente avaliadas quanto a viabilidade em estereomicroscópio<sup>3</sup>, utilizando como parâmetros, a motilidade e a integridade estrutural.

#### **4.2.6 Distribuição dos grupos**

As larvas de *Contracaecum* sp. consideradas viáveis, foram separadas em seis grupos de dez larvas cada, sendo quatro tratamentos (identificados como T1, T2, T3 e T4), um controle e um contendo larvas destinadas à confirmação do diagnóstico taxonômico. As larvas deste último grupo foram processadas segundo a metodologia descrita por AMATO (1991) e identificadas segundo HARTWICH (1974).

#### **4.2.7 Avaliação *in vitro***

A cada uma das placas dos grupos testes, adicionou-se 5 ml de óleo essencial de citronela e na placa contendo o grupo controle, foi mantido o mesmo volume de solução fisiológica (0,65% NaCl), posteriormente as placas foram colocadas em uma câmara de incubação<sup>4</sup>, com temperatura média de 28,4° C ( $\pm$  0,8° C) e umidade relativa de 62% ( $\pm$  4%). Após o início do experimento, com intervalos regulares de uma hora, foi retirada uma placa teste da câmara de incubação, as larvas foram lavadas com solução

---

<sup>3</sup> Olympus® SZ-4045

fisiológica e levadas ao estereomicroscópio<sup>5</sup>, a fim de serem examinadas, utilizando-se como parâmetros a motilidade e a integridade estrutural. O grupo controle também foi avaliado a cada hora, utilizando-se os mesmos parâmetros durante o decorrer do experimento.

As larvas mortas foram fixadas com formalina 10%, e posteriormente processadas conforme as técnicas histológicas descritas por PROPHET (1992), sendo cortadas em espessura de 3µm, utilizando-se um micrótomo manual<sup>6</sup>. As lâminas confeccionadas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (ALLEN, 1992), e posteriormente examinadas e microfotografadas, com aumentos de 40X e 100X, com o auxílio de microscópio óptico<sup>7</sup> visando avaliar possíveis alterações decorrentes da ação da citronela fornecida aos coelhos.

A avaliação do desempenho entre os grupos tratados e não tratados com o óleo essencial de Citronela, foi realizado por meio do Teste de Fisher monocaudal, utilizando-se como ferramenta o programa estatístico Epi Info™ 6.0.

### **4.3 Terceira etapa: teste do efeito larvicida do capim citronela *in natura*, sobre larvas de *Contraecum* sp. *in vivo***

A terceira etapa consistiu em testar a planta *in natura*, sobre larvas de *Contraecum* sp. em coelhos infectados experimentalmente, e submetidos ao fornecimento da planta verde recém colhida.

#### **4.3.1 Dados Sobre a planta utilizada**

A citronela é uma forragem pertencente à família Poaceae, que possui como propriedades medicinais, ação calmante, bactericida, febrífuga,

---

<sup>4</sup> B.O.D. 347 CD

<sup>5</sup> Olympus® MOD. SZ 40

<sup>6</sup> Microm® HM 325

<sup>7</sup> Olympus® MOD. BX-41

sudorífica, carminativa e funciona ainda como repelente de insetos, com ampla distribuição no Brasil (CARLINI *et al.*, 1986).

Um exemplar representativo da planta, foi encaminhado ao Herbário Central da Universidade Federal de Mato Grosso, para identificação e depósito. Este foi identificado como *Cymbopogon* sp. e depositado sob o número 37263. (Figura 6)



**Figura 6** – Plantação de Citronela (*Cymbopogon* sp.) no setor de Horticultura da FAMEV/UFMT.

Foram utilizadas folhas de plantas cultivadas no setor de horticultura da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso.

Optou-se por fornecer a planta *in natura ad libitum*, como única fonte de alimento aos coelhos, considerando-se que a mistura com outra fonte alimentar, reduziria a quantidade ingerida de princípio(s) ativo(s) que se desejaria testar. As folhas foram fornecidas verdes e recém colhidas, a fim de que não houvesse alteração ou perda do(s) princípio(s) ativo(s) existentes na planta, por evaporação e secagem.

### 4.3.2 Separação dos animais em grupos

Foram utilizados 24 coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso, subdivididos em seis grupos, contendo quatro animais cada, sendo eles:

- Grupo Controle Geral (GCG): composto por animais não infectados, e alimentados com ração comercial para coelhos<sup>8</sup>;
- Grupo Controle Citronela (GCC): composto por animais não infectados e alimentados apenas com citronela *ad libidum*;
- Grupo Controle Parasitado (GCP): composto por animais infectados, com larvas de *Contracaecum* sp. e alimentados com ração comercial para coelhos<sup>9</sup>; e
- Grupos Teste (GT1, GT2 e GT3): compostos por animais infectados com larvas de *Contracaecum* sp. e alimentados apenas com citronela *ad libidum*.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente refrigerado com temperatura e umidade relativa controladas, sendo respectivamente  $24,1 \pm 5,5^{\circ}\text{C}$ ,  $51 \pm 15\%$ , a fim de evitar o estresse térmico por variação de temperatura e umidade relativa.

### 4.3.3 Obtenção de larvas para infecção

Foram necropsiados 240 espécimes de traíras coletadas do rio Mimoso, no mesmo trecho descrito no item 4.2.3. A necropsia dos peixes e processamento das larvas procederam conforme citado nos itens 4.1.3 e 4.2.5 respectivamente.

### 4.3.4 Infecção dos coelhos

Foram selecionadas 560 larvas de *Contracaecum* sp. consideradas viáveis para infecção, subdivididas em 16 inóculos com 35 larvas/animal. As infecções dos coelhos seguiram as técnicas descritas por BARROS *et al.*

---

<sup>8</sup> Do Sítio Coelhão® - Guabi

<sup>9</sup> Do Sítio Coelhão® - Guabi

(2004b) (Figura 7 e 8). Os animais não foram deixados em jejum pré-infecção, para que a velocidade na taxa da passagem do inóculo pelo trato gastrointestinal fosse mantida dentro dos padrões de normalidades fisiológica, não interferindo desse modo na fixação das larvas.



**Figura 7** – Contenção de um coelho (*Oryctolagus cuniculi*), para a infecção *per os* com larvas de *Contraecum* sp.



**Figura 8** - Infecção experimental *per os* de um coelho (*Oryctolagus cuniculi*) com larvas (L<sub>3</sub>) de *Contraecum* sp. utilizando-se de sonda.

#### **4.3.5 Pós-infecção**

Durante as primeiras 24 horas pós-infecção, os animais infectados foram mantidos com ração e água *ad libitum*, observando-se possíveis alterações comportamentais nos coelhos.

Decorridas as primeiras 24 horas, iniciou-se o fornecimento da planta aos grupos GT1, GT2, GT3 e GCC em substituição a ração comercial.

#### **4.3.6 Necropsia dos coelhos**

Com intervalos regulares de 24 horas após o início da administração da planta, foi sacrificado e necropsiado um coelho de cada grupo, para análise de possíveis alterações macroscópicas e microscópicas nos locais de fixação das larvas no GCP, bem como avaliar a ação da planta sobre as larvas nos Grupos Teste. Todos os animais do GCG foram mantidos vivos até o 7º dia após o início do experimento, a fim de certificar que os animais não sofreram qualquer tipo de interferência que representasse risco à saúde

dos mesmos e todos os animais do GCC foram mantidos vivos até o 14º dia após o início do experimento seguindo os critérios recomendados por BRASIL (1996). Estes grupos também foram destinados ao fornecimento de sangue para a avaliação de parâmetros hematológicos, segundo recomendado por BRASIL (1996), a fim de verificar possíveis reações de toxicidade da planta sobre o organismo dos animais.

A insensibilização e sacrifício dos animais, obedeceram às normas preconizadas por BRASIL (2000) e a necropsia foi realizada segundo a técnica descrita por FELDMAN e SEELY (1988).

Todas as larvas recuperadas durante a necropsia assim como fragmentos de tecidos onde elas encontravam-se fixadas, foram coletados e mantidos em placas de Petri, contendo solução salina fisiológica (0,65% NaCl) (AMATO *et al.*, 1991).

Ao término da necropsia, os procedimentos de fixação e processamento histológico adotados, foram semelhantes aos descritos no item 4.2.7.

Os animais do GCP e GCC foram submetidos aos mesmos exames laboratoriais, tendo como valores de referência para coelhos machos adultos, os apresentados por MITRUKA e RAWNSLEY (1977), para hemograma (Tabela 1) e bioquímica sérica - atividade das enzimas ALT e FA, determinações das uréia e creatinina (Tabela 2).

Para a avaliação estatística da resistência das larvas de *Contracecum* sp. a planta *in natura*, foi realizado o teste qui-quadrado, utilizando-se como ferramenta o programa estatístico Epi Info™ 6.0.

**Tabela 1** - Parâmetros hematológicos de referência para coelhos machos adultos.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>VALORES DE REFERÊNCIA*</b>	
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> )	4,0 a 6,0	
Hemoglobina (g/dl)	6,0 a 8,0	
Hematócrito (%)	35 a 44	
VGM $\mu^3$	58.5-66.5	
CHGM g/dl	30-37	
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,0 a 10,0	
<b>CONTAGEM DIFERENCIAL</b>	<b>Relat. %</b>	<b>Abs 10<sup>3</sup></b>
Bastonetes (%)	0 a 1	0-0
Neutrófilos (%)	15 a 45	1,5-3,2
Eosinófilos (%)	1 a 4	0,01-0,15
Basófilos (%)	0 a 1	0,06-0,4
Linfócitos (%)	45 a 70	3,4-7,0
Monócitos (%)	3 a 10	0,05-0,45
Plaquetas x10 <sup>3</sup>	250 – 610	
Proteína plasmática g/dl	5 - 8,5	

**Fonte:** modificado de MITRUKA e RAWNSLEY (1977).

**Tabela 2** - Parâmetros bioquímicos de referência para coelhos machos adultos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores normais</b>
<b>ALT – UI/L</b>	10,4
<b>FA – UI/L</b>	65,7
<b>Uréia -</b>	19.2
<b>Creatinina -</b>	1,59

**Fonte:** modificado de MITRUKA e RAWNSLEY (1977).

### **4.3.7 Exames laboratoriais**

#### **4.3.7.1 Hemograma**

A hematimetria, a contagem de plaquetas e a leucometria total de células foi realizada pelo método manual, técnica do hemocitômetro (LIN *et al.*, 2000).

A contagem diferencial de leucócitos e a avaliação da morfologia dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas, foi realizada através de esfregaços sangüíneos, corados pelo método Romanowsky (JAIN, 1993), com corante hematológico instantâneo.

#### **4.3.7.2 Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA)**

Para a determinação da atividade da alanina aminotransferase (ALT)<sup>10</sup> foi utilizado o método UV otimizado. A fosfatase alcalina (FA)<sup>11</sup> no soro foi quantificada por meio do método otimizado para determinação cinética da mesma.

#### **4.3.7.3 Uréia e Creatinina**

A dosagem das proteínas totais no soro foi determinada pelo método colorimétrico - Biureto<sup>12</sup>. A albumina sérica foi determinada por meio do método cinético<sup>13</sup> e a dosagem de globulina foi obtida pelo resultado da subtração entre as proteínas totais e a albumina.

---

<sup>10</sup> Kit para determinação sérica de ALT/-Gold analisa®

<sup>11</sup> Kit para determinação sérica de FA/ Gold analisa®

<sup>12</sup> Kit para determinação sérica de uréia – Gold Analisa®

<sup>13</sup> Kit para determinação sérica de creatinina – Gold Analisa®

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Prevalência Parasitária

Todos os peixes examinados apresentaram parasitismo por larvas de nematóides, de espécies não identificadas pertencentes aos gêneros *Eustrongylides* e *Contracaecum*. Dentre os peixes examinados e parasitados foram registradas prevalências de 16,78% (25/149) para peixes parasitados somente por *Contracaecum* sp., 1,34% (2/149) somente por *Eustrongylides* sp. e 81,88% (122/149) com infecções mistas por larvas de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp.. O parasitismo na musculatura esquelética por larvas de *Contracaecum* sp. foi registrado em 5 cacharas (3,35 %) e no mesentério em 147 cacharas (98,65%), já para larvas de *Eustrongylides* sp., 50 cacharas (33,55 %) apresentaram na musculatura esquelética e 117 (78,52 %) no mesentério. A intensidade média de infecção foi de 15,42  $\pm$ 24,48 larvas/peixe para *Contracaecum* sp. e de 6,37  $\pm$ 9,26 larvas/peixe para *Eustrongylides* sp. O peso dos peixes examinados variou de 1,9 a 10,5 kg, sendo o peso médio estimado em 5,59  $\pm$ 2,13 kg; o comprimento total variou de 63,5 cm a 105 cm, com média estimada em 82,39  $\pm$  9,6 cm (Tabela 3).

**Tabela 3** - Intensidade média de infecção e prevalência do parasitismo por larvas de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp. em cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) coletados do rio Cuiabá, MT, durante o período de outubro de 2004 a abril de 2006.

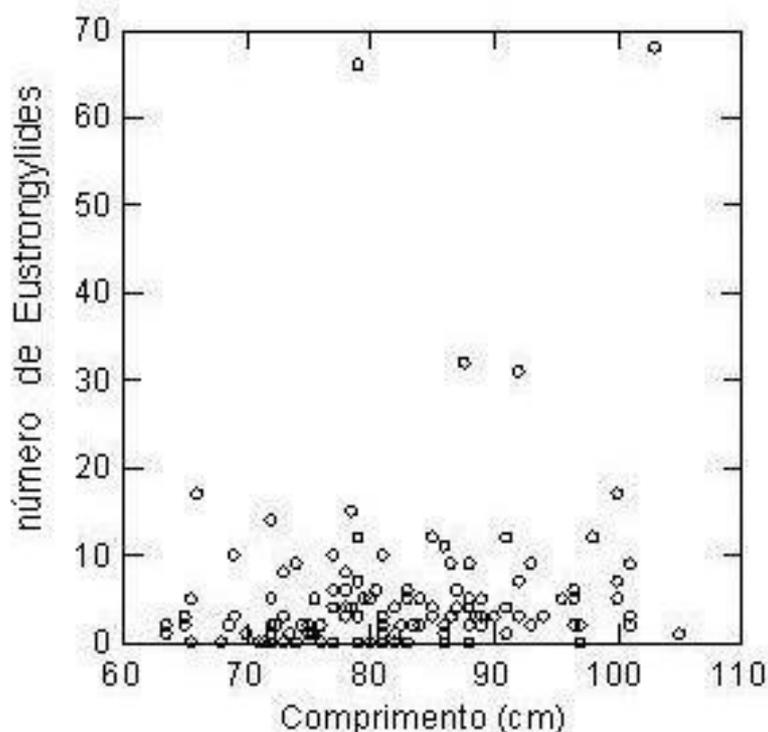
Parasito	Intensidade Média de infecção	Amplitude de intensidade de infecção	Prevalência (%)	N total de larvas
<i>Contracaecum</i> sp.	15,42 ( $\pm$ 24,48)	1-138	99,33	2282
<i>Eustrongylides</i> sp.	6,37 ( $\pm$ 9,26)	1-68	83,22	790

Não houve correlação significativa entre o comprimento do peixe e a intensidade de infecção de *Contracaecum* ( $r_s = -0,141$ ;  $p > 0,05$ ) e entre o

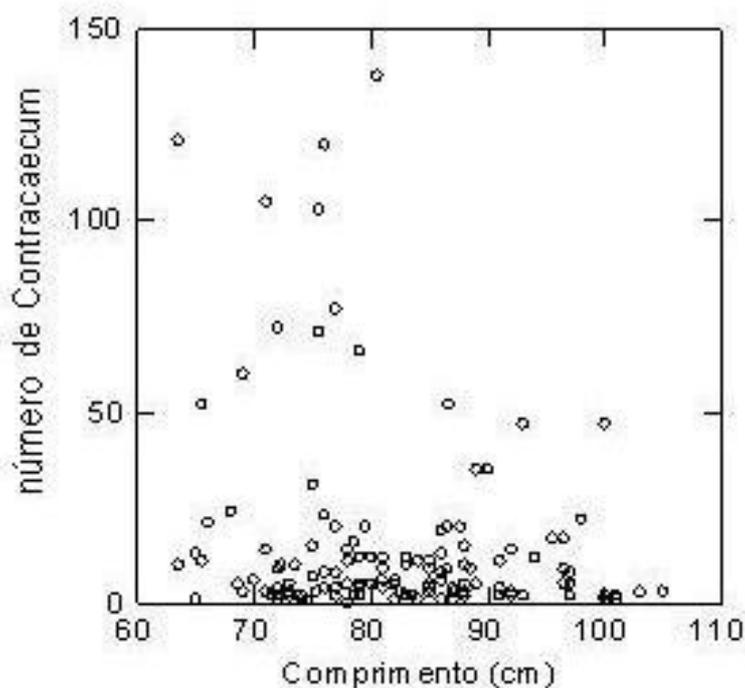
comprimento do peixe e a intensidade de infecção de *Eustrongylides* ( $r_s=0,269$ ;  $p>0,05$ ).

A relação entre o peso e o comprimento do cachara pode ser descrita pela equação:  $P=0,00001 \cdot C^{3,068}$  ( $R^2=0,90$ ;  $N=149$ ). O fator de condição relativo estimado a partir desta relação não foi significativamente correlacionado tanto com a intensidade de infecção de *Contracaecum* ( $r_s=0,09$ ;  $p=0,271$ ), quanto com a intensidade de infecção de *Eustrongylides* ( $r_s=0,05$ ;  $p=0,488$ ) (Figuras 9 e 10).

Espécimes representativos de larvas coletadas durante este trabalho, foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) com os seguintes números: CHIOC 35505 (*Contracaecum* sp.) e CHIOC 35506 (*Eustrongylides* sp.).



**Figura 9** - Relação entre o comprimento do cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e a intensidade de infecção por *Eustrongylides* sp..



**Figura 10** - Relação entre o comprimento do cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e a intensidade de infecção por de *Contracaecum* sp..

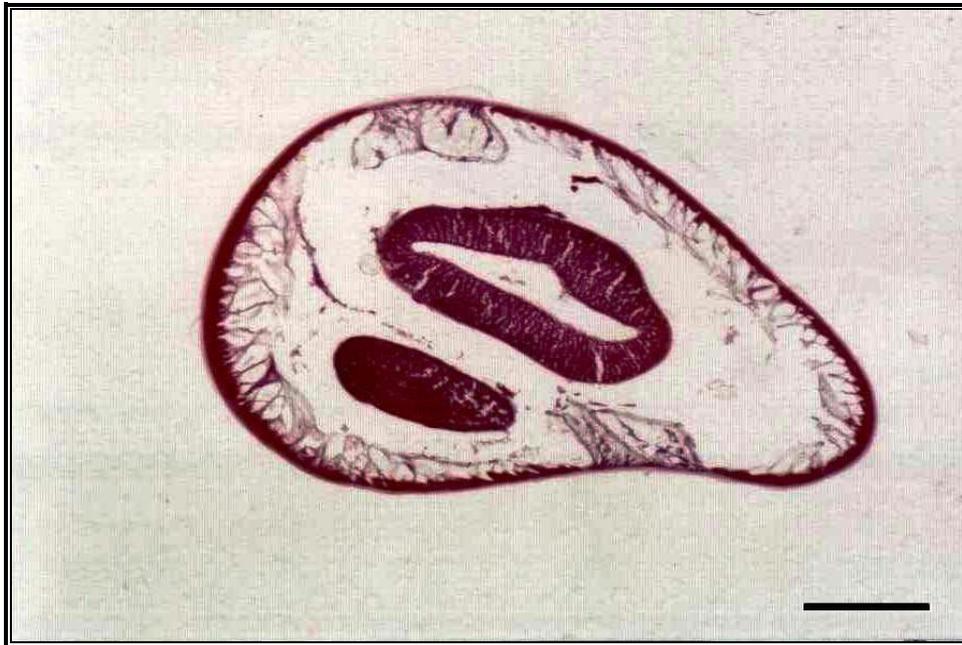
## 5.2 Avaliação *in vitro*

Após uma hora de contato com o óleo essencial de citronela, apenas quatro larvas permaneceram vivas na placa T 1, revelando eficácia de 60% na ação larvicida deste produto.

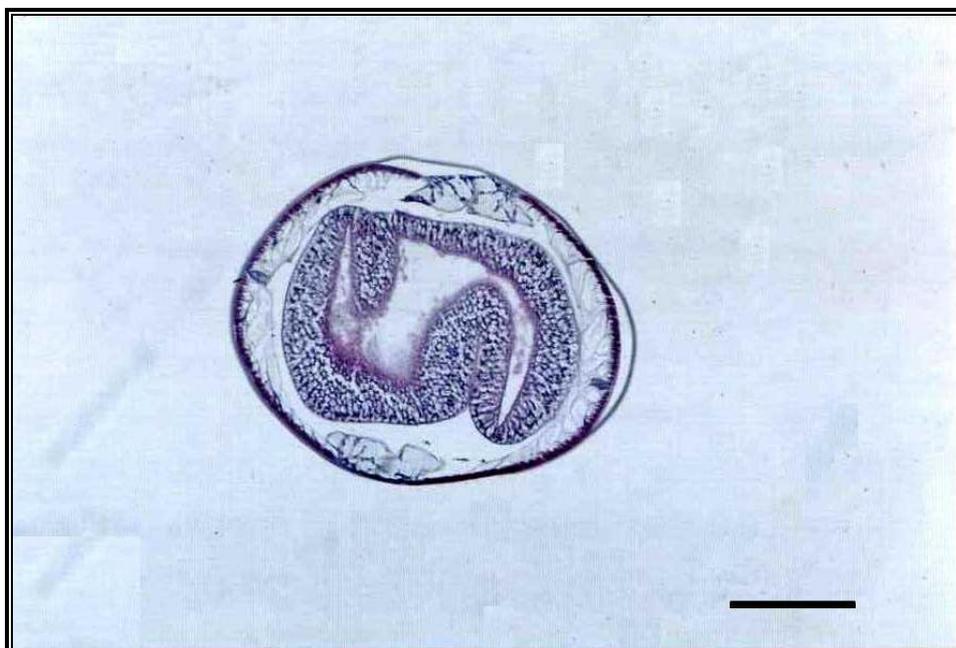
Após decorridas 2 (duas) horas foi examinada a placa T 2. Constatando-se que todas as larvas estavam mortas. As placas T 3 e T 4 foram examinadas respectivamente com 3 (três) e 4 (quatro) horas após o início do experimento, assim como observado na placa T 2, todas as larvas estavam mortas. Foi observado, um aumento do volume corporal das larvas em espessura. As larvas da placa controle permaneceram viáveis com motilidade e integridade estrutural inalteradas durante todo o período do experimento.

A avaliação microscópica, demonstrou que o óleo essencial de citronela causou ruptura cuticular e lise da parede intestinal, com eventual projeção de órgãos para a parte externa do parasito, produzindo eventuais

protuberâncias, que foram mais evidentes no decorrer de cada hora observada (Figuras 11 - 14).



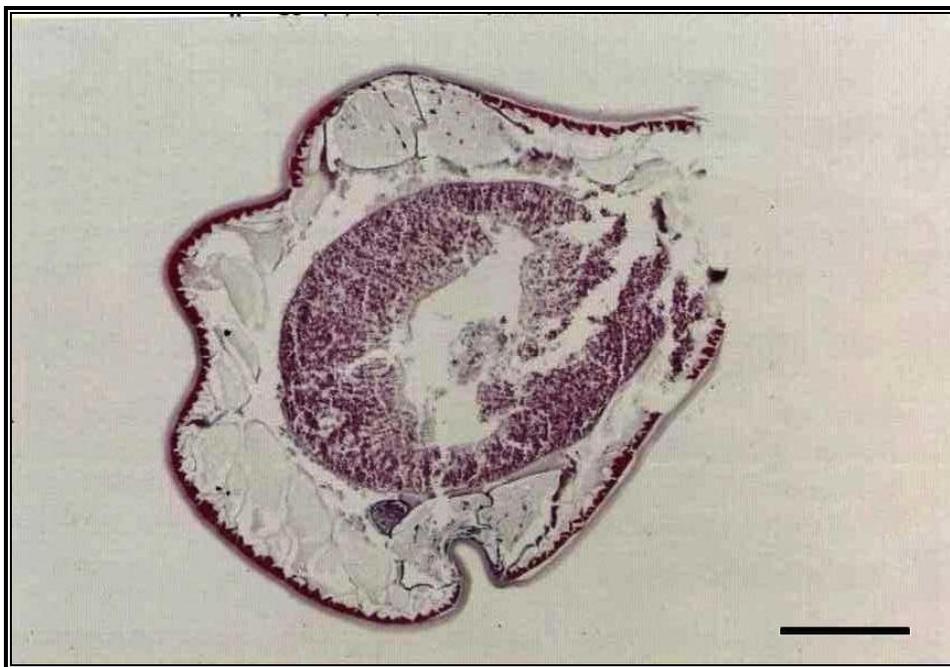
**Figura 11** - Corte transversal de larva ( $L_3$ ) de *Contracaecum* sp. (grupo controle), demonstrando integridade cuticular e de órgãos internos, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2  $\mu$ m)



**Figura 12** - Corte transversal de larva ( $L_3$ ) de *Contracaecum* sp., após decorrida 1 hora em contato com o óleo de citronela, demonstrando uma leve perda na aderência cuticular, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2  $\mu$ m)



**Figura 13** - Corte transversal de larva (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp., após decorridas 2 horas em contato com o óleo de citronela, demonstrando perda total na aderência cuticular, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 μm)



**Figura 14** - Corte transversal de larva (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp., após decorridas 4 horas em contato com o óleo de citronela, demonstrando lise de parede intestinal e ruptura cuticular, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2 μm)

Através da comparação da taxa de mortalidade das larvas de *Contracaecum* sp., foi demonstrada a eficiência do tratamento com Citronela em relação aos parasitos não tratados ( $p=0,04$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Taxa de mortalidade das larvas (L<sub>3</sub>) de *Contracaecum* sp., verificados a cada hora, em contato com o óleo essencial de Citronela.

Tempo (horas)	Número de larvas	Número de larvas
	vivas / %	mortas / %
1	4 (40)	6 (60)
2	0 (0)	10 (100%)
3	0 (0)	10 (100%)
4	0 (0)	10 (100%)

Todas as larvas destinadas à identificação taxonômica, foram diagnosticadas como larvas de *Contracaecum* sp. em terceiro estágio de desenvolvimento.

À cromatografia gasosa constatou-se que os principais compostos presentes no óleo essencial de citronela, utilizado para o experimento *in vitro*, foram o geraniol, citronelal e o citronelal.

### 5.3 Avaliação *in natura*

O GCG foi considerado livre de doenças baseado no conjunto de achados do exame clínico e exames complementares que apresentaram resultados dentro dos padrões de normalidade, tendo em vista tais valores, foi possível observar que os dados hematológicos apresentados pelo GCC, não caracterizaram toxicidade da planta sobre o organismo dos animais. Estes dados podem ser melhor analisados nas Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

**Tabela 5** – Achados hematológicos de eritrograma, de coelhos do Grupo Controle Geral (GCG).

<b>ERITROGRAMA (GCG)</b>				
<b>PARÂMETROS</b>	<b>Machos Controle Geral</b>			
	<b>Animal 1</b>	<b>Animal 2</b>	<b>Animal 3</b>	<b>Animal 4</b>
<b>Hemácias (x 10<sup>6</sup>)</b>	5,6	5,9	Coagulado	4,9
<b>Hematócrito (%)</b>	12,4	13,0	Coagulado	10,8
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	39	41	Coagulado	34
<b>VGM μ<sup>3</sup></b>	69,7	69,5	Coagulado	69,4
<b>CHGM g/dl</b>	31,8	31,7	Coagulado	31,7

**Tabela 6** - Achados hematológicos de leucograma, de coelhos do Grupo Controle Geral (GCG).

<b>LEUCOGRAMA</b>									
<b>Leucócitos (x 10<sup>3</sup>)</b>									
	5,0		7,9		Coagulado		1,9		
<b>CONTAGEM DIFERENCIAL</b>									
	Relat.	Abs	Relat.	Abs	Relat.	Abs	Relat.	Abs	
	%		%		%		%		
Bastonetes (%)	0	0	0	0	Coagulado	0	0	0	
Neutrófilos (%)	40	2,0	35	2,8	Coagulado	44	0,8		
Eosinófilos (%)	0	0	0	0	Coagulado	0	0		
Basófilos (%)	0	0	0	0	Coagulado	0	0		
Linfócitos (%)	55	2,7	58	4,6	Coagulado	56	1,1		
Monócitos (%)	5	0,3	7,0	0,5	Coagulado	0	0		
<b>Plaquetas x10<sup>3</sup></b>	378		Agregados		Coagulado		270		
<b>Ptn plasm g/dl</b>	6,6		8,4		Coagulado		6,0		

Relat.= Relativo.

Abs. = Absoluto.

Ptn plasm = proteínas plasmáticas.

**Tabela 7** - Achados hematológicos de eritograma, de coelhos do Grupo Controle Citronela (GCC).

<b>ERITROGRAMA (GCG)</b>				
<b>PARÂMETROS</b>	<b>Machos Controle Citronela</b>			
	<b>Animal 1</b>	<b>Animal 2</b>	<b>Animal 3</b>	<b>Animal 4</b>
<b>Hemácias (x 10<sup>6</sup>)</b>	6,0	4,6	4,6	7,1
<b>Hematócrito (%)</b>	13,4	10,2	10,2	15,9
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	42	32	32	50
<b>VGM μ<sup>3</sup></b>	70	69,5	69,5	70,5
<b>CHGM g/dl</b>	31,9	31,8	31,8	31,8

**Tabela 8** - Achados hematológicos de leucograma, de coelhos do Grupo Controle Citronela (GCC).

<b>LEUCOGRAMA</b>								
<b>Leucócitos (x 10<sup>3</sup>)</b>	5,3		5,4		2,7		4,7	
<b>CONTAGEM DIFERENCIAL</b>								
	Relat. %	Abs	Relat. %	Abs	Relat. %	Abs	Relat. %	Abs
Bastonetes (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutrófilos (%)	22	1,5	42	3,7	40	2,32	47	2,7
Eosinófilos (%)	1	0,1	0	0	3	0,1	2	0,1
Basófilos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfócitos (%)	72	4,9	54	4,8	59	3,42	50	2,4
Monócitos (%)	6	0,4	4	0,4	1	0,05	4	0,2
<b>Plaquetas x10<sup>3</sup></b>	504		Agregados		Agregados		468	
<b>Ptn plasm g/dl</b>	6,6		4,6		4,4		6,2	

Relat.= Relativo

Abs. = Absoluto

Ptn plasm = proteínas plasmáticas.

**Tabela 9** - Dosagem sérica de uréia e creatinina e avaliação das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) em coelhos do Grupo Controle Geral (GCG).

Bioquímico	Achados			
	ANIMAL 1	ANIMAL 2	ANIMAL 3	ANIMAL 4
URÉIA mg/dl	40	39	36	21
CREATININA mg/dl	1,3	2,0	1,4	1,3
ALT u/ml	31	52	38	17
FOSFATASE u/l	101	109	172	28

**Tabela 10** - Dosagem sérica de uréia e creatinina e avaliação das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) em coelhos do Grupo Controle Citronela (GCC).

Bioquímico	Achados			
	ANIMAL 1	ANIMAL 2	ANIMAL 3	ANIMAL 4
URÉIA mg/dl	42	34	40	29
CREATININA mg/dl	1,6	1,8	1,5	1,7
ALT u/ml	27	25	39	33
FOSFATASE u/l	47	36	62	26

Os animais dos grupos teste (GT1, GT2 e GT3) foram sacrificados e necropsiados com intervalos regulares de 24 horas, a fim de verificar a ação diária da citronela *in natura* sobre as larvas de *Contraecum* sp. previamente inoculadas nos grupos.

Durante a execução da necropsia do GCP e dos Grupos Teste (GT1, GT2 e GT3) foram encontradas tanto larvas soltas quanto aderidas em diferentes locais do trato gastrointestinal (Tabela 11). Muitas larvas apresentavam-se vivas (Tabela 12) foi possível observar uma larva aderida ao peritônio (Figuras 15 e 16). Macroscopicamente, observou-se que as larvas aderidas à mucosa do intestino causaram hiperemia local, com bordos elevados principalmente nos locais onde havia mais de uma larva aderida. À microscopia óptica, observou-se reação inflamatória composta por

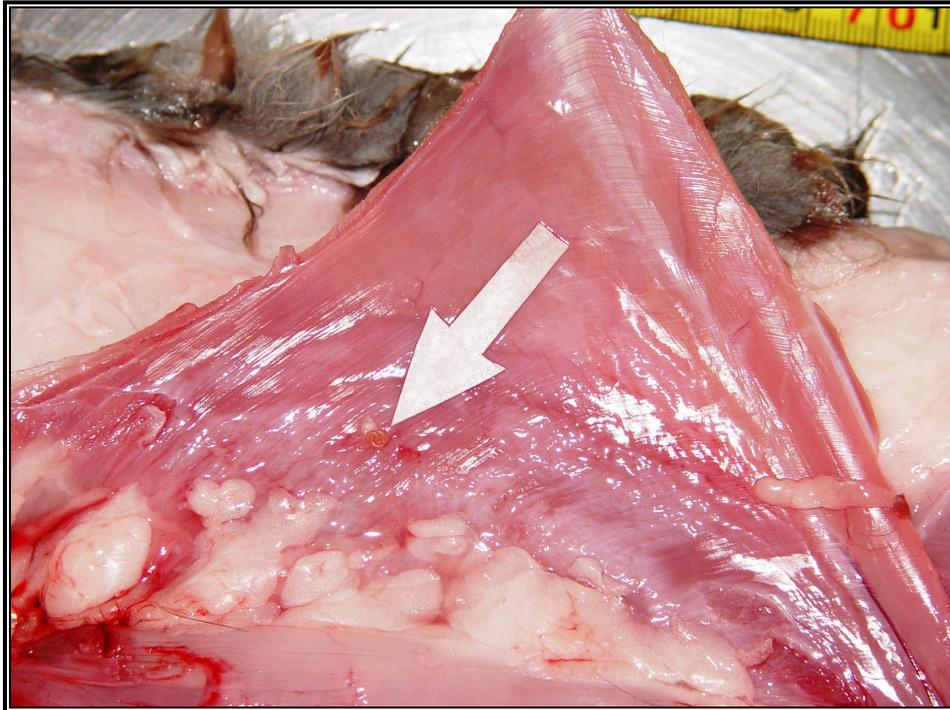
eosinófilos e neutrófilos, além de espessamento de submucosa por edema e infiltrado polimorfo nuclear (Figuras 17 - 19).

**Tabela 11** - Número total de larvas de *Contracaecum* sp. recuperadas no período pós-infecção de coelhos dos grupos teste (GT1, GT2 e GT3) e Grupo Controle Parasitado (GCP).

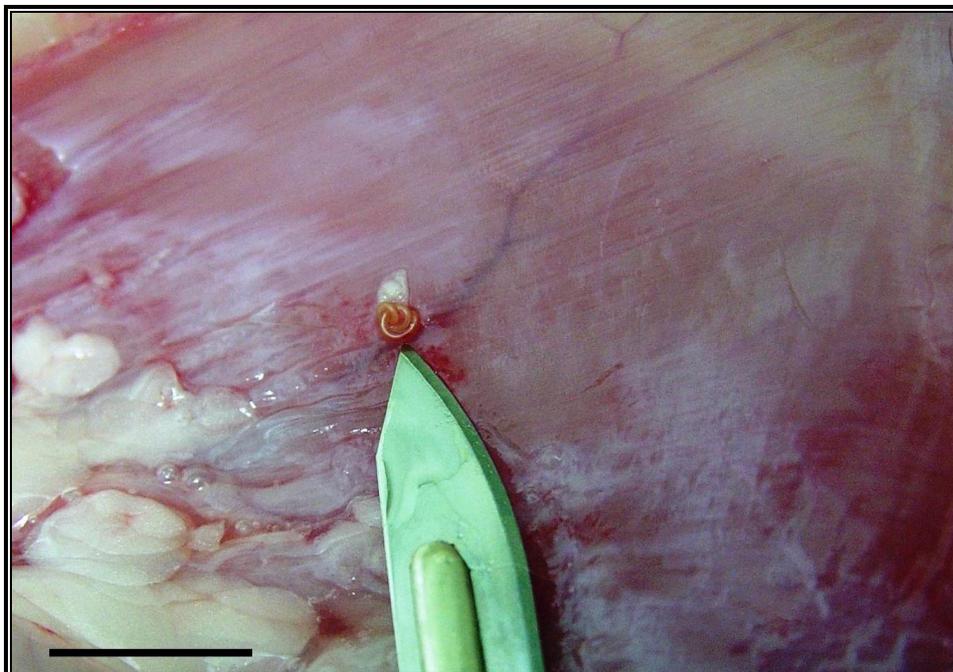
Período pós infecção (dias)	Grupos				Total
	GCP	GT1	GT2	GT3	
D1	28	11	13	13	65
D2	10	23	20	20	73
D3	8	14	15	14	51
D4	8	18	19	23	68
<b>total</b>	<b>54</b>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>70</b>	<b>257</b>

**Tabela 12** - Avaliação da ação da citronela *in natura*, sobre larvas de *Contracaecum* sp. em coelhos infectados experimentalmente.

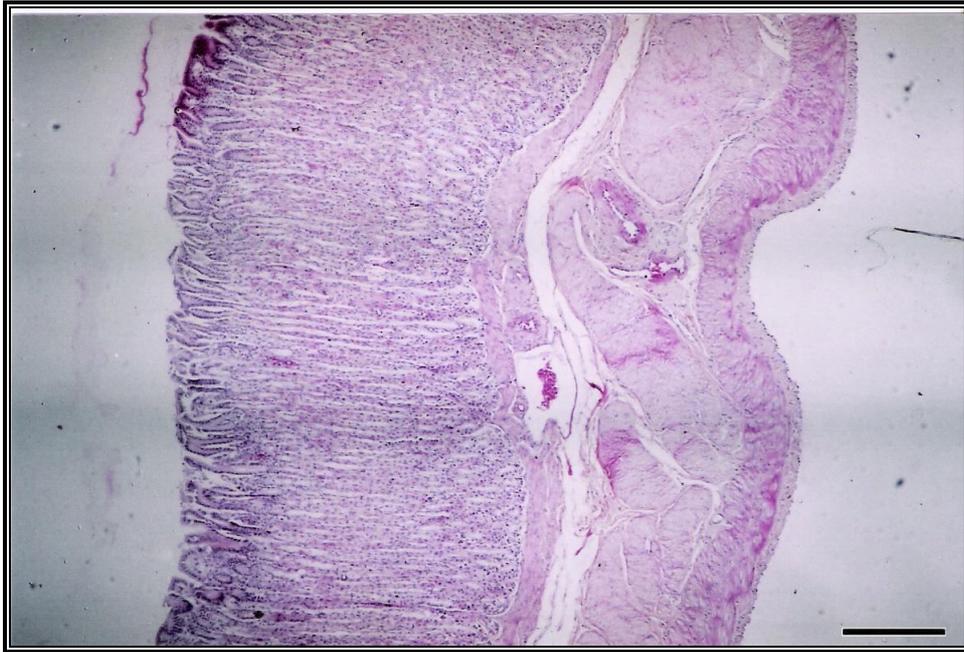
Dia	Grupos							
	GCI		GT1		GT2		GT3	
	Solta	Aderida	Solta	Aderida	Solta	Aderida	Solta	Aderida
1º	3	25	3	8	4	9	1	11
2º	4	6	4	19	5	15	5	15
3º	8	0	2	12	2	14	2	12
4º	4	4	1	17	3	16	10	13



**Figura 15** – Vista panorâmica da cavidade peritoneal, com destaque para larva ( $L_3$ ) de *Contracaecum* sp. aderida ao peritônio de um coelho infectado experimentalmente, em exame pós-morte 48 horas pós-infecção.



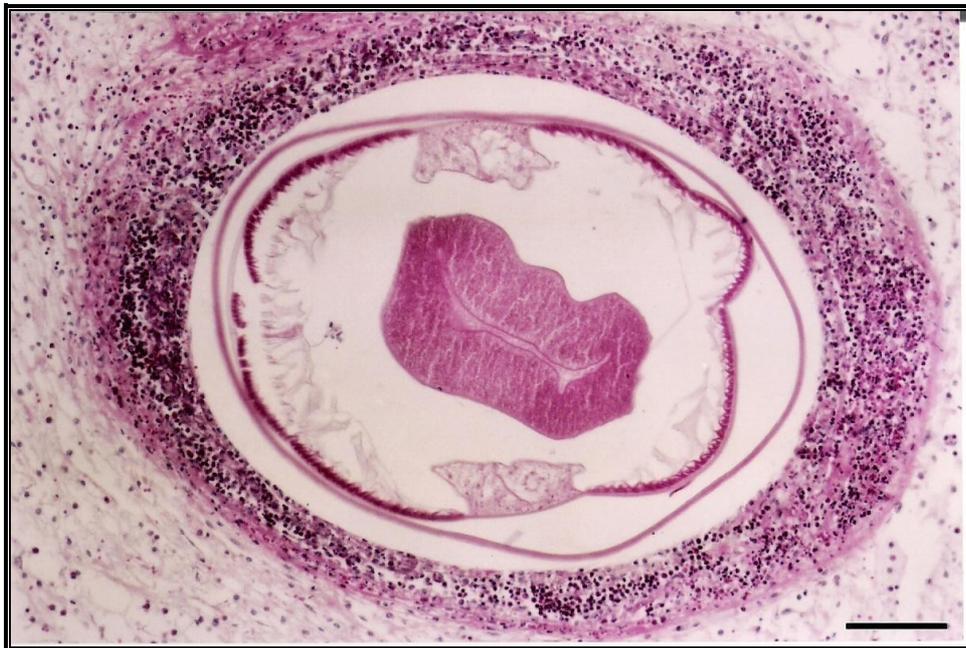
**Figura 16** - Larva ( $L_3$ ) de *Contracaecum* sp. aderida ao peritônio de um coelho infectado experimentalmente, em exame pós-morte 48 horas pós-infecção. (barra = 0,5 cm)



**Figura 17** – Corte histológico de estômago de coelho (grupo controle geral), sem alterações histológicas, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2  $\mu$ m)



**Figura 18** - Corte histológico de estômago de coelho (Grupo Teste), com de larva de *Contracaecum* sp. localizada na submucosa, circundada por reação inflamatória composta por eosinófilos e neutrófilos, com espessamento de submucosa por edema e infiltrado polimorfonuclear, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 2  $\mu$ m)



**Figura 19** – Corte histológico de estômago de coelho (Grupo Teste), com de larva de *Contracaecum* sp. localizada na submucosa, circundada por reação inflamatória composta por eosinófilos e neutrófilos, corado por Hematoxilina-Eosina. (barra = 5  $\mu$ m)

## 6 DISCUSSÃO

Larvas de nematóides em peixes capturados do Rio Cuiabá, foram inicialmente descritas por TRAVASSOS *et al.* (1927) *apud* REGO e VICENTE (1988), em relatório referente à excursão científica à região de Porto Jofre em 1922. No entanto o parasitismo por larvas de nematóides em cacharas provenientes do Rio Cuiabá, só foi descrito posteriormente por VICENTE *et al.* (1985) e EIRAS e REGO (1988), com registro desta espécie como um novo hospedeiro para *Contracaecum* sp. por EIRAS e REGO (1989). O reduzido número de peixes examinados por aqueles autores e a ausência de análises de correlações, dificultam as discussões com o atual trabalho. No entanto para o presente estudo, foram registradas prevalências de 100% para o parasitismo por *Eustrongylides* sp. e *Contracaecum* sp. no mesentério dos peixes examinados, o que é um dado compatível com a prevalência registradas em outros estudos.

O parasitismo por larvas de *Eustrongylides* sp. no mesentério de cacharas, foi também registrado por SANTOS *et al.* (2004) nos Rios Miranda, Aquidauana e Paraguai, MS, com registros de prevalência de 100%. O parasitismo por *Contracaecum* sp. em outras espécies de peixes dulcícolas e marinhos tem sido estudada por diversos autores, também encontrando altas prevalências nos peixes examinados (BARROS, 1994; SÃO CLEMENTE *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2000; SILVA e SÃO CLEMENTE, 2001, MADI e SILVA, 2005).

A influência do tamanho do hospedeiro sobre a composição qualitativa e quantitativa das infrapopulações parasitárias é um ponto bastante investigado, como observado por ADRIANO *et al.* (2006), que durante o período de realização de seu estudo observaram que a prevalência do parasito estudado, não era afetada pelo tamanho do hospedeiro, pela estação do ano ou pelas propriedades da água. No entanto SAAD-FAARES e COMBES (1992), LUQUE *et al.* (1996) e SILVA *et al.* (2000) alertam para que generalizações sejam evitadas, considerando-se que LO *et al.* (1998) observaram em seu experimento, uma relação positiva

entre o tamanho e a idade do hospedeiro e o tamanho da população de parasitos. O parasitismo não necessariamente aumenta nos peixes mais velhos, devido ao maior tempo de exposição às infecções, não tendo sido observada, neste trabalho, nenhuma correlação significativa entre o comprimento do peixe e a intensidade de infecção de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp.

No óleo essencial de citronela utilizado no experimento *in vitro*, foram detectados, à cromatografia gasosa, o citronelol e o geraniol na sua composição, à semelhança dos resultados obtidos por MATSUDA e SURGEONER (1996) e SCHANEBERG e KHAN (2002), porém o citronelal, composto presente em maior quantidade no óleo essencial comercial, não foi descrito por estes autores.

Para o teste *in vitro* realizado neste trabalho, foi utilizado o óleo essencial de citronela puro, o que justifica a ação larvicida em menor espaço de tempo, quando comparado aos resultados obtidos por HIERRO *et al.* (2004) que em seu experimento utilizaram o geraniol e o citronelol, além de outros compostos monoterpênicos, sobre larvas de *Anisakis simplex* em três diferentes concentrações, onde observaram que o geraniol e o citronelol concentrados, causaram a morte total das larvas em quatro horas de ação do produto. Os nematóides testados neste e no trabalho de HIERRO *et al.* (2004) pertencem a mesma família porém, de gêneros e espécies diferentes. Isto também deve ser considerado na obtenção de tempos diferentes de resistência ao produto utilizado.

A citronela *in natura* não apresentou ação sobre as larvas de *Contracaecum* sp., em coelhos experimentalmente infectados, entretanto não existem precedentes na literatura de testes similares ao realizado neste trabalho. Porém HIERRO *et al.* (2006) testou a ação larvicida de alguns derivados monoterpênicos *in vivo*, utilizando-se de camundongos, onde observaram a eficácia extrato alcoólico de citronelol na concentração de 46,90 mg associado a 0,5 ml de óleo de oliva. Porém, deve-se considerar que o resultado obtido nesse experimento deva estar diretamente relacionado a biologia do hospedeiro, bem como do parasito utilizados.

Ao avaliar os grupos pelo teste de chi-quadrado, considerando-se a proporção de helmintos inoculados e recuperados observou-se que houve uma diferença significativa entre o GCP e demais grupos apenas no primeiro dia, para os demais dias essa diferença não foi clara ( $p=0,12$ ). Os resultados apresentados nas repetições dos grupos são homogêneos e aceitáveis. Não foram observados resultados semelhantes nos testes *in vivo* e *in vitro* realizados neste trabalho, no entanto estes resultados devem ser analisados, considerando-se a existência de inúmeras variáveis, que podem influenciar na ação da planta, quando testada *in vivo*, e que não estão presentes no teste *in vitro*, como por exemplo a interferência da fisiologia do hospedeiro sobre a ação do princípio ativo e também o comportamento das larvas que no hospedeiro encontram-se com a abertura oral obstruída, em virtude da fixação à mucosa do trato gastrointestinal, dificultando deste modo a ingestão do princípio ativo, o que não é observado no teste *in vitro*, no qual as larvas estão com a abertura oral desobstruída. Diferenças entre teste *in vivo* e *in vitro* foram também observados por IQBAL *et al.* (2006), que testaram a ação antihelmíntica do tabaco (*Nicotiana tabacum*) contra nematóides gastrointestinais de ovelhas, observando menor eficácia do produto *in vivo* quando comparado com o teste *in vitro*, assim como, EKANEM *et al.* (2004a), avaliando, o efeito de extratos crus de feijão mucuna e mamão papaia sobre o protozoário parasito de peixe, *Ichthyophthirius multifiliis*, em condições *in vivo* e *in vitro*, observaram um significativo efeito dose dependente no experimento *in vivo* com redução da população de parasitos, variando de 59% a 92%, já *in vitro*, observou 100% de eficácia. apresentando uma redução de 90%, após 6 horas de contato com os extratos.

## 7 CONCLUSÕES

- Considerando-se a importância dos gêneros *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp. para saúde pública, os resultados aqui apresentados sugerem risco para a população consumidora, quando houver o consumo de carne crua, mal passada ou defumada a frio de cachara e/ou traíra contaminada;

- O óleo essencial de citronela puro é eficaz contra as larvas de *Contracaecum* sp. quando utilizado sob a forma *in vitro*, no entanto o isolamento do(s) princípio(s) ativo(s) ainda se faz necessário em futuras investigações;

- Novos estudos utilizando-se a citronela devem ser feitos para a investigação de variáveis que possam interferir na ação larvicida da planta *in natura*;

- Dados sobre espécies de peixes mais parasitadas e métodos de diagnóstico visual do parasitismo, devem ser divulgados de forma simples e objetiva à população consumidora, principalmente para as espécies consumidas em pratos a base de peixe cru.

## 8 REFERÊNCIAS

Acha PN, Szyfres B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2ª ed. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud; 1986. (OPAS - Publicación Científica, 503).

Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS. *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructure. **Parasite** 2006; 13(2): 137-42.

Allen TC. Hematoxylin and eosin. In: Prophet EB et al., editors. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1992. p. 53-8.

Almeida MAO, Botura MB, Santos MM, Alemeida GN, Domingues LF, Costa SL, Batatinha MJM. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Capim-Santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Rev Bras Parasit Vet** 2003; 12(3): 125-29.

Amato JFR, Boeger WP, Amato SB. **Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado**. Seropédica: Imprensa Universitária, UFRRJ; 1991.

Antunes SA, Dias ERA. *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos estocados resfriados e seu consumo cru em São Paulo, SP. **Hig aliment** 1994; 8(31): 41-2.

Armas de Conroy G. Investigaciones sobre la fagicolosis en lisas (Mugilidae) de aguas americanas. I. Estudios taxonómicos de *Phagicola* sp. (Trematoda-

Heterophyidae) en mugílideos sudamericanas. **Rev Ibér Parasitol** 1986; 46(1): 39-46.

Audicana L, Audicana MT, Fernández de Corres L, Kennedy MW. Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. **Vet Rec** 1997; 140(9):235

Barros GC. Larvas de anisakídeos de peixes economicamente importantes da costa do Rio de Janeiro. **Rev Bras Med Vet** 1994; 16: 205-8.

Barros LA, Amato SB. Infecções experimentais em gatos, *Felis domestica*, com metacercárias de *Phagicola longus*. **Rev Univ Rural Sér Ciênc da Vida** 1995; 17(2): 49-54.

Barros LA. **Aspectos patológicos observados nas infecções experimentais de aves piscívoras e mamíferos com metacercárias de *Phagicola longus* (Ranson, 1920) Price, 1932 (Digenea, Heterophyidae). Seropédica.** Rio de Janeiro; 1993.[Tese de mestrado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro].

Barros LA, Moraes-Filho J, Oliveira RL. Dados preliminares sobre a presença de parasitos com potencial zoonótico em peixes de importância econômica provenientes do rio Cuiabá. In: **Anais do Encontro Internacional de Negócios de Pecuária**; 2004 nov 24-28; Cuiabá, (BR). Cuiabá: Famato, 2004a.

Barros LA, Moraes-Filho J, Oliveira RL. Parasitos com potencial zoonótico em peixes de importância econômica provenientes do rio Cuiabá. In: **Anais do XIII Encontro de Iniciação Científica**: 2005 jul 28-29; Cuiabá, (BR). Cuiabá: PROPeq; 2005. p. 370.

Barros LA, Tortelly R, Pinto RM, Gomes DC. Effects of experimental infections with larvae of *Eustrongylides ignotus* Jäegerskiöld, 1909 and *Contraecum multipapillatum* (Drasche, 1882) Baylis, 1920 in rabbits. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2004b; 56(3): 325-32.

Birrie H, Balcha F, Erko B, Bezuneh A, Gameda N. Investigation into the cercariacidal and miracidiacidal properties of Endod (*Phytolacca dodecandra*) berries (type 44). **East Afr Med J** 1998; 75(5):311-14.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 116, de 8 de agosto de 1996. dispõe sobre normas para estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 agosto. 1996.

Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n.º. 3, de 17 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue. S.D.A./M.A.A. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.14-16, 24 de janeiro de 2000, Seção I.

Britski HA, Silimon KZS, Lopes BS. **Peixes do pantanal: manual de identificação**. Brasília, DF: EMPRAPA-SPI; Corumbá: EMBRAPA-CPAP; 1999.

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets Ecology on its own terms: Margolis *et al.*, revisited. **J Parasitol** 1997; 83: 575-83.

Carlini EA, Contar J de DP, Silva-Filho AR, da Silveira-Filho NG, Frochtengarten ML, Bueno OF. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J Ethnopharmacol** 1986; 17(1):37-64.

Cheng, T.C. **CRC Handbook series in Zoonosis: Parasitic Zoonosis.** Boca Raton: CRC Press; 1982. Anisakiasis; p. 37-54.

Chieffi PP, Gorla MCO, Vieira Torres DMAG, Dias RM, Mangini AC, MONTEIRO AV, Woiciechovski. Human infection by *Phagicola* sp. (Trematoda, Heterophyidae) in the municipality of Registro, São Paulo State, Brazil. **J Trop Med Hyg** 1992; 95(5):346-8.

Chieffi PP, Leite OH, Dias RMDS, Torres DMAV, Mangini ACS. Human parasitism by *Phagicola* sp. (Trematoda-Heterophyidae) in Cananéia, São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med trop S Paulo** 1990; 32(4): 285-288.

Chitwood M. Phocanema - type larval nematode coughed up by a boy in California. **Am J Trop Med Hyg** 1975; 24(4):710-1.

Cuende E, Audicana MT, Garcia M, Anda M, Fernandez Corres L, Jimenez C, Vesga JC. Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. **Clin Exp Rheumatol** 1998; 16(3):303-4.

de Mendonça FA, da Silva KF, dos Santos KK, Ribeiro Junior KA, Sant'Ana AE. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia** 2005; 76(7-8):629-36.

Dias ERA, Woiciechovsky E. Ocorrência de *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos e no homem, em Registro e Cananéia, SP. **Hig aliment** 1994; 8(31): 43-6.

Dias RM, Mangini AC, Torres D, Velloso S, Silva RM, Silva MI. Introdução de *Clonorchis sinensis* por imigrantes do leste asiático no Brasil e a suspensão da obrigatoriedade de exames laboratoriais para obtenção de vistos de permanência. **Rev Bras Anal Clin** 1992; 24(2):29-30.

Doi R, Inoue K, Gomi T, Sumi S, Yamaki K, Maetani S, Tobe T, A case of Anisakiasis as a cause of ileum obstruction. **Dig Surg** 1989; 6: 218-20.

Eberhard ML, Hurwitz H, Sun A, Coletta D. Intestinal perforation caused by larval *Eustrongylides* (Nematoda: Dioctophymatoidea) in New Jersey. **Am J Trop Med Hyg** 1989; 40(6):648-50.

Eduardo MBP, Sampaio JLM, Gonçalves EMN, Castillo VLP, Randi AP, Thiago C, Pimentel EP, Pavanelli EI, Colleone RP, Vigilato MAN, Marsiglia DAP, Atui MB, Torres DMAGV. *Diphyllobothrium* spp.: um parasita emergente em São Paulo, associado ao consumo de peixe cru - sushis e sashimis, São Paulo, março de 2005. **Bol Epidemiol Paulista** 2005a; (15): 1-5.

Eduardo MBP, Sampaio JLM, Susuki E, César MLVS, Gonçalves EMN, Castillo VL, Albuquerque ALSR, Pavanello EI, Vigilato MAN, Lírio VS, Mantesso IS, Zenebon O, Marsiglia DAP, Atui MB, Rodrigues RSM, Rodrigues RMMS, Torres DMAGV, Latorre WC, Fortaleza CMCB. Investigação epidemiológica do surto de Difilobotríase, São Paulo, Maio de 2005. **Bol Epidemiol Paulista** 2005b; (17): 1-12.

Eiras JC; Rego AA. Histopatologia da parasitose de peixes do Rio Cuiabá (Mato Grosso) por larvas de *Eustrongylides* sp. (Nematoda, Dioctophymidae). **Rev Brasil Biol** 1988; 48: 273- 280.

Eiras JC, Rego AA. Histopatologia em peixes resultantes de infecções parasitárias. **Public Inst Zool Dr. Augusto Nobre** 1989; (208): 1-12.

Ekanem AP, Obiekezie A, Kloas W, Knopf K. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitol Res** 2004a; 92(5):361-6.

Ekanem AP, Wang M, Simon JE, Obiekezie AI, Morah F. *In vivo* and *in vitro* activities of the seed extract of *Piper guineense* Schum. and Thonn. against skin and gill monogenean parasites of gold fish (*Arassius auratus auratus*). **Phytother Res** 2004b; 18(10):793-7.

Emmel VE, Inamine E, Secchi C, Brodt TCZ, Amaro MCO, Cantarelli VV *et al.* *Diphyllobothrium latum*: relato de caso no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2006; 39(1): 82-4.

Fasakin EA, Aberejo BA. Effect of some pulverised plant materials on the developmental stages of fish beetle, *Dermestes maculatus* Degeer in smoked catfish (*Clarias gariepinus*) during storage. **Bioresour Technol** 2002; 85(2):173-7.

Feldman DB, Seely JC. **Necropsy guide: rodents and the rabbit**. New York: CRC Press Inc.; 1988.

Garcia D, Escalante M, Delgado R, Ubeira FM, Leiro J. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components vimang and mangiferin. **Phytother Res** 2003; 17(10):1203-8.

Githiori JB, Høglund J, Waller PJ, Baker RL. Evaluation of anthelmintic properties of extracts from some plants used as livestock dewormers by pastoralist and smallholder farmers in Kenya against Heligmosomoides polygyrus infections in mice. **Vet Parasitol** 2003; 118(3-4):215-26.

Guerin PF, Marapendi S, McGrail L, Moravec CL, Schiller EL. Intestinal perforation caused by larval *Eustrongylides* – Maryland. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 1982; 31(28):383-4, 389.

Hall GM, editor. **Fish Processing Technology**. New York: VCH Publisher; 1997.

Hartwich G. Keys to genera of the Ascaridoidea. In: Anderson et al., editores. **CIH keys to the nematode parasites of vertebrates**. UK; Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal; 1974. p. 1–15.

Hierro I, Valero A, Navarro MC. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l.. **Phytomedicine** 2006; 13(7):527-31.

Hierro I, Valero A, Pérez P, González P, Cabo MM, Montilla MP, Navarro MC. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L<sub>3</sub> larvae. **Phytomedicine** 2004; 11(1):77-82.

Huss HH. **Fresh fish: quality and quality changes**. Rome: DANIDA; 1988.

Hutton RF. Preliminary notes on trematoda (Heterophyidae and Strigeoidea) encystede in heart and flesh of Florida mullet, *Mugil cephalus* L. and *M. curema* Cuvier & Valenciennes. **Bull Dade Co Med Assoc** 1957; 27(3): 29-30.

Iqbal Z, Lateef M, Jabbar A, Ghayur MN, Gilani AH. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activit of *Nicotiana tabacum* L. leaves against gastrointestinal nematodes of sheep. **Phytother Res** 2006; 20(1): 46-8.

Jain NC. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Blackwell Publishing Limited; 1993.

Juglard R, Granier H, Talarmin B, Croq M. L'anisakidose: une parasitose méconnue liée à l'ingestion du poisson cru ou fume. **Rev Prat Méd Gén** 1998; (415): 26-8.

Kates S, Wright KA, Wright RA. A case of human infection with the cod nematode *Phococonema* sp. **Am J Trop Med Hyg** 1973; 22(5): 606-8.

Kliks MM. Anisakiasis in the Western United States: four new case reports from California. **Am J Trop Med Hyg** 1983; 32: 526-32.

Leite OH, Higaki Y, Serpentine SL, Carvalho SA, Amato Neto V, Torres DM, Dias RM, Chieffi PP. Infecção por *Clonorchis sinensis* em imigrantes asiáticos no Brasil: tratamento com praziquantel. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1989; 31(6): 416-22.

Lichtenfels JR, Brancato FP. Anisakid larva from the throat of an alaskan eskimo. **Am J Trop Med Hyg** 1976; 25: 691-3.

Lin DS, Huang FY, Chiu NC, Koa HA, Hung HY, Hsu CH, Hsieh WS, Yang DI. Comparison of hemocytometer leukocyte counts and standard urinalysis for predicting urinary tract infections in febrile infants. **Pediatr Infect Dis J** 2000; 19(3):223-7.

Little MD, MacPhail J. Large nematode larva from the abdominal cavity of a man in Massachusetts. **Am J Trop Med Hyg** 1972; 21: 948-50.

Little MD, Most H. Anisakid larva from the throat of a woman in New York. **Am J Trop Med Hyg** 1973; (22): 609-12.

Lo CM, Morand S, Galzin R. Parasite diversity/host age and size relationship in three coral-reef fishes from French Polynesia. **Int J Parasitol** 1998; 28(11): 1695-708.

López Serrano MC, Gomez AA, Daschner A, Moreno Ancillo A, de Parga JM, Caballero MT, Barranco P, Cabanas R. Gastroallergic anisakis: Findings in 22 patients. **J Gastroent Hepatol** 2000; 15(5):503-6.

Luque JL. Distribución transversal y asociaciones interespecíficas en las comunidades de metazoários ectoparasitos de peces esciénidos marinos del Peru. **Rev Biol Trop** 1996; 44: 383-90.

Madi RR, Silva MSR. *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae): o parasitismo relacionado à biologia de três espécies de peixes piscívoros no reservatório do Jaguari, SP. **Rev Bras Zociênc Juiz de Fora** 2005; 1: 15-24.

Massoud AM, El Ebiary FH, Abd Salam NL. Effect of myrrh extract on the liver of normal and bilharzially infected mice. An ultrastructural study. **J Egypt Soc Parasitol** 2004; 34(1): 1-21.

Mateo ES, Guzman EL, Pena GD. Las lisas de la laguna de Médio Mundo de Huacho: Presencia e metacercárias de *Ascocotyle (P.) arnoldoi*, com revision del gênero y redescription de la espécie. **Bol Lima** 1985; (37): 86-96.

Matsuda BM, Surgeoner GA, Heal JD, Tucker AO, Maciarelo MJ. Essential oil analysis and field evaluation of the citrosa plant "*Pelargonium citrosum*" as a repellent against populations of *Aedes* mosquitoes. **J Am Mosq Control Assoc** 1996; 12(1):69-74.

Mitruka BM, Rawnsley HM. **Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals**. New York: Masson Publ., 1977.

Muguruma N, Okamura S, Okahisa T, Shibata H, Ito S, Terauchi A. *Anisakis* larva involving the esophageal mucosa. **Gastrointest Endosc** 1999; 49(5):653-4.

Narr LL, O'Donnell JG, Libster B, Alessi P, Abraham D. Eustrongylidiasis – A parasitic infection acquired by eating live minnows. **J Am Osteopath Assoc** 1996; 96(7):400-2.

Okumura MPM, Pérez ACA, Espíndola Filho A. Principais zoonoses parasitárias transmitidas por pescado – revisão. **Revista Educação Continuada do CRMV-SP** 1999; 2(2): 66-80.

Oshima T. Anisakiasis – Is the sushi bar guilty? **Parasitol Today** 1987; 3(2): 44-8.

Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto R M. **Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá EDUEM; 1998.

Pavanelli GC. Tem Bicho!. **Aruanã**, Manaus, 1994 out 1; 58-62.

Prophet EB. Fixation. In: Prophet EB et al., editors. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1992. p. 29-31.

Rego AA, Vicente JJ. Excursão científica à zona do pantanal, Estado de Mato Grosso, para coleta de helmintos. **Ciênc Cultura** 1988; 40(1): 65-8.

Rogério AP, Sá-Nunes A, Albuquerque DA, Anibal FF, Medeiros AI, Machado ER, Souza AO, Prado JC Jr, Faccioli LH. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocaríasis. **Parasite Immunol** 2003; 25(7):393-400.

Saad-Fares A, Combes C. Abundance/host size relationships in a fish 7trematode community, **J Helminthol** 1992; 66: 187-92.

Sanderson L, Bartlett A, Whitfield PJ. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **J Helminthol** 2002; 76(3): 241-247.

Santos FLN, Faro LB. The first confirmed case of *Diphyllbothrium latum* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2005; 100(6): 685-6.

Santos SM, Rêgo RF, Adriano E A et al. Helmintos em peixes do pantanal matogrossense: quarta expedição do programa pantanal. In: **Anais do VIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos**; 2004, out 19-22; Laguna (BR). Laguna: Unisul; 2004. p. 71.

São Clemente SC, Marques MC, Serra-Freire NM, Lucena FP. Análise do parasitismo de peixe espada *Trichiurus lepturus* (L.) do litoral do Rio de Janeiro – Brasil. **Parasitol al Dia** 1995; 19: 146-9.

São Clemente SC, Silva CM; Lucena FP. Sobrevivência de larvas de anisakídeos de peixe espada *Trichiurus lepturus* (L.), submetidos aos processos de salmouragem e cocção. **Rev Bras Ciênc Vet** 1996; 3(3): 79-80.

São Clemente SC, Uchoa CMA, Serra Freire NM Larvas de anisakídeos em *Pagrus pagrus* (L.) e seu controle através de baixas temperaturas. **Rev Bras Ciênc Vet** 1994; 1: 21-4.

Schaneberg BT, Khan IA. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. **J Agric Food Chem** 2002; 50(6):1345-9.

Shirasaka D, Hosooka T, Murakami K. Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. **Dig Dis Sci** 1996; 41: 2362-5.

Shirazian D, Schiller EL, Glaser CA, Vonderfecht SL. Pathology of larval *Eustrongylides* in rabbit. **J Parasitol** 1984; 70(5):803-6.

Silva CM, São Clemente SC. Nematóides da família Anisakidae e cestóides da ordem Trypanorhyncha em filés de dourado (*Coryphaena hippurus*) e ariocó (*Lutjanus synagris*) e sua importância na inspeção de pescado/Nematode larvae and cestoda in fillets of *L. synagris* and *Coryphaenae hippurus*. **Hig Aliment** 2001; 15(80-81): 75-9.

Silva LO, Luque JL, Alves DR, Paraguassú AR. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do peixe-espada *Trichiurus lepturus* Linnaeus (Osteichthyes, Trichiuridae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev Bras Zocienc Juiz de Fora** 2000; 2(2): 115-33.

Syvagnaname N, Kalyanasundaram M. Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2004; 99(1): 115-118.

Takabe K, Ohki S, Kunihiro O, Sakashita T, Endo I, Ichikawa Y, Sekido H, Amano T, Nakatani Y, Suzuki K, Shimada H. Anisokidosis: a cause of intestinal obstruction from eating sushi. **Am J Gastroenterol** 1998; 93(7):1172-3.

Thatcher VE, Neto JB. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. **Rev Bras Med Vet** 1994; 16(3): 111-28.

Torres P, Pequeno G, Figueroa L. Nota preliminar sobre Anisakidae (Railliet y Henry, 1912) Skrajabin y Karokhin, 1945 em alguns peces de consumo habitual por la población humana de Valdivia (Chile). **Bol Chil Parasitol** 1978; 33(1-2):39-46.

Vazzoler AEM. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM; 1996.

Vicente JJ, Pinto RM. Nematóides do Brasil. Nematóides de peixes. Atualização: 1985-1998. **Rev Bras Zool** 1999; 16: 561-610.

Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC. Nematóides do Brasil. Parte I: Nematóides de peixes. **Atas Soc Biol Rio de Janeiro** 1985; (25): 1-88.

Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM. Nematóides do Brasil: Parte IV: Nematóides de aves. **Rev Bras Zool** 1995; 12(1): 1-273.

Vidal-Martinez VM, Osório-Sarabia D, Overstreet RM. Experimental infection of *Contraecium multipapillatum* (Nematoda:Anisakinae) from México in domestic cat. **J Parasitol** 1994; 80(4):576-9.

Vieira LS, Cavalcante ACR. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesq Vet Bras** 1999; 19(3-4): 99-103.

Wittner M, Turner JW, Jacquette G, Ash LR, Salgo MP, Tanowitz HB. Eustrongylidiasis – a parasitic infection acquired by eating sushi. **N Engl J Med** 1989; 320(17):1124-6.

Wolff FH, Lavinsky M, Wolff CH. Parasitoses adquiridas pela ingestão de alimentos exóticos. **GED** 1999; 18(4): 151-8.

Wong KKY, Signal FA, Champion SH, Motion RL. Citronella as an insect repellent in food packaging. **J Agric Food Chem** 2005; 53(11):4633-6.

**ANEXO 1:** Barros LA, Oliveira RL, Moraes-Filho J, Justino CHS, Mateus LAF, Análise do parasitismo por *Contracaecum* sp. (Raillet & Henry, 1912) e *Eustrongylides* sp. (Jägerskiöld, 1909) em cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linnaeus, 1766) (Pisces: Pimelodidae) provenientes do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Rev Bras Med Vet** 2006; (No prelo).

**Análise do parasitismo por *Contraecum* sp. (Raillet & Henry, 1912) e *Eustrongylides* sp. (Jägerskiöld, 1909) em cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linnaeus, 1766) (Pisces: Pimelodidae) provenientes do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.**

**Analys of the parasitism by *Contraecum* sp. (Raillet & Henry, 1912) and *Eustrongylides* sp. (Jägerskiöld, 1909) in cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linnaeus, 1766) (Pisces: Pimelodidae) from Cuiabá river, Mato Grosso, Brazil.**

Luciano Antunes Barros\*, René Luiz de Oliveira\*, Jonas Moraes Filho\*, Christiano Henrique da Silva Justino\* e Lúcia Aparecida de Fátima Mateus\*\*

**Resumo:**

Cento e quarenta e nove espécimes de cacharas foram capturados do Rio Cuiabá, durante o período de outubro de 2004 a abril de 2006, para análise do parasitismo por larvas de nematóides. Encontrou-se prevalência de 100% destes peixes parasitados por larvas de *Contraecum* sp. e/ou *Eustrongylides* sp. A análise do parasitismo foi feita por registro da prevalência e localização das larvas encontradas. Cinco cacharas (3,35 %) apresentaram parasitismo por larvas de *Contraecum* sp. na musculatura esquelética e cento e quarenta e sete (98,65%) no mesentério. Cinquenta cacharas (33,55 %) apresentaram larvas de *Eustrongylides* sp. na musculatura esquelética e cento e dezessete (78,52 %) no mesentério. A intensidade média de infecção foi de 15,42 larvas/peixe para *Contraecum* sp. e de 6,37 larvas/peixe para *Eustrongylides* sp. O peso médio dos peixes examinados foi de 5,59 kg (1,9-10,5 kg) e o comprimento total médio de 82,39 cm (63,5-105 cm). Não foi observada correlação entre parâmetros biométricos como comprimento total e peso dos hospedeiros e a intensidade de infecção.

**Palavras-chave:** *Contraecum*, *Eustrongylides*, *Pseudoplatystoma*, Cachara.

**Abstract:**

One hundred and forty-nine cacharas specimens were captured from Cuiabá river, between october of 2004 to april of 2006, intending to analyse the parasitism by nematode larvae. The prevalence was 100% to parasitism by *Contraecum* sp. and/or *Eustrongylides* sp. larvae. The analysis of the parasitism were done by prevalence record and the localization of the larvae founded. Five cacharas (3,35 %) presented parasitism by *Contraecum* larvae in the skeletal muscle and one hundred and forty-seven (98,65 %) on the mesenterium. Fifty cacharas (33,55%) presented *Eustrongylides* sp. larvae in the skeletal muscle and one hundred seventeen (78,52%) on the mesenterium. The mean intensity of infection was 15,42 larvae/fish for *Contraecum* sp. and 6,37 larvae/fish for *Eustrongylides* sp. The average of weight to the examined fishes was 5,59 kg (1,9-10,5 kg) and the average of the total length was 82,39 cm (63,5-105 cm). Correlation between biometric parameters as host's total length and weight and the intensity of infection was not observed.

**Key-words:** *Contraecum*, *Eustrongylides*, *Pseudoplatystoma*, Cachara.

---

\* Laboratório de Parasitologia Veterinária, Departamento de Produção Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UFMT, Av. Fernando Corrêa s/n, Coxipó, Cuiabá, MT, CEP 78069-900, [labarros@terra.com.br](mailto:labarros@terra.com.br)

\*\* Laboratório de Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros, Instituto de Biociências, UFMT. [lmateus@cpd.ufmt.br](mailto:lmateus@cpd.ufmt.br)

## Introdução:

Os peixes são excelentes hospedeiros intermediários e paratênicos de parasitos, os quais são transmitidos principalmente para aves piscívoras, que atuam como hospedeiros definitivos, resultando em relações ecológicas eficientes para a manutenção de ciclos biológicos (Vicente e Pinto, 1999; Vicente *et al.*, 1995). A participação do homem como hospedeiro acidental de algumas espécies de parasitos de peixes, cada vez mais tem chamado a atenção de pesquisadores e autoridades sanitárias no mundo inteiro, por determinarem problemas de saúde pública, em infecções decorrentes do consumo de carne de peixe crua ou mal cozida. Até o presente momento, não existem relatos destas parasitoses em humanos no Brasil, exceto para fagicolose, difilobotriose e clonorquiose (Chieffi *et al.*, 1990; Chieffi *et al.* 1992; Santos & Faro, 2005; Eduardo *et al.*, 2005a; Eduardo *et al.*, 2005b; Emmel *et al.* 2006; Leite *et al.*, 1989; Dias *et al.*, 1992). Acredita-se que isso se deva à falta de diagnóstico adequado e não à inexistência destas doenças no país. As principais medidas de prevenção são a inspeção correta e o uso de técnicas seguras de conservação por congelamento do pescado. Destaca-se também a importância da orientação do público consumidor, evitando-se a ingestão de pescados oriundos de áreas de risco.

Parasitos da família Anisakidae têm relevante importância em saúde pública, com descrição de infecções em pacientes humanos por larvas de *Anisakis* sp., resultando em perfurações gastrointestinais, quadros obstrutivos e reações alérgicas (Doi *et al.*, 1989; Audicana *et al.*, 1997; Cuende *et al.* 1998; López-Serrano *et al.* 2000).

Apesar de não haver relato bibliográfico da infecção em humanos por *Contracaecum* sp., experimentalmente mamíferos têm sido infectados, resultando em efeitos danosos ao organismo, indicando a possibilidade da importância zoonótica também para este parasito pertencente a família Anisakidae (Vidal-Martinez *et al.* 1994; Barros *et al.*, 2004).

A infecção por larvas de *Eustrongylides* sp. em pacientes humanos foi descrita por Eberhard *et al.* (1989) nos EUA, com relato de sintomatologia de dor abdominal e recuperação das larvas infectantes por meio de laparotomia exploratória.

Experimentalmente coelhos infectados com larvas de *Eustrongylides* apresentaram lesões gástricas por congestão e morte por peritonite Shirazian *et al.* (1984) e Barros *et al.* (2004).

O cachara é um dos peixes mais apreciados pela população em Mato Grosso, devido às suas características organolépticas, com importante potencial para produção. Este trabalho objetivou pesquisar a presença de larvas de nematóides neste hospedeiro, analisando-se dados de prevalência e correlação parasitária com parâmetros biométricos dos peixes examinados.

## Material e métodos:

A área de estudo utilizada foi o Rio Cuiabá, com coletas feitas na região do Município de Barão de Melgaço, localizado a 16°12'59.70" Sul e 55°57'51.79" Oeste, e também na região metropolitana de Cuiabá, incluindo os municípios de Várzea Grande e Cuiabá, MT, localizados aproximadamente a 15°35'46" Sul e 56°05'48" Oeste.

Cento e quarenta e nove espécimes de cacharas foram capturados, com uso de anzóis e redes, durante o período de outubro de 2004 a abril de 2006, visando a análise do parasitismo por larvas de nematóides.

Os peixes imediatamente após a captura, foram acondicionados em recipientes sob refrigeração e transportados até o Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFMT, onde foram medidos, pesados e necropsiados segundo metodologia descrita por Pavanelli *et al.* (1999). As larvas encontradas foram mantidas em placas de Petri, com solução salina fisiológica à 0,65% NaCl e posteriormente processadas, segundo metodologia descrita por Amato *et al.* (1991). A identificação taxonômica foi realizada segundo Vicente *et al.* (1999).

A correlação entre a intensidade de infecção de cada espécie de parasito e o comprimento do peixe e entre a intensidade de infecção e o fator de condição (K) foram testadas pelo coeficiente de correlação de Spermán (rs). O fator de condição foi estimado pelo quociente entre o peso observado e o peso esperado para um dado comprimento ( $K = P_{obs}/C^b$ ), sendo o valor de b estimado a partir da relação entre o peso e o comprimento:  $Peso = a \cdot C^b$ , e os coeficientes a e b estimados por regressão não linear.

Espécimes representativos das espécies encontradas, foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz, RJ.

Um espécime representativo da espécie utilizada como hospedeiro neste trabalho foi depositado na Coleção Zoológica de Vertebrados do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso.

Os peixes utilizados foram identificados segundo Britski *et al.* (1999).

Os conceitos foram utilizados segundo Bush *et al.* (1997).

## Resultados:

Todos os peixes examinados apresentaram parasitismo por larvas de nematóides, identificadas como espécies pertencentes aos gêneros *Eustrongylides* e *Contracaecum*. Dentre os peixes examinados e parasitados foram registradas prevalências de 16,78% (25) para peixes parasitados somente por *Contracaecum* sp., 1,34% (2) somente por *Eustrongylides* sp. e 81,88% (122) com infecções mistas por larvas de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp. Cinco cacharas (3,35 %) apresentaram parasitismo por larvas de *Contracaecum* sp. na musculatura esquelética e cento e quarenta e sete (98,65%) no mesentério. Cinquenta cacharas (33,55 %) apresentaram larvas de *Eustrongylides* sp. na musculatura esquelética e cento e dezessete (78,52 %) no mesentério. A intensidade média de infecção foi de 15,42 larvas/peixe ( $\pm 24,48$  larvas/peixe) para *Contracaecum* sp. e de 6,37 larvas/peixe ( $\pm 9,26$  larvas/peixe) para *Eustrongylides* sp. O peso dos peixes examinados variou de 1,9 a 10,5 kg, sendo o peso médio estimado em 5,59 kg ( $\pm 2,13$  kg); o comprimento total variou de 63,5 cm a 105 cm, com média estimada em 82,39 cm ( $\pm 9,6$  cm).

**Tabela 1.** Intensidade média de infecção e prevalência do parasitismo por larvas de *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp. em cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) coletados do rio Cuiabá, MT, durante o período de outubro de 2004 a abril de 2006.

Parasito	Intensidade Média de infecção	Amplitude de intensidade de infecção	Prevalência (%)	N total de larvas
<i>Contracaecum</i> sp.	15,42	1-138	99,33	2282
<i>Eustrongylides</i> sp.	6,37	1-68	83,22	790

Não houve correlação significativa entre o comprimento do peixe e a intensidade de infecção de *Contracaecum* ( $r_s = -0,141$ ;  $p > 0,05$ ) e entre o comprimento do peixe e a intensidade de infecção de *Eustrongylides* ( $r_s = 0,269$ ;  $p > 0,05$ ).

A relação entre o peso e o comprimento do cachara pode ser descrita pela equação:  $P = 0,00001 * C^{3,068}$  ( $R^2 = 0,90$ ;  $N = 149$ ). O fator de condição relativo estimado a partir desta relação não foi significativamente correlacionado tanto com a intensidade de infecção de *Contracaecum* ( $r_s = 0,09$ ;  $p = 0,271$ ), quanto com a intensidade de infecção de *Eustrongylides* ( $r_s = 0,05$ ;  $p = 0,488$ ).

Espécimes representativos de larvas coletadas durante este trabalho, foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) com os seguintes números: CHIOC 35505 (*Contracaecum* sp.) e CHIOC 35506 (*Eustrongylides* sp.).

Um espécime representativo de cachara foi depositado da Coleção Zoológica de Vertebrados do Instituto de Biociências da UFMT sob o número 0788.

## Discussão:

Larvas de nematóides em peixes capturados do Rio Cuiabá, foram inicialmente descritas por Travassos *et al.* (1927), em relatório referente à excursão científica à região de Porto Jofre em 1922. No entanto o parasitismo por larvas de nematóides em *P. fasciatum* provenientes do Rio Cuiabá, só foi descrito posteriormente por Vicente *et al.* (1985) e Eiras e Rego (1988), com registro desta espécie como um novo hospedeiro para *Contracaecum* por Eiras e Rego (1989). O reduzido número de peixes examinados por aqueles autores e a ausência de análises de correlações, dificultam as discussões com o atual trabalho. No entanto foram registradas prevalências de 100% para o parasitismo por *Eustrongylides* sp. e *Contracaecum* sp. no mesentério dos peixes examinados, o que é um dado compatível com a prevalência encontrada neste trabalho.

Dados sobre o parasitismo por larvas de *Eustrongylides* sp. no mesentério de cacharas, foram também registrados por Santos *et al.* (2004) no Rio Miranda, Aquidauana e Paraguai, MS, com registros de prevalência de 100% para este parasitismo nos peixes examinados.

A prevalência do parasitismo por *Contracaecum* sp. em outras espécies de peixes dulcícolas e marinhos tem sido estudada por diversos autores, também encontrando altas prevalências nos peixes examinados (Barros, 1994; São Clemente *et al.* 1994; Silva *et al.*, 2000; Silva e São Clemente, 2001, Madi e Silva, 2005).

A influência do tamanho do hospedeiro sobre a composição qualitativa e quantitativa das infrapopulações parasitárias é um ponto bastante investigado. No entanto SAAD-FAARES e COMBES (1992), LUQUE *et al.* (1996) e SILVA *et al.* (2000) alertam para que generalizações sejam evitadas. O parasitismo não necessariamente aumenta nos peixes maiores, devido ao maior tempo de exposição às infecções.

A análise do índice de condição do hospedeiro é um importante indicador quantitativo do grau de higidez ou de bem estar do peixe hospedeiro, sendo aqui utilizado como parâmetro de correlação com o parasitismo.

#### **Agradecimento:**

À FAPEMAT pelo apoio financeiro.

#### **Referências:**

- AMATO, J.F.R.; BOEGER, W.P.; AMATO, S.B. *Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado*. Imprensa Universitária, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil, p. 81, 1991.
- AUDICANA L.; AUDICANA, M. T. FERNÁNDEZ DE CORRES, L.; KENNEDY, M. W. Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *Veterinary Record*, v. 1, p. 235, 1997.
- BARROS, G. C. Larvas de anisakídeos de peixes economicamente importantes da costa do Rio de Janeiro. *Rev Bras Méd Vet*, v. 16, p. 205-208, 1994.
- BARROS, L. A.; TORTELLY, R.; PINTO, R. M.; GOMES, D. C. (2004) Effects of experimental infections with larvae of *Eustrongylides ignotus* Jäegerskiöld, 1909 and *Contraecaecum multipapillatum* (Drasche, 1882) Baylis, 1920 in rabbits. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 56, n 3, p. 325-332, 2004.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. *Peixes do pantanal: manual de identificação*. EMPRAPA-SPI, Brasília, DF, EMBRAPA-CPAP, Corumbá, MS, p. 184, 1999.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets Ecology on its own terms: Margolis *et al.*, revisited. *J Parasitol*, Lawrence, v. 83, p. 575-583, 1997.
- CHIEFFI P. P., GORLA, M. C. O., VIEIRA TORRES, D. M. A. G. *et al.* Human infection by *Phagicola* sp. (Trematoda-Heterophyidae) in the municipality of Registro, São Paulo State, Brazil. *J Med Hyg*. v. 95, p. 346-348, 1992.
- CHIEFFI, P.P., LEITE, O.H., DIAS R.M.D.S. *et al.* Human parasitism by *Phagicola* sp. (Trematoda-Heterophyidae) in Cananéia, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. v. 32, p. 285-288, 1990.
- CUENDE, E.; AUDICANA, M. T.; GARCIA, M. *et al.* Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. *Clin Exp Rheumatol*, v. 16, p. 303-304, 1998.
- DIAS, R. M.; MANGINI, A. C.; TORRES, D. *et al.* Introdução de *Clonorchis sinensis* por imigrantes do leste asiático no Brasil e a suspensão da obrigatoriedade de exames laboratoriais para obtenção de vistos de permanência. *Rev. Bras Anal Clin*. v. 24, n. 2, p. 29-30, 1992.
- DOI, R.; INOUE, K.; GOMI, T. *et al.* A case of Anisakiasis as a cause of ileum obstruction. *Dig Surg* v. 6, p. 218-220, 1989.

- EBERHARD, M. L.; HURWITZ, H., SUN, A.; COLETTA, D. 1989. Intestinal perforation caused by larval *Eustrongylides* (Nematodo: Dioctophymatoidea) in New Jersey. *Am Soc Trop Med Hig.* v.40. p. 648-650, 1989.
- EDUARDO, M.B.P.; SAMPAIO, J.L.M.; GONÇALVES, E.M.N. et al. *Diphyllobothrium* spp.: um parasita emergente em São Paulo, associado ao consumo de peixe cru-sushis e sashimis, São Paulo, março de 2005. *Bol Epidemiol Paulista*, n. 15, p. 1-5, 2005a.
- EDUARDO, M.B.P.; SAMPAIO, J.L.M.; SUSUKI, E. et al. Investigação epidemiológica do surto de Difilobotríase, São Paulo, Maio de 2005. *Bo Epidemiol Paulista*, n. 17, p. 1-12, 2005b.
- EIRAS, J. C.; REGO, A. A. Histopatologia da parasitose de peixes do Rio Cuiabá (Mato Grosso) por larvas de *Eustrongylides* sp. (Nematoda, Dioctophymidae), *Rev Brasil Biol*, v. 48, p. 273-280, 1988.
- EIRAS, J. C.; REGO, A. A. Histopatologia em peixes resultantes de infecções parasitárias. *Inst Zool Dr Augusto Nobre*, n.208, p. 1-12, 1989.
- EMMEL, V.E.; INAMINE, E.; SECCHI, C. et al. *Diphyllobothrium latum*: relato de caso no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 39, n. 1, p. 82-84, 2006.
- LE CREN, E. D. Observations on the growth of perch (*Perca fluviatilis* L.) over twenty-two years with special referent to the effects of temperatura and changes in population density. *J Anim Ecol.* v. 27, p. 287-334, 1958.
- LEITE, O.H.M.; HIGAKI, Y.; SERPENTINI, S.L.P. et al. Infecção por *Clonorchis sinensis* em imigrantes asiáticos no Brasil: tratamento com praziquantel. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.31, n.6, p. 416-422, 1989.
- LÓPEZ SERRANO, M. C.; GOMEZ, A. A.; DASCHNER, A. et al. Gastroallergic anisakias: Findings in 22 patients. *J Gastroent Hepatol*, v. 15, p. 503-506, 2000.
- LUQUE, J. L. Distribución transversal y asociaciones interespecíficas em lãs comunidades de metazoários ectoparasitos de peces esciënidos marinos del Peru. *Rev Biol Trop*, v. 44, p. p. 383-390, 1996.
- MADI, R. R.; SILVA, M. S. R, *Contraecaecum* Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae): o parasitismo relacionado 'a biologia de três espécies de peixes piscívoros no reservatório do Jaguari, SP, *Rev Bras Zoociênc Juiz de Fora*, v. 1, p. 15-24, 2005.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. EdUEM- Nupélia, Maringá, PR, p. 264, 1999.
- REGO, A.A.; VICENTE, J.J. Excursão científica à zona do pantanal, Estado de Mato Grosso, para coleta de helmintos. *Ciênc Cultura*. v. 40, n. 1, p. 65-68, 1988.
- SAAD-FARES, A. & COMBES, C. 1992. Abundance/host size relationships in a fish trematode community, *J Helminthol*, v. 66, p. 187-192.
- SANTOS, F.L.N.; FARO, L.B. The first confirmed case of *Diphyllobothrium latum* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 685-686, 2005.
- SANTOS, S. M.; RÊGO, R. F.; ADRIANO, E. A. et al. Helmintos em peixes do pantanal matogrossense: quarta expedição do programa pantanal. VIII EMBRAPOA. Anais....VIII EMBRAPOA, PA 053, 2004, Laguna, SC, *Proceedings...*, 2004. p. 71.
- SÃO CLEMENTE, S. C.; UCHOA, C. M. A.; SERRA FREIRE, N. M. Larvas de anisakídeos em *Pagrus pagrus* (L.) e seu controle através de baixas temperaturas. *Rev Bras Ciênc Vet*, v. 1, p. 21-24, 1994.
- SHIRAZIAN, D.; SCHILLER, E.L.; GLASER, C.A. et al. Pathology of larval *Eustrongylides* in rabbit. *J. Parasitol.* v. 70, p. 803-806, 1984.
- SILVA, C. M., SÃO CLEMENTE, S. C. 2001. Nematóides da família Anisakidae e cestóides da ordem Trypanorhyncha em filés de dourado (*Coryphaena hippurus*) e

ariocó (*Lutjanus synagris*) e sua importância na inspeção de pescado/Nematode larvae and cestoda in fillets of *L. synagris* and *Coryphaenae hippurus*. *Hig aliment*, v. 15, p. 75-79, 2001.

SILVA, L. O.; LUQUE, J. L.; ALVES, D. R. *et al.* Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do peixe-espada *Trichiurus lepturus* Linnaeus (Osteichthyes, Trichiuridae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Zoocienc Juiz de Fora*, v. 2, p. 115-133, 2000.

TRAVASSOS, L. P. Introdução ao estudo da helmintologia. *Ed da Rev Brasil Biol*. Rio de Janeiro. 169 p., 1950.

VICENTE, J.J.; PINTO, R. M. Nematóides do Brasil. Nematóides de peixes. Atualização: 1985-1998. *Rev Bras Zool*, v. 16, p. 561-610, 1999.

VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C. *et al.* Nematóides do Brasil. Parte IV: Nematóides de aves. *Rer. Bras Zool*, v. 12. p. 1-273, 1995.

VIDAL-MARTINEZ, V. M.; OSÓRIO-SARAIA, D.; OVERSTREET, R. M. Experimental infection of *Contraecum multipapillatum* (Nematoda:Anisakinae) from México in domestic cat. *J Parasitol*, v. 80, p. 576-579, 1994.

**ANEXO 2:** Justino CHS, Barros LA. *In vitro* evaluation of the resistance of the *Contraecum* sp. larvae (Nematoda: Anisakidae), to the essential oil of citronella (*Cymbopogon* sp). **Rev Bras Med Vet** 2006; (No prelo).

## Action *in vitro* of Citronella in nematodes

# IN VITRO EVALUATION OF THE RESISTENCE OF THE *Contraecaecum* sp. LARVAE (NEMATODA: ANISAKIDAE), TO THE ESSENTIAL OIL OF CITRONELLA (*Cymbopogon* sp.)

Christiano Henrique da Silva Justino\* and Luciano Antunes Barros<sup>†</sup>

Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Departamento de Produção Animal, Av. Fernando Corrêa da Costa, s/n, Cuiabá, MT, CEP 78068-000

### Abstract

The essential oil of citronella (*Cymbopogon* sp.) was used *in vitro* to assess its influence on the *Contraecaecum* sp. L3 larvae. The parameters investigated were the morphological integrity and motility of the larvae after being in contact with the product. The essential oil was very effective in its trade form killing all the larvae at the utmost in two hours. The damage caused to the larvae was evaluated with a microscope in histological cuts, where cuticular rupture and disintegration of the intestinal wall of the larvae were found. The results were analyzed through the use of a monocausal Fisher test to detect differences between the groups where the significance of  $p < 0,05$  was obtained.

**Key words:** *Contraecaecum* – Anisakidae – *Cymbopogon* – citronella

### Introduction

The consumption of the fish is, since old times, a common practice in many human populations, because it is easy to obtain and for its nutritional characteristics. Some cultures, however, have the habit of eating uncooked fish, having the risk of catching some diseases (SÃO CLEMENTE *et al.*, 1996; OKUMURA, *et al.*, 1999).

The study of the parasitic diseases transmitted through the consumption of fish meat, becomes essential from the sanitation and public health point of view, since man in several situations takes the role of an accidental host in the biological cycle of some parasites, such as *Eustrongilides ignotus*, *Anisakis simplex*, *Diphyllobotrium latum*, *Ascocotyle longa*, among others, many times with relevant clinical manifestations.

Lack of deeper knowledge about the methods of diagnosis and treatment; make these diseases caused by parasitosis more important in Veterinary Medicine and Public Health.

The anisakiose is considered the most common among the diseases by parasites transmitted by fish, deriving from the infection by *Anisakis* sp. larvae, after the intake of raw fish meat. The symptoms

presented may vary a lot, although the most common are the gastric pains, followed or not by vomit, which may progress to an acute abdominal syndrome, with abdominal pains, abnormal muscular tension and manifestations similar to appendicitis. The penetration of the mucosa of the gastrointestinal tract by the larvae, can lead to the formation of abscesses or granulomas eosinophilics, besides the gastro enteric ulcerations and eosinophilic colitis (SÃO CLEMENTE *et al.*, 1995; LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2000). The occurrence of alterations of hypersensitivity, with nettle rash and even anaphylaxis, have been reported in patients with a history of consumption of food with cooked fish, revealing the maintenance of the allergen potential in parasitic particles existent in the fish that is eaten. (OKOMURA *et al.*, 1999; LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2000).

For the State of Mato Grosso high prevalence of parasitism by the *Contraecaecum* sp. larvae, are verified in fish like piraputanga (*Brycon microlepis*), piranha (*Serrassalmus* sp.), cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), and traíra (*Hoplias malabaricus*) (REGO & VICENTE, 1988; BARROS *et al.*, 2004; MORAES-FILHO *et al.*, 2004).

\* chrisjustino@gmail.com

<sup>†</sup> labarros@terra.com.br

The action of the *Contraecum* sp. larvae upon the gastric mucosa of rabbits, infected for experiment, was shown by BARROS *et al.* (2004), describing the pathogenic potential of this nematode for mammals. These authors alert to the possibility of human infection, as described for *Anisakis* sp.

The use of alcoholic citronella compounds upon the *Anisakis* sp. larvae, was described in the *in vitro* test by HIERRO *et al.* (2004), observing the larvicide action after 4 (four) hours in contact with the product.

Aiming at getting to know about the use of citronella on other nematode of the Anisakidae family and the search for the use of alternative methods for the treatment of parasites transmitted by fish, this paper aims at testing the *in vitro* action of the essential oil of citronella on the *Contraecum* sp. larvae.

### Material and methods

For this study, 38 specimens of traíras (*Hoplias malabaricus*) from the district of Barão de Melgaço, MT were used. Right after they were caught, the fish were taken to the Laboratory of the Veterinary Parasitology-UFMT in thermal containers.

With a space of 12 hours at the most after catching the fish, post-mortem exams were done for the collection of *Contraecum* sp. larvae, in the guts, celomatic cavity and skeletal musculature of the fish that were examined using the techniques described by PAVANELLI *et al.* (1998), and later the musculature was "cut in slices" and examined with the help of a lighted table. After being collected, the larvae were put on Petri dishes, with physiologic solution (0,8% NaCl) to be evaluated for its viability, in a stereo microscope SZ-4045 (Olympus®).

The essential oil used in the experiment was bought in a chemist's shop (Fórmula Certa, Lote. N.º 000789), the levels of purity were guaranteed through sensorial and physical analyses that were normal, according to EML - Distribuidora Ely Martins.

The larvae separated for the experiment, were divided in six groups, each one containing 10 (ten) larvae and maintained in Petri plates. Four plates were identified as T 1 to T 4 (as test group), one plate as control group, and another last plate containing ten larvae for the confirmation of taxonomical diagnosis.

For each plate test, 5 (five) ml of the essential oil of citronella were added and the control group was maintained in the same

volume of physiologic solution (0,8% NaCl), later the plates were put in an incubator B.O.D. (Model 347 CD) with an average temperature of 28,4° C ( $\pm$  0,8° C ) and relative humidity of 62% ( $\pm$  4%).

At the end of each hour, one test plate was taken out of the B.O.D., and the larvae were washed with physiologic solution (0.8% NaCl), to interrupt the process of the action of the product. The larvae were examined through the stereomicroscope using the motility and structural integrity as parameter. The control group was also observed every hour during the whole experiment.

All the dead larvae were fixed in formalin 10%, and later processed according to the histological techniques described by PROPHET (1992). Then they were made into blocks of paraffin and cut in 5µm, width on a manual microtome (Microm HM 325), that were tinted by the hematoxilina-eosina technique (ALLEN, 1992). The exams to evaluate the possibility of microscopic damages and microphotographs were done by optical microscope BX 41 (Olympus®).

The larvae that were separated for taxonomic identification were fixed and processed according to the methodology described by AMATO *et al.* (1991) and identified according to HARTWICH (1974).

To evaluate the performance, among the treated groups and those untreated by the Citronella, the Fisher monocaual test was done, using the statistic program Epi Info™ 6.0.

### Results

After being in contact with the essential oil for one hour, only four larvae were alive on the citronella, T 1 plate showing a 60% effectiveness of the larvicide action of this product.

After two hours, the T 2. plate was examined and it was verifying that all the larvae were dead. The T 3 e T 4 plates were examined respectively with three and four hours after the beginning of the experience, and like what was observed on plate T 2, all the larvae were dead. An increase in body volume in thickness was observed. The larvae of the control plate remained viable with motility and structural integrity unaltered during the experimental period.

The microscopic evaluation showed that the citronella essential oil caused cuticular rupture and disintegration of the intestinal wall, with occasional projection of

the organs to the exterior part of the parasite, producing casual protuberances that were more evident after each hour.

Through the comparison of the mortality rate of the *Contracaecum* sp. larvae, the efficiency of the treatment with Citronella on the non-treated parasites ( $p=0,04$ ) was shown.

All the larvae reserved for the taxonomic identification were diagnosed as *Contracaecum* sp. larvae in the third stage of development.

### Discussion

In this work the product was used pure, which justifies the larvicide action in less time when compared to the results obtained by HIERRO *et al.* (2004) that used different monoterpenic products, diluted in different concentrations, on *Anisakis* sp. larvae observing total death of the larvae in four hours. Different results can be expected, not only due to the use of different parasite species.

The citronella essential oil is efficient against the *Contracaecum* sp. larvae, however, tests using different dilutions, as well as the search for isolation of the different compositions that form the pure essential oil, through the gaseous chromatography, are the reason for new investigation about the use of citronella components for the treatments of parasites of Anisakidae family.

### Acknowledgements

To Professor Dr. Edson Moleta Colodel for his help and the performing of the histological techniques. To professors Dra. Maria Luzinete A. Vanzeler and Dra. Cláudia Joseph Nehme for the technical support. To professor Dr. Sávio Amado for his help with the statistical analysis. To the Veterinarian Doctor Paula Rodrigues Pinto, for the help in the necropsies to get the larvae. To Odila Maria de Azevedo Watzel for the help in the English translation.

### Bibliographic References

Allen TC 1992. Hematoxylin and eosin. In EB Prophet; B Mills; JB Arrington *et al.*, Laboratory methods in histotechnology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, p. 53-58.

Amato JFR, Boeger WA, Amato, SB 1991. Protocolos para laboratório - coleta e processamento de parasitos do pescado, 1st ed., Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 81.

Barros LA, Tortelly R, Pinto RM *et al.* 2004. Efeitos de infecções experimentais em coelhos com larvas de *Eustrongylides ignotus* Jäegerskiold, 1909 e *Contracaecum multipapillatum* (Drasche, 1882) Baylis, 1920. Arq Bras Med Vet Zootec, 56(3): 325-332.

Hartwich G 1974. Keys to genera of the Ascaridoidea. In Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S, CIH keys to the nematode parasites of vertebrates N.º 2, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K., p. 1–15.

Hierro I, Valero A, Pérez P *et al.* 2004. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. Phytomedicine 11:77–82.

Moraes-Filho J, Oliveira RL, Barros LA Dados preliminares sobre a presença de parasitos com potencial zoonótico em peixes de importância econômica provenientes do rio Cuiabá. In: **Anais do Encontro Internacional de Negócios de Pecuária**; 2004 nov 24-28; Cuiabá, (BR). Cuiabá: Famato, 2004.

Okumura MPM, Pérez ACA, Espíndola Filho A 1999. Principais zoonozes parasitárias transmitidas por pescado – revisão. Revista educação continuada do CRMV-SP 2(2):66-80

Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM 1998. Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento. 1st ed. EDUEM, Maringá, 264pp.

Prophet EB 1992. Fixation. In EB Prophet; B Mills; JB Arrington *et al.*, Laboratory methods in histotechnology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, p. 29-31.

Rego AA, Vicente JJ 1988. Excursão científica à zona do Pantanal. Ciência e Cultura 40(1):65-68.

São Clemente SC, Marques MC, Serra-Freire NM *et al.* 1995. Análise do parasitismo de peixe espada *Trichiurus lepturus* (L.) do litoral do Rio de Janeiro – Brasil. Parasitol al Día 19: 146-9.

São Clemente SC, Silva CM, Lucena FP 1996 Sobrevivência de larvas de anisakídeos de peixe espada *Trichiurus lepturus* (L.), submetidos aos processos de salmouragem e cocção. Rev Bras Ciênc Vet 3(3): 79-80.

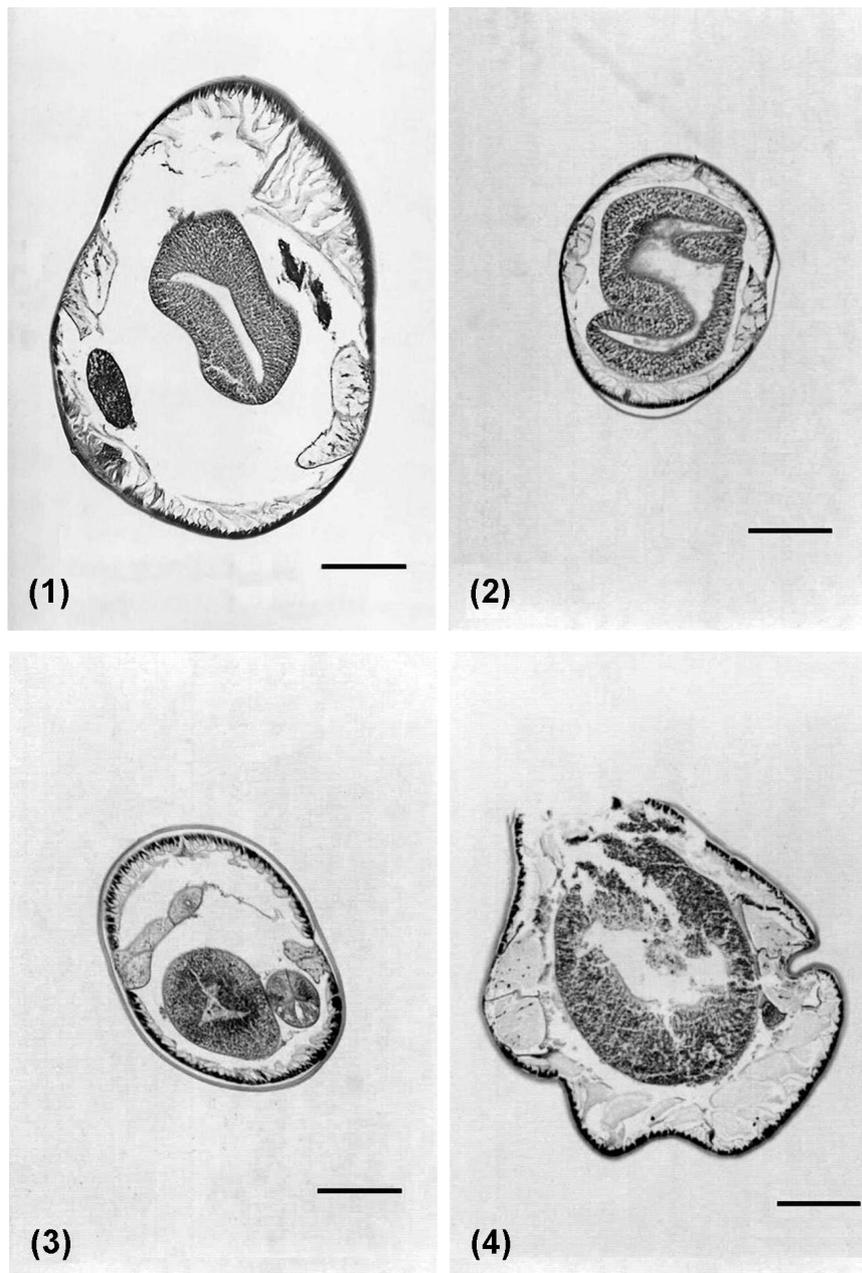


Figura 1 - Corte transversal de larva L3 de *Contracaecum* sp. do grupo controle, demonstrando integridade cuticular e de órgãos internos. (barra = 2  $\mu$ m)

Figura 2 - Corte transversal de larva L3 de *Contracaecum* sp., após decorrida 1 hora em contato com o óleo de citronela, demonstrando uma leve perda na aderência cuticular. (barra = 2  $\mu$ m)

Figura 3 - Corte transversal de larva L3 de *Contracaecum* sp., após decorridas 2 horas em contato com o óleo de citronela, demonstrando perda total na aderência cuticular. (barra = 2  $\mu$ m)

Figura 4 - Corte transversal de larva L3 de *Contracaecum* sp., após decorridas 4 horas em contato com o óleo de citronela, demonstrando lise de parede intestinal e ruptura cuticular. (barra = 2  $\mu$ m)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)