

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Danieli Urach Monteiro

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Echinococcus* spp. EM
BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO *in vitro* E *ex vivo*
DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* FRENTE AOS PROTOESCÓLECES
de *Echinococcus orteppi***

**Santa Maria, RS
2016**

Danieli Urach Monteiro

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Echinococcus* spp. EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO *in vitro* E *ex vivo* DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* FRENTE AOS PROTOESCÓLECES de *Echinococcus ortleppi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Mário Luiz de la Rue

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Urach Monteiro, Danieli

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Echinococcus* spp. EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO *in vitro* E *ex vivo* DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* FRENTE AOS PROTOESCÓLECES de *Echinococcus ortleppi* / Danieli Urach Monteiro.- 2016.

71 p.; 30 cm

Orientador: Mário Luiz de la Rue

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

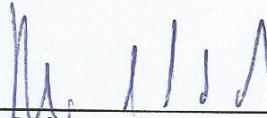
1. Parasitologia 2. Echinococose cística 3. Hidatidose 4. *Echinococcus* 5. *Melaleuca alternifolia* I. Luiz de la Rue, Mário II. Título.

Danieli Urach Monteiro

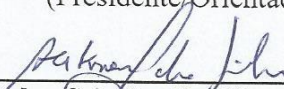
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Echinococcus* spp. EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO *in vitro* E *ex vivo* DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* FRENTE AOS PROTOESCÓLECES de *Echinococcus ortleppi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

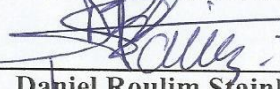
Aprovado em 04 de novembro de 2016:



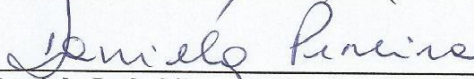
Mário Luiz de la Rue, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



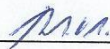
Aleksandro Schäfer Da Silva, Dr. (UDESC)



Daniel Roulim Stainki, Dr. (UFSM)



Daniela Isabel Brayer Pereira, Dr. (UFPEL)



Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016.

Agradecimentos

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, mostrar os caminhos nas horas incertas e me dar forças para seguir sempre em frente.

A minha mãe, meu exemplo de sabedoria e dedicação, meu muito obrigada, pelo incentivo profissional e apoio nas minhas escolhas. A minha irmã Denise que mesmo de longe me incentivou muito nessa trajetória. Amo muito vocês!

Ao, Robson, meu companheiro, agradeço todo o seu amor, carinho, cumplicidade e incentivo em todos os momentos. Obrigada por fazer parte de minha vida. A vitória é nossa!

A meu orientador Dr^o Mário Luiz de la Rue, pelo apoio, motivação, confiança, incentivo e em especial pela sabedoria compartilhada. Meus sinceros agradecimentos.

As minha amigas queridas do LaBioPar, meu muito obrigado, especialmente a Isabel Azevedo, Carla Weiblen, Tatiana Correia, Vanessa Machado e Jéssica Emmanouilidis pela amizade, companheirismo, incentivo e por estarem ao meu lado todas as sextas feiras na busca incansável pelos protoescóleces. Vocês foram simplesmente essenciais. Nossa amizade é para a vida toda.

A prof. Dr^a. Sônia de Ávila Botton, pela amizade, incentivo, confiança, disponibilidade e por todos os ensinamentos na condução deste meu trabalho.

Àos professores Dr^a. Daniela Pereira, Dr^o. Aleksandro Schafer, Dr^o Roberto Viana, Dr^o Daniel Roulim, que aceitaram compor a comissão examinadora, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

A minha prima/irmã Marília pela amizade, cumplicidade, companheirismo e incentivo sempre. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos demais familiares e amigos pelas conversas, incentivos e motivação, em especial Charlise, Thiele, Ieda, Rosane, Giulia, Matheus, Edith, Harold, Carol, Ana, Elio (in memoriam) e vó Marica, que mesmo de longe sempre me ajudaram a ir em frente e não desistir.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela maravilhosa oportunidade em realizar este trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que fazem parte da minha vida, por estarem comemorando comigo mais esta vitória.

Se o desejo de alcançar a meta estiver vigorosamente vivo dentro de nós, não nos faltarão forças para encontrar os meios de alcançá-la e traduzi-la em atos.

Albert Einstein

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Echinococcus* spp. EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO *in vitro* E *ex vivo* DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* FRENTE AOS PROTOESCÓLECES DE *Echinococcus ortleppi*

AUTORA: Danieli Urach Monteiro
ORIENTADOR: Mário Luiz de la Rue

A equinococose cística (EC) é uma infecção zoonótica causada por parasito do gênero *Echinococcus*. O estágio larvário (cisto hidático) do parasito causa sérios problemas de saúde pública, além de acometer várias espécies de animais, ocasionando prejuízos econômicos à indústria de carnes. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi identificar amostras de cistos hidáticos férteis em bovinos e caracterizá-las molecularmente, além de analisar *in vitro* e *ex vivo* a atividade anti-helmíntica do óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO), bem como sua formulação em nanoemulsão (NE-TTO) e seu componente majoritário (terpinen 4-ol) frente aos protoescóleces de *Echinococcus* spp. Foram analisadas 2396 amostras de cistos oriundos de bovinos abatidos em frigorífico da região central do RS, onde 295 amostras foram classificadas como cistos hidáticos pela presença de protoescóleces. Nas reações de PCR para o gene 12S, pode-se identificar 251 amostras positivas para o grupamento de genótipos G5/G6/G7 (*E. ortleppi*/ *E. canadensis*) e 40 amostras para o genótipo G1 (*E. granulosus* sensu stricto). Em subsequente PCR foram identificadas 250 amostras positivas para G5 (*E. ortleppi*) e uma amostra positiva para G7 (*E. canadensis*). Uma amostragem (n=12) dos produtos de PCR utilizando o gene da região cox I, foi sequenciada e comparada com amostras depositadas no Genbank. A análise filogenética identificou três grupos distintos E1, E2 e E3, onde agruparam-se sequências com maior similaridade. O órgão mais acometido pela parasitose em bovinos foi o pulmão. Após a confirmação da fertilidade do cisto, os protoescóleces foram retirados e avaliados quanto à viabilidade utilizando eosina 0.1%. Para o teste *in vitro*, concentrações de 2.5, 5 e 10mg/ml de TTO, 10mg/ml de NE-TTO e 1, 1.5 e 2mg/ml de Terpinen 4-ol foram analisadas frente aos protoescóleces de *E. ortleppi* previamente identificados, nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos. Para o teste *ex vivo*, TTO 10mg/ml e 20mg/ml foi injetado diretamente em cistos hidáticos de *E. ortleppi* (n=20) nos tempos de 5, 15 e 30 minutos, para cada tempo foi retirada uma alíquota de protoescóleces para detecção da viabilidade e realização do PCR para confirmação da espécie envolvida na parasitose. Os resultados deste estudo *in vitro* indicaram efeito protoescolicida de *M. alternifolia* em todas as formulações e concentrações testadas. O Terpinen 4-ol (2mg/ml) obteve uma melhor ação quando comparado com a maior concentração testada do óleo puro (TTO 10mg/ml). As formulações em nanoemulsão (10mg/ml) demonstraram atividade frente aos protoescóleces. Na análise *ex vivo*, TTO (20mg/ml) apresentou 100% de ação protoescolicida no cisto hidático em 15 minutos. O presente estudo torna-se pioneiro no Brasil a identificar o potente efeito protoescolicida de *M. alternifolia* frente aos protoescóleces de *E. ortleppi*, sendo essa espécie do gênero *Echinococcus* a responsável pela maior parte dos cistos hidáticos férteis analisados em bovinos no RS.

Palavras-chave: Equinococose. *Echinococcus* spp. *E. ortleppi*. Nanoemulsão. *Melaleuca alternifolia*. TTO.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Echinococcus* spp. IN CATTLE IN RIO GRANDE DO SUL AND EVALUATION *in vitro* and *ex vivo* OF *Melaleuca alternifolia* OIL AGAINST TO PROTOSCOLECES OF *Echinococcus ortleppi*

AUTHOR: Danieli Urach Monteiro
ADVISOR: Prof. Dr. Mário Luiz de la Rue

Cystic echinococcosis (CE) is a zoonotic disease caused by *Echinococcus* genus. The larval stage (hydatid cyst) of the parasite causes serious public health problems, and affects various species of animals, causing economic losses to the meat industry. This study aimed to identify samples of fertile hydatid cysts in cattle and characterize them molecularly, analyzing *in vitro* and *ex vivo* *Melaleuca alternifolia* oil activity (tea tree oil - TTO) and its formulation in nanoemulsion (NE-TTO) and saris an (terpinen 4-ol) front to protoscolices of *Echinococcus* spp. Two thousand three hundred and ninety-six samples with cysts derived from an abattoir in the central region of the RS were analyzed, where 295 samples were classified as hydatid cysts by the presence of protoscolices. In PCR reactions for the 12S gene, 251 positive samples were identified for the group of genotypes G5/G6/G7 (*E. ortleppi*/*E. canadensis*) and 40 samples for the G1 genotype (*E. granulosus* sensu stricto). In PCR subsequently, 250 samples were positive for G5 (*E. ortleppi*) and one sample for G7 (*E. canadensis*). A sample (n=12) of PCR products using the region of cox I gene, which was sequenced and compared with samples deposited in Genbank. Phylogenetic analysis identified three distinct groups E1, E2 and E3, which were grouped in sequences with greater similarity. The organ most affected by echinococcosis in cattle was the lung. After confirming the fertility of the cyst, protoscolices were removed and evaluated for viability using eosin 0.1%. For *in vitro* testing, concentrations of 2.5, 5 and 10 mg/mL of TTO, 10mg/mL of NE-TTO and 1, 1.5 and 2 mg/mL of terpinen-4-ol were analyzed front to protoscolices of *E. ortleppi* previously identified, in times of 5, 10, 15 and 30 minutes. For *ex vivo* test, TTO 10mg/mL and 20mg/mL was injected directly into hydatid cysts of *E. ortleppi* (n = 20) at times of 5, 15 and 30 minutes, and for each time one aliquot of protoscolices was removed for feasibility detection and implementation of PCR to confirm the species involved in the parasitism. Results of this *in vitro* study showed the protoscolicidal effect of *M. alternifolia* in all tested formulations and concentrations. Terpinen-4-ol (2mg/mL) had a better action when compared with the highest concentration of pure oil (TTO 10mg/mL). Nanoemulsion formulations (10mg/mL) showed a good activity front to the protoscolices. In *ex vivo* analysis, TTO (20mg/mL) showed 100% protoscolicidal action in hydatid cyst in 15 minutes. This study is pioneer in Brazil in identifying the potent effect of protoscolicidal *M. alternifolia* front protoscolices of *E. ortleppi*, being this kind of *Echinococcus* genus responsible for most fertile hydatid cysts analyzed in cattle in RS.

Keywords: Echinococcosis. *Echinococcus* spp. *E. ortleppi*. Nanoemulsion. *Melaleuca alternifolia*. TTO.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1.	Lista das espécies que fazem parte do gênero <i>Echinococcus</i>	22
-----------	--	----

ARTIGO CIENTÍFICO I

Table 1. –	<i>Echinococcus</i> species in bovine fertile hydatid cysts detected in Rio Grande do Sul State, southern Brazil	39
------------	--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 – Distribuição do *E. granulosus* sensu lato e seus genótipos na América do Sul, com destaque as espécies relatadas no Brasil..... 25
- Figura 2 – Representação estrutural das fases de *Echinococcus* spp. A. *Echinococcus* spp. adulto; B. Cisto hidático; C. Ovo do parasito..... 26
- ..
- Figura 3 – Ciclo biológico do *E. granulosus* sensu lato. A- Hospedeiro definitivo; B- Hospedeiro intermediário; C- Parasito adulto; D- Ovo do *Echinococcus*; E- Fase larvária (cisto hidático)..... 27
- Figura 4 – Distribuição mundial de *E. granulosus* sensu lato em humanos relacionando com o número de casos no período de 1992 a 2014..... 28
- Figura 5 – Planta *Melaleuca alternifolia*. 33

ARTIGO CIENTÍFICO I

- Figure 1 – Neighbor Joining (NJ) tree based on cytochrome c oxidase I gene (coxI), for *Echinococcus* spp. isolates/genotypes. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA5 program. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown..... 39

ARTIGO CIENTÍFICO II

- Figure 1 – Percent viability of *E. ortleppi* protoscoleces exposed *in vitro* to different concentrations of tea tree oil (TTO) and to a nanoemulsion formulation of TTO (NE-TTO). The log-rank test was used to compare curves to the control (water). Data are expressed as mean \pm SD (n=3)..... 45
- Figure 2 – Percent viability of *E. ortleppi* protoscoleces exposed *in vitro* to different concentrations of terpinen-4-ol (mg/mg). The log-rank test was used to compare curves to the control (water). Data are expressed as mean \pm SD (n=3)..... 46
- Figure 3 – Percent viability of *E. ortleppi* protoscoleces exposed *ex vivo* to TTO. The log-rank test was used to compare the treated group to the control (water). Data are expressed as mean \pm SD (n = 3) 46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COX - Citocromo c oxidase

CE – Cystic Echinococcosis

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DATASUS - Sistema de Informações Hospitalares do SUS

EC – Equinococose Cística

G1- *Echinococcus granulosus* sensu stricto – genótipo 1

G2 - *Echinococcus granulosus* sensu stricto – genótipo 2

G3 - *Echinococcus granulosus* sensu stricto – genótipo 3

G4 - *Echinococcus equinus*

G5 - *Echinococcus ortleppi*

G6 - *Echinococcus canadensis* – genótipo 6

G7 - *Echinococcus canadensis* – genótipo 7

G8 - *Echinococcus canadensis* – genótipo 8

G10 - *Echinococcus canadensis* – genótipo 10

HD – Hospedeiro definitivo

HI – Hospedeiro intermediário

NAD1 - NADH dehydrogenase subunit 1

NE-TTO – Nanoemulsão *Melaleuca alternifolia*

M. alternifolia - *Melaleuca alternifolia*

PAIR – Punção, aspiração, injeção e re-aspiração

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RS – Rio Grande do Sul

TTO - Tea Tree oil

UFMS - Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	14
2. INTRODUÇÃO	15
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GERAL.....	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1 EQUINOCOCOSE	19
4.1.1 Taxonomia.....	19
4.1.2 Análise Filogenética do gênero <i>Echinococcus</i>	22
4.2 EQUINOCOCOSE CÍSTICA	23
4.2.1. Epidemiologia.....	23
4.2.2 <i>E. granulosus</i> sensu lato: Morfologia e Ciclo Biológico.....	24
4.2.3. Hospedeiros definitivo (HD) e intermediário (HI).....	26
4.2.4. Hospedeiros acidentais (HA) – Humanos	27
4.2.5 Diagnóstico e Tratamento.....	28
4.2.6. Controle e Profilaxia.....	31
4.3 NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS NO CONTROLE DA ECHINOCOCOSE	31
4.3.1. Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	32
4.3.2. Sistemas nanoestruturados no controle antiparasitário	35
5. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS.....	37
5.1. ARTIGO CIENTÍFICO I.....	37
5.2. ARTIGO CIENTÍFICO II	42
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9. ANEXOS	67
9.1 ANEXO A - Licença Elsevier para reprodução do artigo I.....	68

9.2 ANEXO B – Carta de aceite para publicação do artigo II.....	69
---	----

1. APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão desta tese encontram-se nos **ARTIGOS CIENTÍFICOS I e II** e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA** e **DISCUSSÃO** da tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração dos manuscritos estão mencionadas nos respectivos artigos.

2. INTRODUÇÃO

A equinococose ou hidatidose é uma zoonose parasitária crônica que afeta os seres humanos, bem como os mamíferos domésticos e selvagens. Esta enfermidade tem distribuição cosmopolita, com incidência constante em países da América Latina (NAKAO et al., 2013; CUCHER et al., 2016).

Estudos têm sido realizados, visando um melhor entendimento da taxonomia de *Echinococcus* spp., com auxílio da biologia molecular, especialmente através de análises filogenéticas (GROSSO et al. 2012; ROMIG et al. 2015). Segundo revisão taxonômica publicada por Nakao et al. (2013) as principais espécies descritas como causadoras da equinococose são: *E. granulosus* sensu stricto, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus oligarthra*, *Echinococcus felidis*, *Echinococcus shiquicus*, *Echinococcus equinus*, *Echinococcus ortleppi* e *Echinococcus canadensis*.

E. granulosus sensu stricto e *E. multilocularis*, são as duas espécies do gênero *Echinococcus* de maior importância clínica. Todavia, *E. ortleppi* está em ascensão no contexto mundial, sendo de grande importância o conhecimento do ciclo de transmissão e distribuição geográfica dessa espécie, a fim de auxiliar os estudos epidemiológicos até então pouco conhecidos sobre essa parasitose em humanos e animais (ECKERT et al., 2001; CASULLI et al., 2008; MORO et al., 2009; NAKAO et al., 2013).

No Brasil, a equinococose cística (EC) está presente principalmente no Rio Grande do Sul (RS), provavelmente devido às proximidades com Argentina e Uruguai, que são países com considerável contaminação pelo parasito (De la Rue et al., 2006). O RS possui uma economia rural baseada na criação extensiva de bovinos e ovinos os quais tem um intenso contato com cães, facilitando assim o ciclo de vida do parasito. As espécies relatadas no estado até o presente momento são: *E. ortleppi*, *E. granulosus* sensu stricto e *E. canadensis* (G7) responsáveis pela EC, acometendo humanos e animais, principalmente bovinos que é a principal espécie animal de comércio e consumo no estado (de la RUE et al., 2011; BALBINOTTI et al. 2012; MONTEIRO et al., 2014).

O cisto hidático, também chamado de metacestóide, é a fase larval da doença, que é encontrada quando há o desenvolvimento da parasitose, tanto nos hospedeiros intermediários (HI), quanto no homem que é considerado hospedeiro acidental (REY, 1991; ECKERT et al., 2001). O cisto hidático possui crescimento lento e sua sintomatologia apresenta-se inespecífica, dificultando o diagnóstico dessa enfermidade (MORO et al., 2009; OIE, 2011; BALBINOTTI et al., 2012).

Na busca por elucidar as relações filogenéticas de isolados de *Echinococcus* spp. de diferentes partes do mundo, as análises filogenéticas são bastante relevantes, a fim de verificarmos a variabilidade genética entre as espécies do gênero *Echinococcus*, visando aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico, elucidar diferenças na patogenicidade entre os isolados, além de diminuir o índice de falha terapêutica com os tratamentos atualmente disponíveis (BOWLES et al. 1992; SORIANO et al. 2010; MONTEIRO et al. 2014).

A escolha dos tratamentos para EC depende necessariamente do órgão parasitado e tamanho do cisto. O procedimento cirúrgico geralmente é o mais utilizado, todavia o método P.A.I.R. (punção/aspiração/introdução/reaspiração) pode ser implementado com eficiência por médicos qualificados (SILVA et al., 2001; ABU-ESHY, 2006; HAILONG et al., 2013). O uso de protoescolicidas no interior do cisto hidático antes da retirada cirúrgica do cisto, bem como no método PAIR é de extrema importância para o sucesso desses tratamentos, visando inviabilizar totalmente os protoescoléces, a fim de evitar recidivas da doença (PARK et al., 2009).

Novas terapias no combate a EC bem como a descoberta de novos protoescolicidas vêm auxiliando no tratamento desta parasitose (ELISSONDO et al., 2007; MAGGIORE et al., 2012; KAVOOSI & PURFARD, 2013). Neste sentido, estudos que visam utilizar plantas medicinais como terapias alternativas no controle de parasitoses vêm crescendo nos últimos anos (MACHADO et al., 2010; MOAZENI et al., 2012; GRESSLER, 2014). Os óleos essenciais/vegetais de plantas e/ou seus componentes ativos são alvos frequentemente de relatos como ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária (HAJHASHEMI et al., 2003; PERRY et al., 2003; SILVA et al., 2003; SAGAVE, 2014; SOUZA, 2014).

Neste contexto, encontra-se a planta *Melaleuca alternifolia* conhecida popularmente por árvore de chá (Tea Tree), onde o óleo obtido de suas folhas é amplamente utilizado devido a sua potente ação frente a diversos micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitos (HARKENTHAL et al., 1999; COX et al., 2000; HAMMER et al., 2003; CARSON et al., 2006; FLORES, 2011; SOUZA, 2014; PAZINATO et al. 2013).

A utilização de formulações nanoestruturadas de óleos essenciais, geralmente resultam em uma maior eficácia terapêutica, devido principalmente à liberação progressiva e controlada do ativo, diminuição significativa da toxicidade, além de maior tempo de permanência na circulação (FLORES et al., 2011; HARPREET et al., 2011; SOUZA et al., 2014). Neste sentido, estudos envolvendo óleo de *M. alternifolia* em formulações nanoencapsulada e em nanoemulsão apresentam uma melhor estabilidade, além de diminuição de odor e volatilização do mesmo (FLORES et al., 2011; SOUZA, 2014).

A identificação da equinococose possui grande importância para a saúde humana e animal, pois apresenta uma evolução silenciosa possuindo capacidade de colonizar diferentes órgãos. Estudos que abordam tratamentos alternativos para essa parasitose, especialmente os que proporcionem a inviabilidade do parasito no organismo, são extremamente importantes e necessários.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar amostras de cistos hidáticos férteis em bovinos e caracterizá-las molecularmente e analisar *in vitro* e *ex vivo* a atividade do óleo de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil - TTO), bem como sua formulação em nanoemulsão (NE-TTO) e seu componente majoritário (terpinen 4-ol) frente aos protoescoléces de *Echinococcus* spp.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização molecular das espécies de *Echinococcus* a partir de cistos hidáticos em órgãos de bovinos abatidos no RS;
- Realizar testes de viabilidade *in vitro* empregando óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e terpinen 4-ol frente aos protoescoléces de *Echinococcus* spp.
- Avaliar *in vitro* a atividade da formulação em nanoemulsão do óleo de *M. alternifolia* em protoescoléces de *Echinococcus* spp.
- Investigar em análise *ex vivo* a ação do óleo de *M. alternifolia* no cisto hidático, buscando identificar a menor concentração do óleo capaz de proporcionar a inviabilização dos protoescoléces no menor tempo.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 EQUINOCOCOSE

A equinococose ou hidatidose é uma zoonose parasitária crônica que afeta os seres humanos, bem como os mamíferos domésticos e selvagens (ECKERT et al. 2001). O agente etiológico é um platelminto pertencente à classe Cestoda, família Taenidae, gênero *Echinococcus*. Esta parasitose representa um grave problema de saúde humana, além de causar perdas econômicas significativas na produtividade animal (CARDONA & CARMENA, 2013; OTERO-ABAD & TORGERSON 2013).

Associada com práticas e costumes errôneos no abate de animais, principalmente ovinos e bovinos, é nas propriedades rurais que ocorre a disseminação da doença. Segundo OMS (2013), a EC é considerada uma doença negligenciada e os custos anuais associados são estimados em US \$ 3 bilhões, incluindo os custos de tratamento e perdas na indústria pecuária.

4.1.1 Taxonomia

A taxonomia do gênero *Echinococcus* (RUDOLPHI, 1801) vem sendo constantemente revista nos últimos anos. A organização da biodiversidade depende essencialmente dos estudos de taxonomia, sendo esta controversia em relação ao gênero *Echinococcus* (BOWLES et al., 1992; BOWLES & MCMANUS, 1993; KAMENETZKY et al., 2002; XIAO et al., 2003).

As quatro principais espécies do gênero *Echinococcus* primeiramente descritas foram: *E. granulosus*, causador da equinococose cística, *E. multilocularis* responsável por ocasionar a equinococose alveolar, e as espécies *E. vogeli* e *E. oligarthra* que causam equinococose policística (KUMARATILAKE & THOMPSON, 1982). Com a implementação de análises moleculares e estudos genotípicos e fenotípicos, outras espécies foram posteriormente relatadas, *E. shiquicus* (XIÃO et al., 2005) e também *E. felidis* descrito primeiramente por Ortleppi (1937), mas reconhecido como espécie após análises descritas por Huttner et al. (2008).

Através de estudos moleculares na década de 1990, um grupo de pesquisadores BOWLES et al. (1992), e BOWLES & MCMANUS (1993) iniciaram uma série de análises de reavaliação de taxonomia de *Echinococcus* spp., utilizando o gene mitocondrial citocromo

c oxidase subunidade 1 (COX1) e NADH desidrogenase subunidade 1 (NAD1). Através de análises moleculares, conseguiu-se identificar dentro da espécie *E. granulosus* uma alta diversidade fenotípica e genotípica, sendo essas reconhecidas como um conjunto de variantes intraespecíficas que diferem pela sua especificidade e infecciosidade aos hospedeiros, além de morfologia do parasito adulto, patogenicidade para humanos entre outros aspectos. Por meio dessas características, a espécie passou a ser denominada de *E. granulosus* sensu lato (GROSSO et al., 2012; NAKAO et al., 2013; ROMIG et al., 2015).

Diferentes análises moleculares e filogenéticas vêm sendo empregadas para determinar a variação genética de *E. granulosus* sensu lato, o que permitiu a discriminação de nove diferentes genótipos (G1,G2,G3,G4,G5,G6,G7,G8 e G10) (MCMANUS, 2013; ALVAREZ-ROJAS et al., 2014; ROMIG et al., 2015; CUCHER et al., 2016). Algumas diferenças encontradas entre estes genótipos são tão importantes quanto às encontradas entre as espécies do gênero *Echinococcus*, o que levou a categorização destas em espécies válidas, incluindo: genótipo G1/G2/G3 oriundas de ovinos, caracterizadas em *Echinococcus granulosus* sensu stricto; o genótipo G4, conhecida como linhagem equina, chamada de *Echinococcus equinus* e o genótipo bovino G5 em *Echinococcus ortleppi* (THOMPSON & MCMANUS, 2002; NAKAO et al., 2007; NAKAO et al., 2013; ROMIG et al., 2015)

Embora alguns dos genótipos tenham sido elevados ao status de espécies, outros foram considerados apenas variantes menores, cuja validade como genótipos distintos é duvidosa. Desta forma, os genótipos com variações mínimas foram englobados em uma mesma espécie, pois muitos aspectos cruciais ainda não estão bem estabelecidos (NAKAO et al., 2013). Neste caso, a espécie *E. canadensis* inclui os genótipos G6/G7/G8/G10, que encontram-se sob constante discussão taxonômica pela sua grande diversidade (LAVIKAINEN et al., 2003; THOMPSON et al., 2006; NAKAO et al., 2007; HUTTNER et al., 2008; MOKS et al., 2008; SNABEL et al., 2009). As espécies do gênero *Echinococcus* estão listadas na tabela 1.

O entendimento da genética, estrutura molecular e antigênica do parasito, bem como as diferenças existentes entre as cepas de *Echinococcus* spp., pois estas características podem representar importantes aspectos no controle da equinococose. Desta forma, a suscetibilidade de humanos à infecção por algumas espécies específicas tem sido relatada por diversos autores (KAMENETZKY et al., 2002; BART et al., 2006; GROSSO et al., 2012).

E. granulosus sensu stricto (G1) parece ser amplamente distribuído, principalmente em áreas onde a atividade pecuária é predominante, com criação extensiva de ovinos. De acordo com Alvarez-Rojas et al. (2014) *E. granulosus* sensu stricto (G1/G2/G3) é o responsável por 88,4% dos casos de EC em humanos no mundo todo. Sua distribuição é

cosmopolita e está frequentemente associado com a contaminação de hospedeiros intermediários ovinos. No entanto, há relatos dessa espécie em suínos, bovinos, camelos e cabras (DINKEL et al., 2004; LAHMAR et al., 2004; KUL & YILDIZ, 2010; MONTEIRO et al., 2014). No sul do Brasil, esta espécie foi relatada em ovinos, bovinos, suínos e humanos (de la RUE et al., 2006; de la RUE et al., 2011; MONTEIRO et al., 2014).

Tabela 1. Listas das espécies que fazem parte do gênero *Echinococcus*.

Espécies
<i>Echinococcus granulosus</i> sensu stricto (G1/G2/G3) (BATSCH, 1796)
<i>E. equinus</i> (G4) (WILLIAMS & SWEATMAN, 1963)
<i>E. ortleppi</i> (G5) (LOPEZ-NEYRA & SOLER PLANAS, 1943)
<i>E. canadensis</i> (G6/G7/G8/G10) (WEBSTER & CAMERON 1961)
<i>E. felidis</i> (ORTLEPP, 1937)
<i>E. multilocularis</i> (LEUCKART, 1863)
<i>E. shiquicus</i> (XIAO et al. 2005)
<i>E. oligarthra</i> (DIESING, 1863)
<i>E. vogeli</i> (RAUSCH & BERNSTEIN 1972)

Fonte: Adaptado de Romig et al. (2015).

E. ortleppi (G5) acomete preferencialmente hospedeiros bovinos, entretanto já foi relatado em outros animais, como: búfalos, caprinos, ovinos e suínos (MCMANUS & THOMPSON, 2003; DINKEL et al 2004; de la RUE et al., 2006; CASULLI et al., 2008). Essa espécie apresenta diferenças morfológicas na forma adulta e sua maturação é mais rápida quando comparado a outras espécies do gênero. Além disto, sua fase larval tem uma maior predileção para os pulmões, onde pode desenvolver vários cistos hidáticos concomitantemente (THOMPSON & MCMANUS, 2002). Há relatos de acometimento em humanos pelo *E. ortleppi* na Argentina, México, Brasil, Índia e França (GUARNERA et al., 2004; MARAVILLA et al., 2004; de la RUE et al., 2011; SHARMA et al., 2013; GRENOUILLET et al., 2014). No RS essa espécie, foi relatada em bovinos e humanos (de la RUE et al., 2011; BALBINOTTI et al., 2012).

Os suínos são os hospedeiros intermediários mais comuns de *E. canadensis* (G7). No entanto, essa espécie pode adaptar-se a diferentes hospedeiros, com relatos de contaminação

em bovinos, caprinos, ovinos, além de seres humanos (VARCASIA et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2010; BEATO et al., 2013; ALVAREZ ROJAS et al., 2014). No Sul do Brasil, o genótipo G7 foi relatado em suínos (MONTEIRO et al., 2014) e bovinos (BADARACO et al., 2008).

A equinococose policística foi relatada na região norte do país, mais precisamente no estado do Acre, casos de animais e humanos infectado por *E. vogeli* (ALMEIDA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2013).

4.1.2 Análise Filogenética do gênero *Echinococcus*

A análise molecular abrange estudos da estrutura e função do material genético, especialmente envolvendo a identificação e a caracterização molecular de micro-organismos. Dentre os diferentes métodos de biologia molecular, a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vem sendo empregada para a identificação correta do *Echinococcus* spp., tanto na sua fase adulta, como na fase larvária. (THOMPSON et al., 2006; SORIANO et al., 2010; de la RUE et al., 2011; SHAHNAZI et al., 2011).

O gene mitocondrial da Citocromo C Oxidase Subunidade I (cox-I) é largamente utilizado em análises moleculares, com intuito de identificar as variantes existentes nas espécies e cepas dentro do gênero *Echinococcus* (BOWLES et al., 1992). A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) é vantajosa, pois a mitocôndria apresenta um sistema de reparo do DNA com mutações frequentes, refletindo com precisão a via evolutiva das estirpes envolvidas (AMORIM, 2002; KAMENETZKY et al., 2002). As investigações com DNA nuclear têm envolvido regiões que codificam para rRNA, como o espaçador transcrito interno 1 (ITS1) (BOWLES & MCMANUS, 1993), além de gene nicotinamida desidrogenase subunidade 1 (nad1) (BOWLES & MCMANUS, 1993) e regiões dentro do gene 12S rRNA (DINKEL et al., 2004).

A relação evolutiva entre as espécies, populações ou genes é conhecida por filogenia. Essa nos ajuda a entender sobre a evolução de determinadas características de um organismo. A filogenia é descrita, geralmente, com ajuda de uma árvore filogenética, que pode ser fundamentada em informações de sequências de uma espécie ou subespécie. Portanto, a utilização desta árvore contribui para a identificação específica das mudanças únicas em populações, ajuda no entendimento das adaptações ao ambiente e caracteriza a evolução em andamento (COX et al., 2001; AMORIM, 2002).

Com a utilização da análise filogenética podemos compreender os processos evolutivos, a extinção e a adaptação de espécies e assim inferir a história da evolução, sendo esta uma representação de ancestralidade, compreendida a partir de características morfológicas, fisiológicas e moleculares, entre outras (MIYAKI et al., 2001). A análise de Neighbor-Joining é um método de evolução mínima, que baseia-se no cálculo das distâncias evolutivas para todos os indivíduos e construção de uma árvore que leva em consideração as relações entre todas as distâncias. Trata-se de um método rápido e apropriado para um grande conjunto de dados, permitindo linhagens com diferentes tamanhos de ramos e substituições múltiplas (SCHENEIDER, 2001).

Poucas regiões do mundo são completamente livres de qualquer uma das várias formas de *Echinococcus* spp., mas a intensidade da transmissão difere drasticamente. Desta forma, buscam-se novos métodos de diagnóstico e tratamento que ajudem a minimizar a endemicidade da doença (ROMIG, 2003).

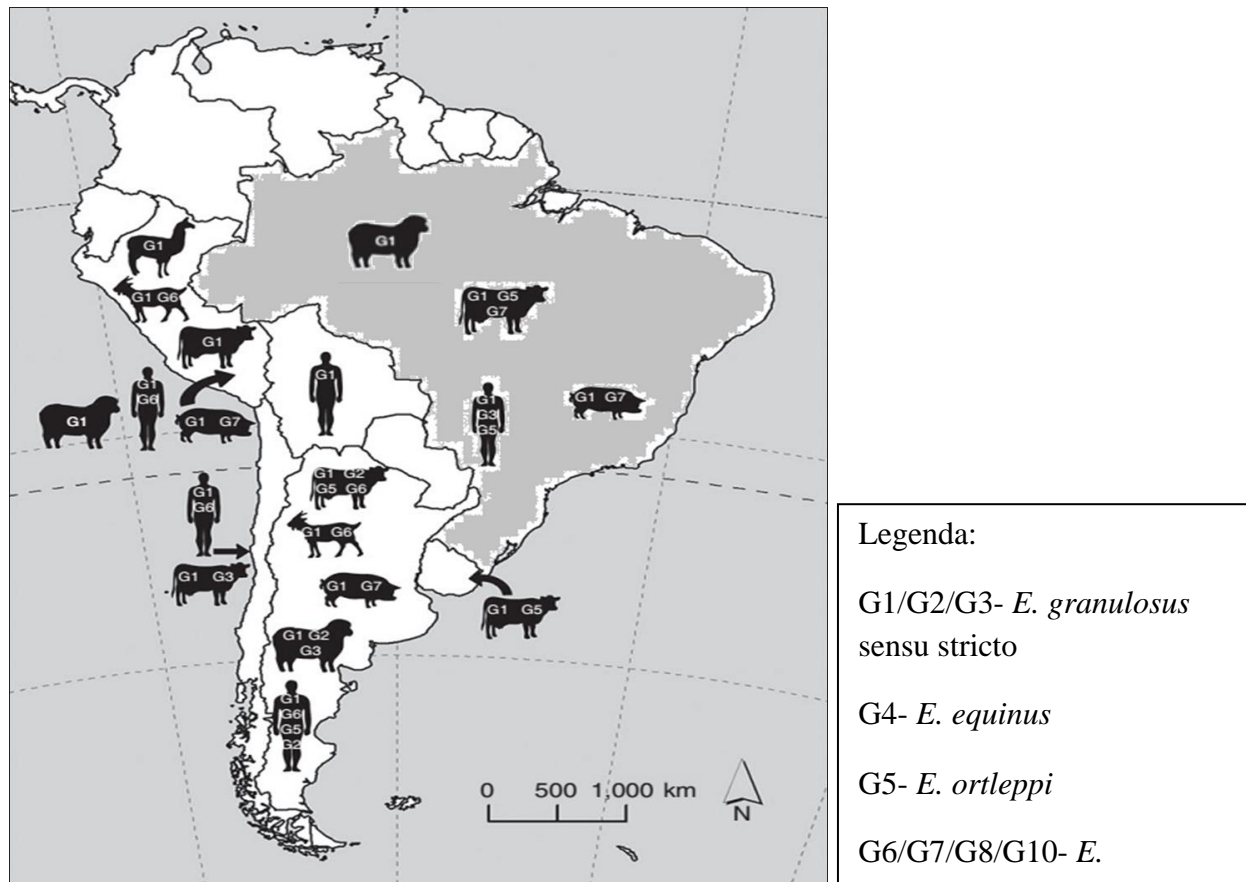
4.2 EQUINOCOCOSE CÍSTICA

4.2.1. Epidemiologia

A EC apresenta uma distribuição geográfica mundial, com a presença de focos da doença em todos os continentes habitados. Sua alta prevalência em humanos e animais é encontrada em países de clima temperado, principalmente da Europa, Ásia, Austrália, América e no leste e norte da África (GROSSO et al., 2012). Na América do Sul, encontram-se focos da doença especialmente na Argentina, sul do Brasil, Uruguai, Chile e regiões montanhosas do Peru e da Bolívia (Figura1).

Os locais endêmicos da EC geralmente são as pequenas e médias propriedades produtoras de carne, incluindo especialmente, a ovina, a caprina, a bovina e a suína, principalmente onde a criação e o abate dos animais ocorrem na maioria das vezes de forma artesanal e não apresentam inspeção veterinária. Estas propriedades geralmente apresentam coexistência do parasito e de seus hospedeiros, levando à contaminação do meio ambiente e mantendo o seu ciclo biológico. Estes locais são considerados zonas de risco à sanidade dos animais de produção e da população humana (de la RUE, 2008; MONTEIRO et al., 2014).

Figura 1. Distribuição do *E. granulosus* sensu lato e seus genótipos na América do Sul, com destaque as espécies relacionadas no Brasil.



Fonte: Adaptado de Cucher et al. (2016)

No Brasil, a equinococose cística ocorre principalmente no RS, majoritariamente nas regiões de fronteira com o Uruguai e a Argentina. As espécies descritas no RS são *E. granulosus* sensu stricto (G1/G2/G3), *E. ortleppi* (G5) e *E. canadensis* (G7), causando infecções em animais e humanos, acarretando consideráveis impactos econômicos e de saúde pública (HAAG et al., 2004; de la RUE et al., 2011; MONTEIRO et al., 2014).

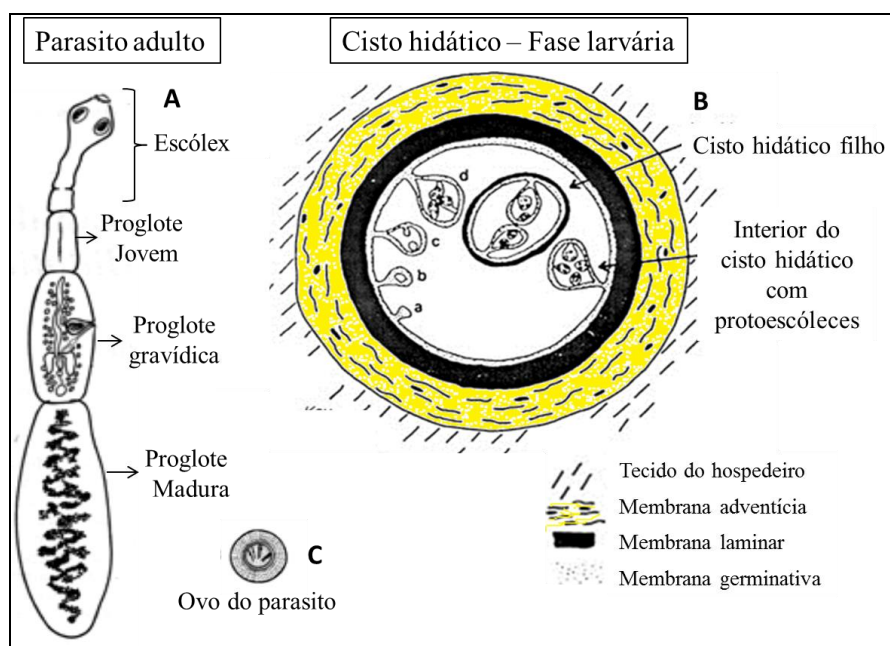
4.2.2 *E. granulosus* sensu lato: Morfologia e Ciclo Biológico

Echinococcus spp. adulto é constituído por: escólex (cabeça), onde encontra-se um rostro com duas fileiras de acúleos; estróbilo (corpo), constituído por três a quatro proglotes, sendo a primeira jovem, a segunda madura e a terceira grávida (Figura 2) (REY, 1991; ECKERT et al., 2001).

A fase larvária de *Echinococcus* spp. é composta por uma estrutura cística, de formato bolhoso conhecida por cisto hidático ou hidátide (Figura 2), no seu interior encontra-se o líquido hidático que pode conter numerosos protoescoléces e restos de membrana. O cisto hidático é formado por três membranas: a) membrana adventícia: a mais externa; b) membrana laminar: constituindo uma barreira à penetração de micro-organismos; c) membrana germinativa: cumpre a função reprodutiva. A ausência ou presença de protoescoléces no interior do cisto hidático define a infertilidade ou fertilidade do cisto, respectivamente (ECKERT et al., 2001; VIRGINIO et al., 2012).

O parasito tem um ciclo de vida heteroxeno, onde exige dois hospedeiros mamíferos (Figura 3). O cestodeo adulto habita o intestino delgado de cães e outros canídeos considerados hospedeiros definitivos (HD), seus ovos são liberados com as fezes do HD infectado, contaminando assim o ambiente. Animais, tais como: ovinos, caprinos, bovinos, camelos, búfalos e suínos são considerados hospedeiros intermediários (HI) e contaminam-se através da ingestão acidental de ovos do parasito com alimentação e/ou água. O ciclo de transmissão é concluído quando os cães alimentam-se com vísceras contendo cistos hidáticos férteis, onde cada protoescoléces desenvolverá um parasito adulto no intestino do cão. O homem é considerado hospedeiro acidental (HI) e desenvolve a fase larval do parasito (Figura 3) (ECKERT et al., 2001; GROSSO et al., 2012; NAKAO et al., 2013; NEGASHA et al., 2013).

Figura 2. Representação estrutural das fases de *Echinococcus* spp. A. *Echinococcus* spp. adulto; B. Cisto hidático; C. Ovo do parasito.



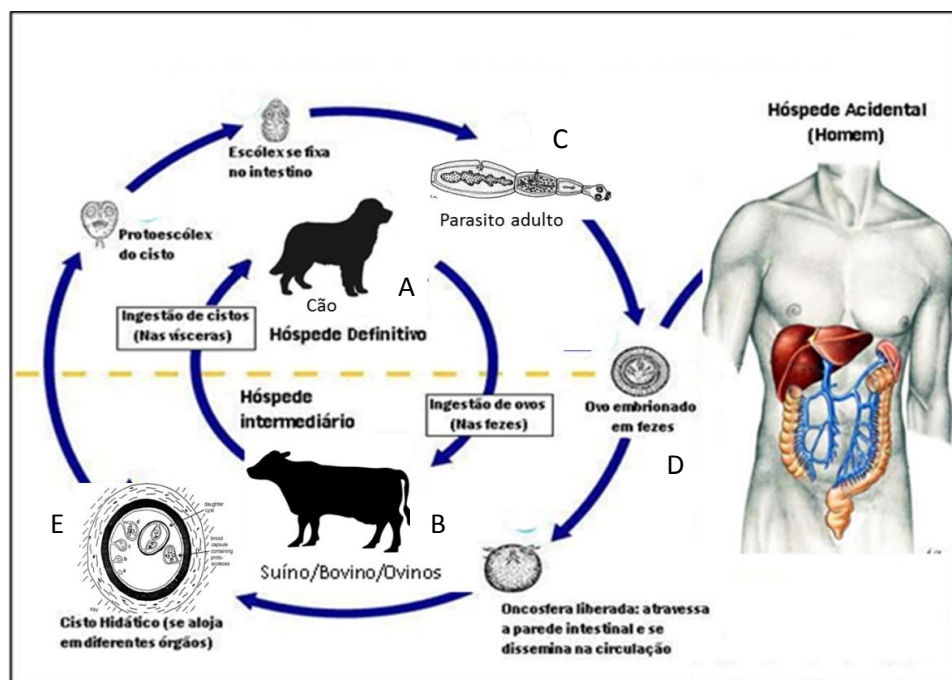
Fonte: Adaptado de Brunetti et al. (2010).

4.2.3. Hospedeiros definitivo (HD) e intermediário (HI)

Os canídeos são considerados os HD do *E. granulosus* sensu lato. De modo geral, o quadro clínico é despercebido nesses animais, porém, quando há a infecção maciça pelo parasito adulto pode haver o desencadeamento de diarreia catarral hemorrágica. Uma vez contaminado, o cão pode apresentar ovos do parasito pelo corpo todo, incluindo a região perianal, pelos e focinho (TORGERSON & HEATH, 2003; FORTES, 2004).

Os principais HI do *E. granulosus* sensu lato são ovinos, bovinos, caprino, suínos, búfalos e equinos. Na América do Sul, os HI geralmente acometidos estão relacionados com a prevalência das espécies, pois preferencialmente os genótipos G1/G2/G3 acometem mais ovinos, G4 - equinos, G5 - bovinos, G6 - alpacas, G7 - suínos (CUCHER et al., 2016).

Figura 3. Ciclo biológico do *E. granulosus* sensu lato. A- Hospedeiro definitivo; B- Hospedeiro intermediário; C- Parasito adulto; D- Ovo do *Echinococcus*; E- Fase larvária (cisto hidático).



Fonte: Adaptado de: <http://www.cdc.gov/echinococcusgranulosus>.

No Brasil, há relatos de contaminação em ovinos, bovinos e suínos. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os dados referentes ao estado do RS no período de 2013 a 2015 foram: 2.123.512 bovinos abatidos, destes 182.778 casos de EC notificados pela Inspeção Federal Veterinária, o que representa 8,6% dos animais abatidos

suspeitos de estarem contaminados por *Echinococcus* spp. Em relação aos ovinos, no mesmo período, dos 232.890 animais abatidos, 12.091 estavam contaminados com cistos hidáticos, representando 5,2% dos abates (BRASIL, 2016). Não há dados publicados a cerca dos prejuízos econômicos com o descarte de vísceras contendo cistos hidáticos em frigoríficos, no entanto, sabe-se que a notificação ao proprietário do animal é realizada e este deve arcar com as despesas econômicas quando há o comprometimento das vísceras dos animais (comunicação pessoal- Abatedouro região central do RS).

4.2.4. Hospedeiros acidentais (HA) – Humanos

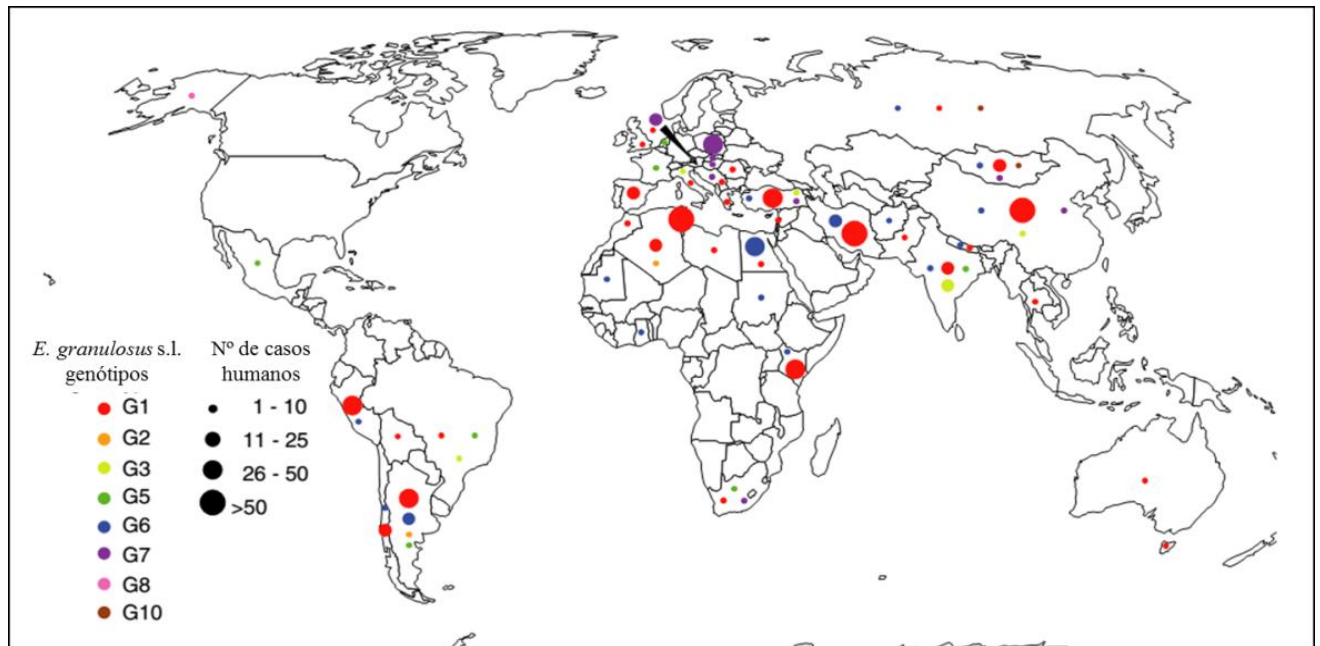
Os humanos são considerados hospedeiros acidentais causados pela fase larval do metacestódeo. Ao ingerir os ovos do parasito juntamente com a alimentação ou através do contato direto com cães contaminados com *Echinococcus* spp., há o desenvolvimento do cisto hidático (ECKERT et al., 2001). As manifestações da doença dependem muito do órgão parasitado e do tamanho do cisto, sendo que geralmente são assintomáticas, mesmo anos após a contaminação. A compressão do órgão afetado e dor abdominal são os sintomas comuns da EC, no entanto, não são sinais patognomônicos da doença (NEVES, 2005). O cisto hidático desenvolve-se principalmente em órgãos como fígado (50%) e pulmões (20%), podendo, em menor probabilidade, alojar-se nos rins, baço, cérebro, útero, ossos, órbita ocular e bexiga (ECKERT et al., 2001).

Diferentes espécies de *Echinococcus* podem acometer humanos, causando a equinococose cística. Cucher et al. (2016) descreve em seu estudo os genótipos de *Echinococcus* que acometem humanos em todo mundo (Figura 4), onde destacam a América do Sul como importante área endêmica, os dados foram coletados segundo o autor de 1992 a 2014.

Segundo o Ministério da Saúde Brasileiro - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (DATASUS/SIH/SUS), em 2014 foram registrados cinco casos de internação hospitalar por EC no RS. De acordo com dados do Programa Estadual de Vigilância da Hidatidose do RS, de janeiro de 2010 a agosto de 2014, foram registrados 30 casos entre internação, sorologia e notificação de equinococose. Conforme Secretaria Estadual de Saúde do RS (CEVS/SES/RS (2014), no período compreendido entre os anos de 1996 e 2013 foram registradas 52 mortes causadas pela EC. Registros epidemiológicos de 1981 a 1998, relatados por Mardini & Souza (1999) no RS, mostraram que o número de casos de EC humana neste

período chegou a 701. A escassez de dados atuais relacionados a estatística epidemiológica da doença é preocupante, a fim de comprovar a real prevalência da parasitose em humanos e animais no RS (BALBINOTTI et al., 2012).

Figura 4. Distribuição mundial de *E. granulosus* sensu lato em humanos relacionando com o número de casos no período de 1992 a 2014.



Fonte : Adaptado de Cucher et al. (2016)

4.2.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da EC em humanos é muitas vezes presuntivo, realizado a partir de sinais clínicos associado com a anamnese do paciente e diagnósticos de imagem que sugerem a contaminação por *Echinococcus* spp. (FORTES, 2004; THOMPSON et al., 2006; ŠNÁBEL et al., 2009). A detecção de anticorpos no soro pode ser realizada para diagnóstico da EC, no entanto, a especificidade dos testes é limitada por reações cruzadas devido a outras infecções como: cestóides (*Taenia saginata*, *Taenia solium*), doenças de helmintos, neoplasias, cirrose hepática entre outras, podendo gerar um resultado falso positivo (BRUNETTI et al., 2010; MANZANO-ROMÁN et al., 2015). ABDELRAOUF et al. (2015) relataram em seu estudo que somente o diagnóstico sorológico não caracteriza uma infecção por cisto hidático, pois em seu estudo apenas 39 (72%) de 54 dos pacientes com EC apresentaram resultados positivos no exame sorológico (ELISA) caracterizando, portanto, um falso negativo.

A utilização de métodos moleculares em amostras de cistos hidáticos, para identificação das espécies de *Echinococcus* spp. envolvidas na infecção, vem sendo implementada no diagnóstico e pesquisa sobre a doença causada por este parasito, possibilitando rastrear as espécies responsáveis pela contaminação em áreas endêmicas e fomentar ações visando o controle e a profilaxia dessa zoonose (CRUZ-REYES et al., 2007; HUTTNER et al., 2008; MOKS et al., 2008; ŠNÁBEL et al., 2009; HONG et al., 2011; ASLAN et al., 2011; de la RUE et al., 2011).

Em humanos o tratamento depende basicamente do órgão comprometido pela parasitose, do estágio biológico larvário, bem como da quantidade de cistos hidáticos presentes no órgão afetado (ECKERT et al., 2001). Segundo Brunetti et al. (2010), o tratamento da EC deve ser baseado em diagnóstico de imagem que é essencial na escolha de uma das seguintes opções de tratamento: (1) medicamentoso, (2) cirúrgico, (3) percutâneo, ou (4) observar e esperar.

O tratamento medicamentoso não permite a eliminação total do cisto hidático, entretanto, em muitas vezes auxilia na diminuição e inativação do cisto. Todavia, este deve ser empregado quando o cisto não está comprometendo o funcionamento do órgão afetado, além de ser usado após o procedimento cirúrgico para evitar recidivas da doença (NEVES et al., 2005; HAILONG et al., 2013).

A classe de medicamentos de escolha utilizado em humanos para tratamento da EC são os benzimidazóis, no entanto, estes não são eficazes em grandes cistos (mais de 10 cm), uma vez que, seu efeito é extremamente lento em cistos com grandes volumes de líquido (BRUNETTI et al., 2010). O albendazol atualmente é o fármaco de escolha, sendo utilizado em dosagem de 10-15 mg/kg/dia. Este princípio ativo é mais eficaz em pacientes jovens e com cistos pequenos, com padrão de cura de 30% em 3 a 6 meses de tratamento. Seu uso é limitado devido a sua baixa biodisponibilidade e toxicidade quando usado por longos períodos de tempo (FRANCHI et al., 1999; JUNGHANSS et al., 2008; BRUNETTI et al., 2010).

O procedimento cirúrgico torna possível a retirada total do cisto hidático presente nos seres humanos, sendo esse, segundo os médicos, o melhor método de tratamento de cistos que apresentam complicações (cistos grandes, com múltiplas vesículas, cistos com comunicação biliar, quando há um comprometimento do órgão afetado, entre outros) no intuito da obtenção de cura da doença (NELL et al., 2011; OUSADDEN et al., 2011; SCARLATA et al., 2011). No entanto, nem sempre isto ocorre, pois além das dificuldades relacionadas com o procedimento cirúrgico, o risco de o cisto romper é grande, podendo causar choque anafilático devido ao extravasamento do líquido hidático, além de acarretar recidivas da doença anos

após a cirurgia (ECKERT et al., 2001). Previamente ao procedimento cirúrgico é indicado o uso de um protoescolicida, no intuito de inativar totalmente os protoescoléces. Caso ocorra o rompimento do cisto durante o esse procedimento, mesmo ocorrendo extravasamento dos protoescoléces no organismo, os mesmo não causarão dano ao paciente (BRUNETTI et al., 2010). O tratamento medicamentoso deve ser usado, preferencialmente, um dia antes e um mês após a cirurgia, a fim de diminuir os riscos de EC secundária (ARIF et al., 2008; BRUNETTI et al., 2010). A cirurgia pode levar a cura do paciente, no entanto, não previne a reincidência, pois mesmo retirando o cisto hidático, pode ocorrer o extravasamento de protoescoléces no organismo e esses podem gerar um novo cisto hidático anos após o diagnóstico inicial (DZIRI et al., 2004).

O método de tratamento P.A.I.R. (punção, aspiração, injeção e reaspiração) desenvolvido na década de 80 é uma técnica minimamente invasiva geralmente utilizada para tratamento de cistos no fígado. Consiste na punção/aspiração do cisto, guiada por ecografia, seguida da introdução de um escolicida, o qual permanece agindo durante alguns minutos. Conclui-se o processo com a reaspiração de todo o conteúdo evitando extravasamento do líquido hidático no organismo humano. Desta forma, o cisto diminui consideravelmente e com o tempo tende a calcificar-se, evitando comprometimento do órgão afetado. Este procedimento é contraindicado em cistos pulmonares e em cistos que tenham comunicação com ductos biliares (ECKERT et al., 2001; SILVA et al., 2001; SMEGO & SEBANEGO, 2005; PARK et al., 2009).

A escolha correta do protoescolicida utilizado no método P.A.I.R. é de extrema importância. Não há consenso sobre o agente escolicida ideal, no entanto, nas suas propriedades devem conter a capacidade de matar os protoescoléces durante um período curto de tempo, além de ser atóxico para o paciente (CIFTCI et al., 2007). Desta forma, um grande número de estudos vem sendo realizados no intuito de encontrar protoescolicidas eficientes que contribuem para o sucesso do procedimento (YONES et al., 2011; HAILONG et al., 2013; PENSEL et al., 2014).

Silva et al. (2001), descrevem que o escolicida a ser utilizado para este método é o álcool 95% ou a salina hipertônica a no mínimo 15% e enfatizam que esses escolicidas só devem ser usados quando o cisto hidático não tenha comunicação com vias biliares, pois poderia prejudicar o funcionamento do órgão afetado causando colangite esclerosante, e até mesmo disfunção do órgão.

Smego et al. (2003) comparam o método PAIR e a cirurgia para tratamento da EC, onde evidenciaram maior eficácia clínica de PAIR devido as menores taxas de complicações,

baixa mortalidade e recorrência da doença, além de menor tempo de hospitalização. Smego e colaboradores também analisaram diversos protoescolicidas, destacando a salina hipertônica nas concentrações de 15 a 30% efetiva contra protoescoléces, já que permitiu uma maior visualização do cisto na tomografia computadorizada. No entanto, esta solução pode não ser efetiva contra cistos hidáticos filhos.

O álcool absoluto demonstra ser mais eficiente que a salina hipertônica na destruição de cistos hidáticos menores presentes no interior do cisto, apresentando uma ação mais rápida (FILICE & BRUNETTI, 1997; SMEGO et al., 2003; SMEGO & SEBANEGO, 2005, BRUNETTI et al., 2010). O tempo médio de ação tanto da salina hipertônica quanto do álcool absoluto como soluções escolicidas é de 15 a 20 minutos (FILICE & BRUNETTI, 1997; PELÁEZ et al., 2000).

Alguns cistos não necessitam de qualquer tratamento, cistos pequenos que não possuem complicações e não afetam o funcionamento do órgão não devem ser tratados até que sua natureza parasitaria seja comprovada. Desta forma, o acompanhamento e observação do crescimento do cisto são essenciais na escolha do tratamento (JUNGHANSS et al., 2008).

4.2.6. Controle e Profilaxia

A identificação de áreas endêmicas é de extrema importância, pois as medidas profiláticas de educação sanitária devem convergir em áreas sob risco de contaminação. A profilaxia da parasitose deve esclarecer a população sobre: os riscos à saúde pública, o ciclo de vida do *Echinococcus* spp., bem como a necessidade de realizar o controle e o tratamento parasitológico dos cães portadores de *Echinococcus* spp., para erradicar o parasito. É indispensável, porém, que todas as ações sejam desempenhadas de maneira sistemática, ininterrupta e rigorosamente controlada (ECKERT, et al., 2001; FORTES, 2004).

4.3 NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS NO CONTROLE DE EC

A descoberta de novos agentes terapêuticos a partir de fontes naturais como as plantas medicinais seus extratos e óleos, tem ocorrido em uma escala crescente no cenário mundial (ANTHONY et al., 2005; CARSON et al., 2006). Apesar dos recentes avanços na quimioterapia antimicrobiana, o tratamento de doenças parasitárias de importância humana e veterinária continua a ser problemático (MACHADO et al., 2010; MOAZENI et al., 2012). A

incidência de efeitos adversos, a ausência de eficácia na terapêutica, os custos e o aumento da resistência aos fármacos convencionais torna urgente a pesquisa por novos antiparasitários (SIBLEY & HUNT, 2003).

Os extratos vegetais e óleos essenciais apresentam uma grande diversidade de componentes. Nos últimos anos verificou-se um renovado interesse e intensificação na investigação de produtos naturais, onde diversos trabalhos ressaltam compostos derivados de plantas demonstrando atividade antiparasitária (SIBLEY & HUNT, 2003, ANTHONY et al., 2005). Machado et al. (2010) relataram a utilização de diversos óleos essenciais utilizados como antiparasitários, dentre eles *Thymus vulgaris* (tomilho), *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Mentha piperita* (menta), *Melaleuca alternifolia* (árvore de chá), *Ocimum gratissimum* e *Ocimum sanctum* (manjeriço) entre outros.

A EC é uma parasitose de desenvolvimento lento e de difícil diagnóstico, sendo suas opções terapêuticas ainda muito restritas. Nos últimos anos diversos estudos vêm analisando alternativas de tratamento *in vitro* e *in vivo* para EC, visando auxiliar tanto nos procedimentos existentes quanto na implementação de novas terapias (ELISSONDO et al., 2007; YONES et al., 2011; MAHMOUDVAND et al., 2014; PENSEL et al., 2014). Moazeni et al. (2012) comprovaram os efeitos do óleo essencial de *Trachyspermum ammi* frente aos protoescoléces de *Echinococcus* spp., como um protoescolicida eficiente na concentração de 10mg/ml em 10 minutos de exposição, levando a crer que os estudos envolvendo óleos essenciais são promissores. Hailong et al. (2013) relataram a ação *in vitro* e *in vivo* da planta *Huaier aqueous* com e sem associação com albendazol, frente aos protoescoléces. O efeito escolicida da planta é observado na concentração de 2 mg/mL *in vitro*, na análise *in vivo*, a associação da planta com albendazol obteve resultados positivos frente ao cisto hidático, com nítidas alterações na parede do cisto.

4.3.1. Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Melaleuca alternifolia é uma planta nativa da Austrália, popularmente conhecida como árvore do chá. A partir das suas folhas é extraído o óleo essencial também chamado *Tea Tree oil* (TTO) (Figura 5). Seu uso tópico é difundido na Austrália, Reino Unido, Itália e Brasil devido suas várias propriedades medicinais (HARKENTHAL et al., 1999; OLIVA et al., 2003; MILLAR & MOORE 2008; FLORES, 2011), sendo que sua forma farmacêutica mais utilizada são géis, sabonetes e cremes (CARSON et al., 2006).

Figura. 5. Planta *M. alternifolia*.



Fonte: <http://australianseed.com/shop/item/melaleuca-alternifolia>

O óleo de *M. alternifolia* vem sendo utilizado em diversas pesquisas, com resultados promissores, especialmente devido as suas propriedades antibacterianas (COX et al., 2000), antifúngicas (HAMMER et al., 2004), anti-inflamatórias (HART et al., 2000), antivirais (CARSON et al., 2008) e antiparasitárias (WALTON et al., 2004). Este óleo essencial apresenta diversas atividades medicinais relacionadas, destacando-se principalmente por suas propriedades antissépticas, sobretudo, frente a fungos e bactérias. Seu mecanismo de ação antimicrobiana consiste, principalmente, na alteração da permeabilidade da membrana plasmática do micro-organismo, interferência na bomba de efluxo dos íons potássio e na inibição do processo respiratório dos mesmos (COX et al., 2000; CARSON et al., 2006).

Os principais constituintes do óleo de *M. alternifolia* são: terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, *p*-cimeno e álcoois sesquiterpênicos. A composição do óleo é regulada pelo padrão internacional ISO4730 (*International Organization for Standardization*), o que refere-se às máximas e mínimas concentrações de cada um dos componentes majoritários, exigindo assim um teor mínimo de 30% de terpinen-4-ol e um teor máximo de 15% de 1,8-cineol (COX et al., 2001; CARSON et al., 2006). O óleo de *M. alternifolia* possui vários componentes ativos, sendo que diversos destes elementos ainda não foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana, podendo estes

desenvolverem um mecanismo de ação distinto dos descritos até o período (CARSON et al., 2006; BAKKALI et al., 2008).

Terpinen-4-ol é o componente majoritário do óleo de *M. alternifolia*, descrito como o principal responsável pela ação antimicrobiana da planta. Sua atividade está relacionada com a perda da integridade e função da membrana, perda de material intracelular, inibição da respiração celular, assim como incapacidade em manter a homeostase na célula microbiana (CARSON et al., 2006).

A atividade antiparasitária do óleo essencial de *M. alternifolia* já foi descrito por diferentes autores. Sua ação antiprotozoária foi relatada frente à *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trichomonas vaginalis* (PENA et al., 1992; MIKUS et al., 2000). Baldissera et al. (2014) relatam a utilização de nanocapsulas do óleo de *M. alternifolia* em diferentes concentrações (0.125%, 0.5%, 1.0%, 2.0%) frente *T. evansi*, onde observaram atividade tripanocida *in vitro*, no entanto, a dosagem testada não foi efetiva no tratamento *in vivo*. Os autores ressaltam que a menor concentração do óleo nanoparticulado mostrou maior eficácia do que o óleo livre. Este resultado pode ser explicado por uma maior interação entre a nanopartículas e a membrana de parasitas, facilitando a penetração do óleo pelo seu reduzido tamanho (LHERM et al., 1987; BALDISSERA et al., 2014).

Walton et al. (2004) relatam o TTO com excelente atividade *in vitro* contra *Sarcoptes scabiei* var *hominis*, sendo esta uma eficiente terapia tópica em infecções por sarna na concentração de 5% TTO ou em combinação terapêutica (por exemplo, 25% de benzoato de benzila com 5% TTO).

Pazinato et al. (2014) descreveram o potencial acaricida do óleo puro de TTO (5 e 10%) e nanopartículas de TTO (0.375 e 0.75 %) frente a *Rhipicephalus microplus*, além de TTO puro inibir a postura de fêmeas desta espécie.

Devido as suas amplas propriedades medicinais, o óleo de *M. alternifolia* vem ganhando espaço no cenário mundial, principalmente no que se refere ao seu uso tópico (FLORES et al., 2011). Segundo Hammer et al. (2006) o óleo de *M. alternifolia* é extremamente tóxico quando ingerido por via oral em altas concentrações, sendo que a ingestão deste não deve ser recomendada, os dados deste estudo também indicaram que a toxicidade de TTO é dose-dependente, onde a maioria dos eventos adversos pode ser evitado através da utilização de concentrações mais baixas do óleo, ressaltando que TTO a 1% não possui toxicidade dérmica.

O uso de formulações nanoestruturadas de óleos de *M. alternifolia* vem como uma alternativa eficiente, no intuito de diminuir a toxicidade do óleo, aumentar seu tempo de ação, bem como obter uma solubilidade desejada para sua utilização (LOW et al., 2013).

4.3.2. Sistemas nanoestruturados no controle antiparasitário

A nanotecnologia tem sido utilizada frequentemente na área farmacêutica, especialmente no desenvolvimento de novas formulações, a fim de aperfeiçoar a liberação de substâncias ativas, bem como atuar como sistema carreador de fármacos, estabelecendo controle de liberação, propiciando assim um efeito terapêutico efetivo (ANTON et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2008). Na busca de medicamentos mais eficientes e de qualidade, no combate a endo e ectoparasitos, diversos estudos vêm enfatizando a utilização de formulações nanoparticuladas com substâncias potencialmente antiparasitárias, a fim de aumentar a disponibilidade do fármaco no local de ação (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; SAID et al., 2012; BARCELLOS, 2014; GRESSLER, 2014; ARIAS et al., 2015).

Abordagens na incorporação de óleos essenciais à carreadores também são descritas na literatura. Flores et al. (2011) avaliaram a viabilidade da elaboração de nanocápsulas e nanoemulsões utilizando óleo de *M. alternifolia* como fase oleosa, com o objetivo de proteger a sua volatilização. Os autores relatam que as formulações realizadas apresentaram boas características físico-químicas relacionadas com seu caráter nanoestruturado e estabilidade físico-química adequada, melhorando assim sua estabilidade e diminuindo a sua evaporação. Os autores sugeriram o uso dessa estratégia como uma plataforma para preparar os sistemas nanoestruturados contendo óleos essenciais.

Flores et al. (2013), avaliaram a atividade antifúngica de nanopartículas poliméricas de *M. alternifolia* frente a onicomicose, causadas pelo fungo *T. rubrum*. Esses autores verificaram a eficiência das nanocápsulas frente à redução do crescimento do fungo e sugeriram que as nanoestruturas podem ser utilizadas no tratamento e prevenção da infecção das unhas causadas por esse fungo, evidenciando assim o potencial do óleo de TTO no tratamento de micoses superficiais.

Souza (2014) avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas contendo o óleo de *M. alternifolia* e o óleo puro da planta nas concentrações de 0,04; 0,08; 0,4; 0,8; 2; 4; 6; 8% utilizando células mononucleadas de sangue periférico. Os resultados sugeriram que todas as concentrações utilizadas tanto do óleo livre quanto à forma nanoestruturada apresentam caráter citotóxico. No entanto, as nanopartículas de *M. alternifolia* apresentaram

uma menor citotoxicidade quando comparadas com o óleo puro. Alguns autores sugerem que a citotoxicidade pode estar relacionada à despolarização das membranas mitocondriais, reduzindo o gradiente de pH, alterando a fluidez da membrana e conseqüentemente levando a morte celular (HAMMER et al., 2006; BAKKALI et al., 2008).

Mahmoudvand et al. (2014) relataram a utilização *in vitro* de nanopartículas de selênio nas concentrações de 50, 125, 250 e 500 mg/ml, frente os protoescoléces de *E. granulosus*, onde obtiveram um efeito escolicida em todas as concentrações testadas. Ahmadnia et al. (2013) utilizaram nanopartículas de sulfóxido de albendazol frente a camundongos infectados por *Echinococcus* spp. Após 48h, os cistos hidáticos apresentaram modificações estruturais com redução de tamanho e peso. Entretanto, a diminuição não foi estatisticamente significativa.

Diferentes fatores podem estar relacionados com o sucesso do tratamento na EC. Alterações no tamanho, espessura, idade e calcificação dos cistos, além de capacidade do fármaco em penetrar a parede do cisto, persistência de nível adequado do fármaco ou até mesmo de seu metabólito ativo em sítios de localização do parasito são fatores extremamente importantes para garantir um efetivo tratamento (ECKERT & DEPLAZES, 2004; CEBALLOS et al., 2008; AHMADNIA et al., 2013).

A pesquisa por fármacos novos e diferentes alternativas no tratamento de infecções parasitárias, que sejam de simples aquisição e fácil acessibilidade, vem sendo alvo de diversos estudos, visto que as parasitoses atingem principalmente países subdesenvolvidos e populações pobres. Desta forma, a descoberta de potenciais agentes terapêuticos a partir de fontes naturais como os óleos essenciais/vegetais de plantas e/ou seus componentes ativos tem aumentado gradativamente, sendo essas, portanto, boas opções na busca de novos tratamentos (MAGGIORE et al., 2012; MOAZENI et al., 2012; ELISSONDO et al., 2013; KAVOOSI & PURFARD, 2013; PENSEL et al., 2014).

5. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

5.1. ARTIGO CIENTÍFICO I

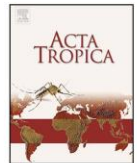
Echinococcus granulosus sensu stricto, Echinococcus canadensis (G7), and Echinococcus ortleppi in fertile hydatid cysts isolated from cattle in southern Brazil

Danieli Urach Monteiro, Maria Isabel de Azevedo, Carla Weiblen, Tatiana Correia Ribeiro, Jéssica Emmanouilidis, Alexandre Alberto Tonin, Sônia de Avila Botton, Mário Luiz de la Rue

Publicado no Periódico: **Acta Tropica**¹

Acta Tropica 164 (2016) 41–44. doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.017

¹ A licença para a inclusão do artigo I nesta tese encontra-se no anexo A.



Echinococcus granulosus sensu stricto, *Echinococcus canadensis* (G7), and *Echinococcus ortleppi* in fertile hydatid cysts isolated from cattle in Southern Brazil

Danieli Urach Monteiro*, Maria Isabel de Azevedo, Carla Weiblen, Tatiana Correia Ribeiro, Jéssica Emmanouilidis, Alexandre Alberto Tonin, Sônia de Avila Botton, Mário Luiz de la Rue

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2016
Received in revised form 6 July 2016
Accepted 12 August 2016
Available online 21 August 2016

Keywords:

Echinococcus spp.
E. canadensis
E. ortleppi
Cystic echinococcosis
Rio Grande do Sul
Cattle

ABSTRACT

Echinococcosis is a cosmopolitan zoonotic infection that affects humans and animals. The aim of this study was to identify and characterize the fertile hydatid cysts from bovine viscera in order to verify different species and/or genotypes present in Southern Brazil. Firstly, cysts were collected from a slaughterhouse, which received animals from different regions of Rio Grande do Sul State (RS), considered an important area of occurrence of cystic echinococcosis. In total, 2396 cysts were analyzed by microscopy to verify the presence of protoscoleces. Protoscoleces were detected in 291 samples and were classified as fertile hydatid cysts. Total DNA was extracted from protoscoleces and amplified by polymerase chain reaction (PCR). Two hundred and fifty-one samples were identified by PCR and characterized as G5/G6/G7 genotypes, of which 40 belonged to *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1–G3). PCR was also performed, using G5-specific primers to identify 250 samples as *Echinococcus ortleppi* (G5). Only one sample was identified as *Echinococcus canadensis* (G7) by DNA sequencing using primers specific for the *cox1* gene. Phylogenetic analysis was also performed and identified three distinct groups E1 (G5), E2 (G7), and E3 (G1–G3), which were grouped according to similarity of their sequences. The study highlights the fact that *E. granulosus* sensu stricto, *E. ortleppi*, and *E. canadensis* (G7) were infecting cattle in RS, emphasizing the adaptation of different species of *Echinococcus* to this intermediate host.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

In South America, cystic echinococcosis (CE) has been reported in Argentina, Brazil, Chile, Peru, and Uruguay (Cucher et al., 2015). In Southern Brazil, the *Echinococcus* spp. that exhibit high economic and health impact include *Echinococcus ortleppi* (G5), *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1 and G3) (de la Rue et al., 2011), and *Echinococcus canadensis* (G7) (Monteiro et al., 2014). Up until now, the genotypes G6, G8, and G10 of *E. canadensis* were not reported in Brazil.

E. granulosus sensu stricto (G1/G2/G3) the principal intermediate hosts are sheep, although other herbivorous wildlife species

around the world have also been known act as intermediate hosts (Romig et al., 2015). In Brazil, the G1 genotype has been responsible for infection of cattle (Balbinotti et al., 2012), sheep (de la Rue et al., 2006), pigs (Monteiro et al., 2014), and dogs (de la Rue et al., 2011). However, human infections have been caused by G1, G3, and G5 genotypes (de la Rue et al., 2011).

The life cycle of *E. ortleppi* involves primarily cattle (intermediate host) and dogs (definitive host), but it has also been reported in other animals such as buffaloes, goats, sheep, and pigs (McManus and Thompson, 2003; Casulli et al., 2008; Dinkel et al., 2004). *E. ortleppi* has distinguishing morphological differences in the adult form, and its maturation is faster when compared to other *Echinococcus* spp.

Rio Grande do Sul State (RS) is considered an important area of occurrence of echinococcosis in farm animals, especially cattle, sheep, and pigs (Balbinotti et al., 2012; de la Rue et al., 2006; Monteiro et al., 2014). However, data for the different species

* Corresponding author at: Avenida Roraima, 1000, Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 20-Sala 4226, CEP 97105-970 Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: danieliurach@gmail.com (D. Urach Monteiro).

and/or genotypes are still scarce. Furthermore, the identification of prevalent species has an important epidemiological role in echinococcosis. Therefore, the aim of this study was to identify and characterize the fertile hydatid cysts from bovine viscera in order to verify different species and/or genotypes present in Southern Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Biological samples

Bovine viscera cysts, with different sizes and shapes, each cyst was considered as an individual and were collected from a slaughterhouse under official veterinarian inspection service of the Agricultural Ministry (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA), which receives animals from diverse regions of RS in Southern Brazil. These cysts were classified according to the macroscopic analysis of the parasitized organ and they were kept in cold storage (2°C–8°C) until the analyses.

2.2. Microscopic analysis

Each cyst was punctured with a needle (40 × 12 18G) to obtain the liquid inside, which was observed under light microscope (100×) in order to identify the hydatid cyst fertility which were characterized by the presence of protoscolexes.

2.3. Molecular analysis

Total DNA was extracted from the protoscolex suspension inside the hydatid cyst, using the method described by Petrih and Fugassa (2013). Different species of *Echinococcus* were characterized using different pairs of primers. Polymerase chain reaction (PCR) was performed as recommended by Dinkel et al. (2004) with modifications. In order to detect *E. granulosus sensu stricto* (G1), the forward and reverse primers used were Eggs1.for/Eggs1.rev (254 bp). For the G5/G6/G7 genotypes, Egcs1.for/Egcs1.rev (254 bp) were used. The total DNA samples from positive G5/G6/G7-PCR amplifications were subjected to another round of PCR in order to identify *E. ortleppi* by using the primer pair Eg.cattle.for/Egcs1.rev (171 bp), as described by Dinkel et al. (2004). In all PCR assays, we used positive and negative controls, which were previously characterized for each genotype by DNA sequencing. Some PCR samples were selected and submitted to DNA sequencing using a pair of primers to amplify a fragment of cytochrome c oxidase subunit I (*cox I*) gene. The forward and reverse primers used were *coxI.For/coxI.Rev* (366 bp) according to Bowles et al. (1992). The DNA sequences were compared to those in the GenBank database.

2.4. Phylogenetic analysis

The isolates of *Echinococcus* identified by DNA sequencing of *cox I* were used to perform the phylogenetic analysis. The comparative DNA sequences analyses were performed using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the software package Gap4 program Staden (Staden, 1996). Other sequences used for comparison with the samples studied were obtained from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), including the following accesses: M84661 (G1); M84662 (G2), M84667 (G7), M84665 (G5) Bowles et al. (1992); KC878433, KC878432, KC878431 (G7) KC853748 and KC660075 (G1) Monteiro et al. (2014). A sample of *Taenia solium* (AB243755, Sato et al., 2006) was used as an outgroup. The DNA sequences obtained in this study were deposited in GenBank, with the following accession numbers: KT327180 (G5), KT382536 (G5), KT337323 (G5), KT382537 (G5), KT382535 (G5), KT382538 (G5), KT382539

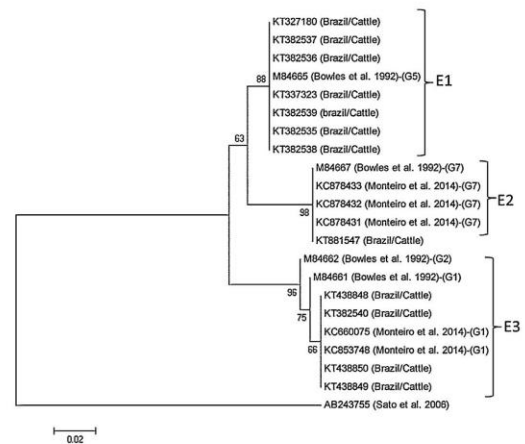


Fig. 1. Neighbor Joining (NJ) tree based on cytochrome c oxidase I gene (*coxI*), for *Echinococcus* spp. isolates/genotypes. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA5 program. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown.

Table 1

Echinococcus species in bovine fertile hydatid cysts detected in Rio Grande do Sul State, Southern Brazil.

Species identified by molecular analyses	Parasitized viscera	
	Lungs	Liver
<i>E. ortleppi</i> (G5) (n=250)	247	3
<i>E. granulosus sensu stricto</i> (G1/G2/G3) (n=40)	36	4
<i>E. canadensis</i> (G7) (n=1)	1	–
Total	284	07

n = total of the samples.

(G5), KT438848 (G1), KT438849 (G1), KT382540 (G1), KT438850 (G1), and KT881547 (G7). The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining (NJ) analysis, where the data alignments were performed using the Clustal W algorithm in the MEGA 5 software (Tamura and Nei, 1993). The number of bootstrap replicates was 1000.

3. Results

From October 2012 to October 2014, 2396 cysts from bovine viscera were analyzed. Protoscolexes were detected in 291 samples, which were classified as fertile hydatid cysts; by molecular analysis, 86.2% (251/291) were identified and characterized as genotypes G5/G6/G7 and 13.7% (40/291) *E. granulosus sensu stricto*. Isolates classified as G5/G6/G7 group were subjected to another round of PCR, which identified 85.9% (250/291) as *E. ortleppi* (G5). Only one (1/291) sample (0.3%) was not amplified by G5-PCR. This sample was submitted to DNA sequencing using the *cox I* gene, and it was identified as *E. canadensis* (G7). Phylogenetic analysis based on the *cox I* gene showed distinct groups, where samples of genotype G5, G7, and G1–G3 formed group E1, E2, and E3 respectively (Fig. 1).

The results of the macroscopic and molecular analyses of the fertile hydatid cysts from bovine viscera collected in RS are presented in Table 1.

4. Discussion

The molecular assay employed in this study was an important tool for the identification of *E. ortleppi*, *E. granulosus sensu stricto*, and *E. canadensis* (G7) in the fertile hydatid cysts analyzed. However, the PCR based on 12S gene was not able to distinguish G6 genotype of G7 (Dinkel et al., 2004). Therefore, we sent all inconclusive samples for DNA sequencing using the *cox1* gene to identify the species involved in the infection of these bovine with fertile hydatid cysts.

Addy et al. (2012) indicated that the most prevalent cases of EC in Kenya were in cattle, as opposed to sheep and goats. However, most of the samples were infertile hydatid cysts infected with *E. granulosus sensu stricto* (G1). This study was different in that *E. ortleppi* was identified in most analyzed fertile hydatid cyst samples, confirming the presence of this species in bovine hosts in RS. Countries like Argentina (Kamenetzky et al., 2002), Italy (Casulli et al., 2008), and even Brazil (Balbinotti et al., 2012) reported *E. ortleppi* to be responsible for the infection of cattle. In Brazil, this species has been related to infection of humans and dogs (de la Rue et al., 2011). Our study confirms that *E. ortleppi* infects cattle in RS.

Previous data on bovine infection in Southern Brazil identified *E. ortleppi* as being responsible for this parasitic disease in 43.4% (277/638) of fertile hydatid cysts (Balbinotti et al., 2012). In this study, we were able to identify 85.9% (250/291) of *E. ortleppi* (G5) in bovine samples. Presumably, this increase can be attributed to better adaptation of this species to the cattle host and consequently, its increased frequency of fertile cysts. However, more studies are required in order to monitor this increase in cases of CE in cattle, seeking to establish the epidemiology of the disease.

Balbinotti et al. (2012) reported the occurrence of 56.6% (361/638) CE cases in cattle caused by *E. granulosus sensu stricto* in fertile hydatid cysts. In the current study, we observed *E. granulosus sensu stricto* in 13.7% (40/291) of the bovine samples in RS.

Although there are reports indicating that cattle are often infected by infertile hydatid cysts (McManus and Thompson, 2003), we demonstrated the development of fertile hydatid cysts of *E. granulosus sensu stricto* in cattle. This finding may indicate a greater likelihood of contamination from other hosts including humans.

Pigs are the most common intermediate host of *E. canadensis* (G7). However, there are reports that cattle, goats, sheep, and humans also act as intermediate hosts (Varcasia et al., 2007; Schneider et al., 2010; Beato et al., 2013; Alvarez Rojas et al., 2014). In Southern Brazil, the G7 genotype was previously reported in pigs (Monteiro et al., 2014) and cattle (Badaraco et al., 2008). The current study confirmed the presence of *E. canadensis* in RS, showing its capacity to infect and adapt to different hosts.

The hydatid cysts can be found in various internal organs, particularly in the liver and lungs, in several animal hosts. In the present study, it was observed that 98.8% (247/250) of bovine lungs were infected by *E. ortleppi* and 90% (36/40) by *E. granulosus sensu stricto* (Table 1). These data are in agreement with Balbinotti et al. (2012) and Casulli et al. (2008), who reported the lungs as being the main organ infected by *Echinococcus* spp. The parasite tropism for certain organs occurs due to physiological characteristics of the target organ, providing different conditions for the development of each *Echinococcus* species (Balbinotti et al., 2012).

The phylogenetic analysis, using the molecular marker *cox1*, demonstrated three distinct groups, E1, E2, and E3, which corresponded to *E. ortleppi*, *E. canadensis* (G7) and *E. granulosus sensu stricto*, respectively (Fig. 1). In all groups, a genetic similarity was evident among the isolates, independently of the sample origin with regard to the intermediate host. It is possible that these species of *Echinococcus* are diffusing and/or adapting to different hosts in the studied region. In southern Brazil, *E. granulosus sensu stricto* (sheep strain) was reported by Monteiro et al. (2014) in pigs, con-

firmed the adaptation of this species to different intermediate hosts.

The fact that cattle can harbor *E. granulosus sensu stricto*, *E. canadensis* (G7) and *E. ortleppi* (G5) has considerable implications for the implementation of a CE control program. Accordingly, there are differences in the adult parasite maturation, being 33–35 days for G5 and G7 genotypes and 45 days for the G1 genotype. This causes difficulties in drug treatment in dogs, the definitive host (Thompson and McManus, 2002). Therefore, the identification of species/genotype is of extreme importance, because this allows the establishment of an effective treatment for interrupting the development of the parasite cycle.

In addition, the results presented in this research identify the occurrence of *E. granulosus sensu stricto*, *E. ortleppi*, and *E. canadensis* (G7) in cattle herds in RS. The epidemiology of *Echinococcus* spp. infection in Southern Brazil is dynamic; therefore, continuous monitoring of *Echinococcus* species and their genotypes is needed, as well as the development of new strategies for the control and prevention of cystic echinococcosis.

References

- Addy, F., Alakonya, A., Wamae, N., Magambo, J., Mbae, C., Mulinge, E., Zeyhle, E., Wassermann, M., Kern, P., Romig, T., 2012. Prevalence and diversity of cystic echinococcosis in livestock in Maasailand Kenya. *Parasitol. Res.* 111, 2289–2294.
- Alvarez Rojas, C.A.A., Gauci, C.G., Nolan, M.J., Harandi, M.F., Lightowlers, M.W., 2014. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans—review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.* 44, 9–18.
- Badaraco, J.L., Ayala, F.J., Bart, J.M., Gottstein, B., Haag, K.L., 2008. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp. Parasitol.* 119, 453–459.
- Balbinotti, H., Santos, G.B., Badaraco, J., Arend, A.C., Graichen, D.A.S., Haag, K.L., Zaha, A., 2012. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 188, 255–260.
- Beato, S., Parreira, R., Roque, C., Gonçalves, M., Silva, L., Maurelli, M.P., Cringoli, G., Grácio, M.A., 2013. *Echinococcus granulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. *Vet. Parasitol.* 198, 235–239.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P., 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 165–174.
- Casulli, A., Manfredi, M.T., La Rosa, G., Di Cerbo, A.R., Genchi, C., Pozio, E., 2008. *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1 G2, and G3 genotypes in Italian bovines. *Vet. Parasitol.* 155, 168–172.
- Cucher, M.A., Macchiaroli, N., Baldi, G., Camicia, F., Prada, L., Maldonado, L., Avila, H.G., Fox, A., Gutierrez, A., Negro, P., Lopez, R., Jensen, O., Rosenzvit, M., Kamenetzky, L., 2015. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. *Trop. Med. Int. Health* 26, 1–10.
- de la Rue, M.L., Dinkel, A., Mackenstedt, U., Romig, T., 2006. New data on *Echinococcus* spp. in southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 48, 103–104.
- de la Rue, M.L., Takano, K., Brochado, J.B., Costa, C.V., Soares, A.G., Yamano, K., Yagi, K., Katoh, Y., Takahashi, K., 2011. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 177, 97–103.
- Dinkel, A., Njoroge, E.M., Zimmermann, A., Wälz, M., Zeyhle, E., Elmahdi, I.E., Mackenstedt, U., Romig, T., 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int. J. Parasitol.* 34, 645–653.
- Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Canova, S.G., Haag, K.L., Guarnera, E.A., Parra, A., Garcia, G.E., Rosenzvit, M.C., 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 2, 129–136.
- McManus, D.P., Thompson, R.C.A., 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127, S37–S51.
- Monteiro, D.U., Botton, S.A., Tonin, A.A., Azevedo, M.I., Graichen, D.A.S., Noal, C.B., de la Rue, M.L., 2014. *Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in swine of Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 202, 325–338.
- Petrigli, R.S., Fugassa, M.H., 2013. DNA extraction and a cost-effective detection method for *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Vet. Parasitol.* 198, 410–413.
- Romig, T., Ebi, D., Wassermann, M., 2015. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Vet. Parasitol.* 213, 76–84.
- Sato, M.O., Cavalcante, V.T., Sako, Y., Nakao, M., Yamasaki, H., Yatsuda, A.P., Nakaya, K., Ito, A., 2006. Short report: evidence and potential for transmission of human and swine *Taenia solium* cysticercosis in the Piracuruca region Piauí, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 933–935.
- Schneider, R., Gollackner, B., Schindl, M., Tucek, G., Auer, H., 2010. *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 871–874.

- Staden, R., 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 233–241.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Thompson, R.C.A., McManus, D.P., 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* 18, 452–457.
- Varcasia, A., Canu, S., Kogkos, A., Pipia, A.P., Scala, A., Gari, G., Seimenis, A., 2007. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol. Res.* 101, 1135–1139.

5.2. ARTIGO CIENTÍFICO II

In vitro* AND *ex vivo* ACTIVITY of *Melaleuca alternifolia* AGAINST PROTOSCOLECES OF *Echinococcus ortleppi

Danieli Urach Monteiro, Maria Isabel Azevedo, Carla Weiblen, Sônia de Avila Botton,
Nadine Lysyk Funk, Cristiane de Bona da Silva, Régis Adriel Zanette, Thiago Guilherme
Schwanz, Mário Luiz de la Rue

Publicado no Periódico: **Parasitology**²

² A licença para a inclusão do artigo II nesta tese encontra-se no anexo B.

In vitro and *ex vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* against protoscoleces of *Echinococcus ortleppi*

DANIELI URACH MONTEIRO¹, MARIA ISABEL AZEVEDO²,
CARLA WEIBLEN², SÔNIA DE AVILA BOTTON², NADINE LYSYK FUNK¹,
CRISTIANE DE BONA DA SILVA¹, RÉGIS ADRIEL ZANETTE³,
THIAGO GUILHERME SCHWANZ¹ and MÁRIO LUIZ DE LA RUE^{1*}

¹ Postgraduation Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brazil

² Department of Industrial Pharmacy, Postgraduation Program in Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brazil

³ Postgraduation Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

(Received 29 June 2016; revised 6 August 2016; accepted 14 August 2016)

SUMMARY

Cystic echinococcosis is a zoonotic disease of difficult diagnosis and treatment. The use of protoscolicidal agents in procedures is of utmost importance for treatment success. This study was aimed at analysing the *in vitro* and *ex vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* oil (tea tree oil – TTO), its nanoemulsion formulation (NE-TTO) and its major component (terpinen-4-ol) against *Echinococcus ortleppi* protoscoleces obtained from cattle. Concentrations of 2.5, 5 and 10 mg mL⁻¹ of TTO, 10 mg mL⁻¹ of NE-TTO and 1, 1.5 and 2 mg mL⁻¹ of terpinen-4-ol were evaluated *in vitro* against protoscoleces at 5, 10, 15 and 30 min. TTO was also injected directly into hydatid cysts (*ex vivo* analysis, *n* = 20) and the viability of protoscoleces was evaluated at 5, 15 and 30 min. The results indicated protoscolicidal effect at all tested formulations and concentrations. Terpinen-4-ol (2 mg mL⁻¹) activity was superior when compared with the highest concentration of TTO. NE-TTO reached a gradual protoscolicidal effect. TTO at 20 mg mL⁻¹ showed 90% protoscolicidal action in hydatid cysts at 5 min. The results showed that TTO affects the viability of *E. ortleppi* protoscoleces, suggesting a new protoscolicidal option to the treatment of cystic echinococcosis.

Key words: *Echinococcus ortleppi*, tea tree oil, protoscolicidal, nanoemulsions.

INTRODUCTION

Cystic echinococcosis (CE) is an important zoonosis with worldwide distribution. The disease is caused by *Echinococcus granulosus sensu lato* and has a considerable impact on economic and public health (Nakao *et al.* 2013). The larval stage of the parasite, the hydatid cyst, is usually found in liver and lungs of intermediate hosts, as well as in humans (Eckert *et al.* 2001). In Rio Grande do Sul state, southern Brazil, the predominant species are: *E. granulosus sensu stricto*, reported in humans, cattle, sheep, pigs and dogs, *Echinococcus canadensis* (G7), reported in cattle and pigs and *Echinococcus ortleppi*, reported in cattle, humans and dogs (de la Rue *et al.* 2006, 2011; Balbinotti *et al.* 2012; Monteiro *et al.* 2014). Human infections caused by *E. ortleppi* were reported in several countries such as Argentina, Mexico, Brazil, India and France (Guarnera *et al.* 2004; Maravilla *et al.* 2004; de la Rue *et al.* 2011; Sharma *et al.* 2013; Grenouillet *et al.* 2014).

* Corresponding author. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Prédio 20 – Sala 4226, CEP 97105-970, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: mldelarue@hotmail.com

CE treatment depends on the parasitized organ and on the larval stage of the hydatid cyst. The most common approaches include surgical procedure, drug and percutaneous treatment (PAIR – puncture, aspiration, injection and reaspiration) or only long-term monitoring (Brunetti *et al.* 2010). The PAIR method consists of an ultrasound-guided puncture of the cyst followed by aspiration of the content and injection of protoscolicidal agents to inactivate protoscoleces inside the cyst. The procedure is finished with the reaspiration of all liquid present inside the cyst. This protocol reduces disease recurrence, since the leakage of viable protoscoleces in the body can cause secondary echinococcosis (Silva *et al.* 2001; Adas *et al.* 2009; Moazeni and Roozitalab, 2012). The protoscolicidal agent recommended by the literature is composed of 20% ethanol or hypertonic saline and, although efficient, may cause a strong osmotic gradient across the cuticle membrane, causing an increase in the hydatid cyst days after the procedure (Peláez *et al.* 2000; Silva *et al.* 2001). In the search for more efficient protoscolicidal agents against *Echinococcus* spp. protoscoleces, studies have emphasized the use of medicinal plants and essential oils as potential antiparasitic substances (Hailong *et al.* 2013; Pensei *et al.* 2014).

Parasitology, Page 1 of 6. © Cambridge University Press 2016
doi:10.1017/S0031182016001621

Tea tree oil (TTO) is an essential oil extracted from the leaves of an Australian native plant known as *Melaleuca alternifolia*. The main components of this oil are: terpinen-4-ol (majority component), 1,8-cineol, α -terpinene, γ -terpinene, α -pinene, β -pinene, α -terpineol, p-cymene and sesquiterpene alcohols (Carson *et al.* 2006). TTO is widely used especially due to its antibacterial (Cox *et al.* 2000), antifungal (Hammer *et al.* 2006), anti-inflammatory (Hart *et al.* 2000), antiviral (Carson *et al.* 2008) and antiparasitic properties (Walton *et al.* 2004; Baldissera *et al.* 2014). Nanotechnology has been used to improve the efficiency of many compounds by altering their biodistribution and thereby improving their delivery to the action site (Schaffazick *et al.* 2003; Anton *et al.* 2008; Monalisa *et al.* 2013). Promising results of selenium nanoparticles were previously reported by Mahmoudvand *et al.* (2014) against *Echinococcus* spp. protozoa.

Due to the need for CE alternative therapies, the aim of this study was to analyse the *in vitro* and *ex vivo* scolicidal activity of TTO, its nanoemulsion formulation (NE-TTO) and its major compound (terpinen-4-ol) against *E. ortleppi* protozoa in a short period of time.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and viability

Hydatid cysts ($n = 25$) were obtained from naturally infected bovine lungs collected from a slaughterhouse in the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil. The hydatid cysts were aseptically punctured with an 18-gauge hypodermic needle and syringe. Protozoa viability in hydatid liquid was evaluated using 0.1% eosin. Motile and non-stained protozoa were considered viable. Only samples with 100% viable protozoa were used for the *in vitro* and *ex vivo* studies.

Molecular analysis

An aliquot of protozoa obtained from a hydatid cyst was used for DNA extraction, according to the protocol established by Petrigh and Fugassa (2013). Polymerase chain reaction (PCR) was performed using the cytochrome *c* oxidase subunit I (COX I) gene following the protocol described by Bowles *et al.* (1992). PCR products were submitted to DNA sequencing, and the sequences obtained were compared with those in the GenBank database. The analyses were performed using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

TTO and terpinen-4-ol dilution

TTO was obtained from Laszlo Aromatherapy (Belo Horizonte, Brazil) and terpinen-4-ol was obtained

from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). TTO and terpinen-4-ol were diluted in sterile water until the concentrations of 2.5, 5, 10 and 20 mg mL⁻¹ and 1, 1.5, 2 and 2.5 mg mL⁻¹, respectively.

NE-TTO preparation

NE-TTO was prepared ($n = 3$) according to the conditions described by Flores *et al.* (2011). An organic phase comprising TTO (0.5 g), sorbitan monostearate (0.383 g) and acetone (25 mL) was added to an aqueous solution (50 mL) containing polysorbate 80 (0.383 g) and kept under moderate magnetic stirring for 10 min. The formulation was concentrated and the organic solvent was removed on a rotary evaporator (Fisatom, São Paulo, Brazil) at 60 rpm and at a temperature of 30–35 °C. The final volume of the formulations was of 50 mL to give an oil concentration of 10 mg mL⁻¹. Particle sizes and polydispersity indices ($n = 3$) were measured by photon correlation spectroscopy after appropriate dilution of an aliquot of the samples in purified water (Zetasizer[®] Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Zeta potential values were measured using the same instrument at 25 °C after dilution of the samples in 10 mM NaCl. NE-TTO pH values were measured directly on the sample using a calibrated potentiometer (Mettler, São Paulo, Brazil), kept at room temperature. In order to compare the oil effectiveness, formulations without essential oil were also prepared (data not shown).

TTO characterization

Oil composition and yield were analysed by gas chromatography-mass spectrometry in a 7890N GC system coupled to a 5977A mass-selective detector (Agilent Technologies, USA). The separation was achieved on a DB-5MS 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m capillary column and the injector temperature was set to 250 °C. The injection volume was 1 μ L and helium of 99.999% purity at a flow rate of 1.3 mL min⁻¹ was used as the carrier gas. The column oven temperature was programmed as follows: 50 °C held for 0.5 min, then programmed at 6.5 °C min⁻¹ to 200 °C and further increased at 50 °C min⁻¹ to 280 °C, which was held for 4.83 min. The transfer line temperature was 290 °C. The mass spectrometer was operated in electron impact ionization mode operating at 70 eV. The quadrupole temperature was set to 150 °C. The source of the mass instrument was operated at 300 °C. Identification of components was performed comparing with the mass spectra library search (NIST and Wiley). The relative amounts of individual components were calculated based on the resultant peak areas.

In vitro analysis

Protozoa used for *in vitro* analysis were pre-washed with PBS (phosphate buffered saline) and stored at 4 °C. For each analysis, 500 μL of the solution to be tested (TTO, NE-TTO or terpinen-4-ol) were added to test tubes containing 5 μL of sediment rich in protozoa (~800 larvae). Tubes were incubated at 5, 10, 15 and 30 min at room temperature. Subsequently, the excess of liquid was removed and added to 500 μL of 0.1% eosin for 15 min. All viable and non-viable protozoa present in the tube were counted in an optical microscope. The tests were performed in triplicate. Water for injection (500 μL) was used as positive control to viability.

Ex vivo analysis

Fertile hydatid cysts ($n = 20$) in lungs obtained from naturally infected cattle were used for *ex vivo* analysis. Initially, 80% of the hydatid liquid was aspirated to confirm protozoa viability using 0.1% eosin and to perform the molecular identification of the species. This initial analysis was used as a positive control sample. Ten hydatid cysts were used for each concentration of TTO (10 and 20 mg mL^{-1}). TTO was injected to fill the complete interior of the cyst. An aliquot was removed from the liquid with protozoa inside the cyst at 5, 15 and 30 min and 0.1% eosin was added to the precipitate. After 15 min, viable and non-viable protozoa were counted at the microscope. Each new puncture of the liquid inside the cyst was stirred for a greater uniformity of action of the product being tested.

Statistical analysis

Data were plotted using Kaplan–Meier analysis and differences in protozoa viability were analysed by the log-rank test using GraphPad software (version 6.1., La Jolla, CA). Each experiment was performed in triplicate. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Molecular analysis

PCR analysis of all samples obtained in this study amplified a fragment of approximately 366 bp, corresponding to the mitochondrial gene COX I. DNA sequences generated were compared with sequences in GenBank, showing high similarity to *E. ortleppi*.

TTO characterization

The characterization of TTO identified four major compounds, in decreasing order: terpinen-4-ol (35.4%), α -terpinene (11%), γ -terpinene (20.4%) and 1,8-cineole (3.4%).

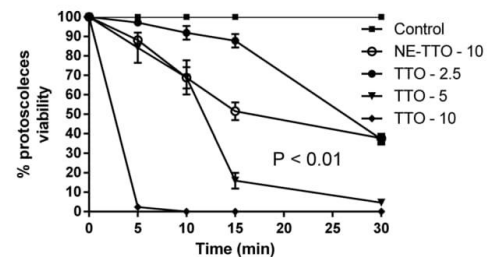


Fig. 1. Per cent viability of *Echinococcus ortleppi* protozoa exposed *in vitro* to different concentrations of tea tree oil (TTO) and to a nanoemulsion formulation of TTO (NE-TTO). The log-rank test was used to compare curves with the control (water). Data are expressed as mean \pm s.d. ($n = 3$).

NE-TTO

NE-TTO at 10 mg mL^{-1} showed 267 nm of diameter and polydispersity index lower than 0.25, indicating adequate homogeneity of these systems. The formulations showed an acid pH (4.86) and ζ (zeta) potential of -11.5 ± 0.78 mV.

In vitro analysis

In vitro results indicated protozoicidal effect in all formulations and concentrations tested in this study. NE-TTO at 10 mg mL^{-1} obtained its maximum action at 30 min, with 62.4% of mortality of protozoa (Fig. 1), whereas TTO obtained its best action at the concentration of 10 mg mL^{-1} at 10 min. A superior effect was observed for terpinen-4-ol, which showed 100% protozoicidal effect at the concentration of 2 mg mL^{-1} at 5 min (Fig. 2). A great deposition of eosin was observed in the outer cuticular membrane of non-viable protozoa after contact with TTO at the concentrations tested (Supplementary Fig. 1, available from <http://journals.cambridge.org/PAR>).

Ex vivo analysis

Ex vivo analysis evaluated the protozoicidal action of TTO at the concentrations of 10 and 20 mg mL^{-1} against *E. ortleppi* protozoa directly in the hydatid cyst. The concentration of 10 mg mL^{-1} , even though effective *in vitro*, did not demonstrate the same action in the *ex vivo* analysis, requiring a longer time to ensure a strong protozoicidal effect. Notwithstanding, at 20 mg mL^{-1} and exposure time of 5 min, approximately 90% of protozoa were non-viable within the cyst (Fig. 3).

DISCUSSION

Echinococcus ortleppi is the species among the genus *Echinococcus* with greater predilection to infect

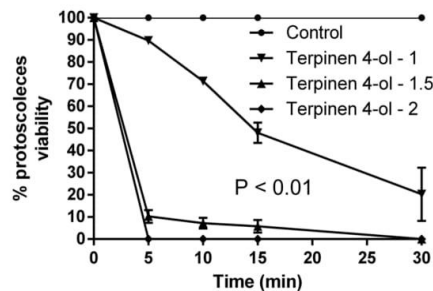


Fig. 2. Per cent viability of *Echinococcus ortleppi* protoscoleces exposed *in vitro* to different concentrations of terpinen-4-ol (mg mg^{-1}). The log-rank test was used to compare curves with the control (water). Data are expressed as mean \pm S.D. ($n = 3$).

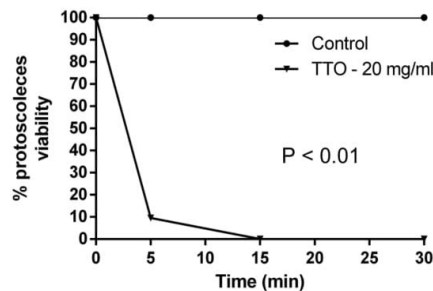


Fig. 3. Per cent viability of *Echinococcus ortleppi* protoscoleces exposed *ex vivo* to TTO. The log-rank test was used to compare the treated group with the control (water). Data are expressed as mean \pm S.D. ($n = 3$).

cattle (Romig *et al.* 2015). This information was confirmed in our study, where we identified the presence of this species in cattle in Rio Grande do Sul state. Indeed, all hydatid cyst samples analysed in this study were infected by *E. ortleppi*.

The use of a protoscolicidal agent is essential to increase the efficiency of CE treatment, surgically or and by the PAIR method, because it reduces the risk of dissemination of viable protoscoleces in the body preventing disease recurrence (Silva *et al.* 2001; Puryan *et al.* 2005). Smego and Sebanego (2005) recommend 20–30 min of exposure to a protoscolicidal agent using the PAIR method. This time is considered too long for patients submitted to moderately invasive procedure. In our study, the *in vitro* efficacy of protoscolicidal agents was analysed in a shorter period of time, as observed in the treatment with TTO at 10 mg mL^{-1} . Thus, we considered the lowest time of TTO treatment that was able to kill *E. ortleppi* protoscoleces in order to significantly decrease the procedure time of CE treatment. Baldissera *et al.* (2014) reported the antiparasitic action of TTO at 0.9 mg mL^{-1} against *Trypanosoma evansi*, *in vitro* and *in vivo*, successfully

controlling the infection. Carson *et al.* (2006) addressed the antibacterial mechanism of action of TTO and terpinen-4-ol, which consists in compromising the integrity of the cell membrane, leading to intracellular material leakage and loss of microbial capacity to maintain homeostasis. In line with this finding, we reported a high dye concentration (0.1% eosin) in the outer cuticular membrane of protoscoleces exposed to TTO treatment, an indicative of membrane damage. The protoscolicidal action of the TTO major compound, terpinen-4-ol, was very promising since non-viable *E. ortleppi* protoscoleces were observed at the concentration of 2 mg mL^{-1} within 5 min of exposure. Therefore, it can be inferred that terpinen-4-ol has more effective protoscolicidal action when compared with TTO. Bakkali *et al.* (2008) reported that the different pharmacological activities between essential oils and their isolated compounds may have antagonizing effects among compounds, which could alter the bioavailability of active components. Baldissera *et al.* (2016) reported the antiprotozoal action *in vitro* and *in vivo* of terpinen 4-ol, α -terpinene and γ -terpinene against *T. evansi*, highlighting that α -terpinene showed greater *in vitro* trypanocidal activity when compared with other compounds. Thus, it is observed that the antiparasitic activity of the compounds present in TTO differs according to the parasite evaluated.

In this study, we reproduced the PAIR method, with some modifications, using hydatid cysts removed from naturally infected cattle lungs. It was observed that the procedure demanded expertise in handling the hydatid cyst. Protoscolicidal should fill the entire cyst cavity, seeking contact with the protoscoleces, which sometimes are deposited in the cyst wall. It was observed decreased activity of TTO at the concentration of 10 mg mL^{-1} in *ex vivo* analysis. Therefore, in order to ensure the protoscolicidal effect, we used a concentration of 20 mg mL^{-1} , obtaining a quick and lasting effect in *ex vivo* analysis.

NE-TTO at the concentration of 10 mg mL^{-1} was used to minimize volatilization of the compound and to increase the protoscolicidal effect at the action site, i.e. in a shorter time. It was observed a constant effect on the protoscoleces viability; thus, it is believed that this effect can be enhanced in studies *in vivo*, thereby generating an extended action within the hydatid cyst. Flores *et al.* (2013) evaluated the antifungal activity of polymeric nanoparticles of TTO against *Trichophyton rubrum* isolates, reporting that the formulation was effective in reducing fungal growth. Sagave *et al.* (2015) studied the antimicrobial activity of TTO against a *Rhodococcus equi* isolate, and reported that the activity of the oil was enhanced when used as nanof ormulation. Nanotechnology is an important feature of the pharmaceutical industry, especially in the development of more efficient

formulations that can remain for long periods at the action site (Putheti *et al.* 2008). Ahmadnia *et al.* (2013) used albendazole sulfoxide nanoparticles in animals experimentally infected with CE and observed ultrastructural changes in hydatid cysts. Gradual decrease in the viability of protozoa is expected when using nanostructured systems because of the slow and gradual release of active formulations.

To the authors' knowledge, this is the first report demonstrating the protoscolicidal effect of *M. alternifolia* against *E. ortleppi* protozoa *in vitro* and *ex vivo*. The results showed that both the formulations TTO and NE-TTO were active against the protozoa. This activity was related to the presence of the major compound of the oil, terpinen-4-ol, which demonstrated strong protoscolicidal activity when evaluated alone. The potential use of *M. Alternifolia* oil and terpinen-4-ol in the treatment of CE should be further evaluated *in vivo*.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material for this paper can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182016001621>.

FINANCIAL SUPPORT

The first author (D.U.M.) thanks the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil, for the Doctoral Scholarship.

REFERENCES

- Adas, G., Arikan, S., Kemik, O., Oner, A., Sahip, N. and Karatepe, O. (2009). Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolical agents on hydatid cysts (*in vitro* study). *World Journal of Gastroenterology* **15**, 112–116.
- Ahmadnia, S., Moazeni, M., Mohammadi-Samani, S. and Oryan, A. (2013). *In vivo* evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide loaded solid lipid nanoparticles against hydatid cyst. *Experimental Parasitology* **135**, 314–319.
- Anton, N., Benoit, J. B. and Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *Journal of Controlled Release* **128**, 185–199.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 446–475.
- Balbinotti, H., Santos, G. B., Badaraco, J., Arend, A. C., Graichen, D. A. S., Haag, K. L. and Zaha, A. (2012). *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Veterinary Parasitology* **188**, 255–260.
- Baldissera, M. D., Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., Santos, R. C. V., Vaucher, R. A., Raffin, R. P., Gomes, P., Dambros, M. G. C., Milleti, L. C., Boligon, A. A., Athayde, M. L. and Monteiro, S. G. (2014). Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. *Experimental Parasitology* **141**, 21–27.
- Baldissera, M. D., Grando, T. H., Souza, C. F., Gressler, L. T., Stefani, L. M., Silva, A. S. and Monteiro, S. G. (2016). *In vitro* and *in vivo* action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology* **162**, 43–48.
- Bowles, J., Blair, D. and McManus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* **54**, 165–173.
- Brunetti, E., Kern, P., Vuitton, D. A. and Panel, W. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* **114**, 1–16.
- Carson, C. F., Hammer, K. A. and Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 50–62.
- Carson, C. F., Smith, D. W., Lampacher, G. J. and Riley, T. V. (2008). Use of deception to achieve double-blinding in a clinical trial of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for the treatment of recurrent herpes labialis. *Contemporary Clinical Trials* **29**, 9–12.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. and Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* **88**, 170–175.
- de la Rue, M. L., Dinkel, A., Mackenstedt, U. and Romig, T. (2006). New data on *Echinococcus* spp. in Southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* **48**, 103–104.
- de la Rue, M. L., Takano, K., Brochado, J., Costa, C. V., Soares, A. G., Yamano, K., Yagi, K., Katoh, Y. and Takahashi, K. (2011). Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Veterinary Parasitology* **177**, 97–103.
- Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F.-X. and Pawlowski, Z. S. (2001). *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*. World Organization for Animal Health, Paris, France.
- Flores, F. C., Lima, J. A., Ribeiro, R. F., Ourique, A. F., Rolim, C. M. B. and Silva, C. B. (2011). Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Química Nova* **34**, 968–972.
- Flores, F. C., Lima, J. A., Ribeiro, R. F., Alves, S. H., Rolim, C. M. B., Beck, R. C. R. and Silva, C. B. (2013). Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* **175**, 281–286.
- Grenouillet, F., Umhang, G., Arbez-Gindre, F., Manton, G., Delabrousse, E., Millon, L. and Boué, F. (2014). *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 2100–2102.
- Guarnera, E. A., Parra, A., Kamenetzky, L., Garcia, G. and Gutiérrez, A. (2004). Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Tropica* **92**, 153–159.
- Hailong, L. V., Jiang, Y., Liao, M., Sun, H., Zhang, S. and Peng, X. (2013). *In vitro* and *in vivo* treatments of *Echinococcus granulosus* with *Huaier aqueous* extract and albendazole liposome. *Parasitology Research* **111**, 961–966.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. and Nielsen, J. B. (2006). A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 616–625.
- Hart, P. H., Brand, C., Carson, C. F., Riley, T. V., Prager, R. H. and Finlay-Jones, J. J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research* **49**, 619–626.
- Mahmoudvand, H., Harandi, M. F., Shakibaie, M., Afatoonian, M. R., ZiaAli, N., Makki, M. S. and Jahanbakhsh, S. (2014). Scolicidal effects of biogenic selenium nanoparticles against protozoa of hydatid cysts. *International Journal of Surgery* **12**, 399–403.
- Maravilla, P., Thompson, R. C. A., Palacios-Ruiz, J. A., Estcourt, A., Ramirez-Solis, E., Mondragon-de-la-Peña, C., Moreno-Moller, M., Cardenas-Mejia, A., MataMiranda, P., Aguirre-Alcantara, M.-T., Bonilla-Rodriguez, C. and Flisser, A. (2004). *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Tropica* **92**, 231–236.
- Moazeni, M. and Roozitalab, A. (2012). High scolical effect of *Zataria multiflora* on protozoa of hydatid cyst: an *in vitro* study. *Comparative Clinical Pathology* **21**, 99–104.
- Monalisa, J., Swati, M., Swetalina, J. and Sudhanshu, S. (2013). Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology* **2**, 353–359.
- Monteiro, D. U., Botton, S. A., Tonin, A. A., Azevedo, M. I., Graichen, D. A. S., Noal, C. B. and de la Rue, M. L. (2014). *Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in swine of southern Brazil. *Veterinary Parasitology* **202**, 335–338.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T. and Ito, A. (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology* **43**, 1017–1029.
- Peláez, V., Kugler, C., Correa, D., Del Carpio, M., Guangioli, M., Molina, J., Marcos, B. and Lopez, E. (2000). PAIR as percutaneous treatment of hydatid liver cysts. *Acta Tropica* **75**, 197–202.
- Pensel, P. E., Maggiore, M. A., Gende, L. B., Eguaras, M. J., Denegri, M. G. and Elissondo, M. C. (2014). Efficacy of essential oils

- of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* **1**, 12.
- Petrigh, R. S. and Fugassa, M. H.** (2013). DNA extraction and a cost-effective detection method for *Echinococcus granulosus* protoscolexes. *Veterinary Parasitology* **198**, 410–413.
- Puryan, K., Karadayi, K., Topcu, O., Canbay, E., Sumer, Z., Turan, M., Karayalcin, K. and Sen, M.** (2005). Chlorhexidine gluconate: an ideal scolical agent in the treatment of intraperitoneal hydatidosis? *World Journal of Surgery* **29**, 227–230.
- Putheti, R. R., Okigbo, R. N., Madhusoodhan, S. and Chavanpatil, S.** (2008). Nanotechnology importance in the pharmaceutical industry. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* **2**, 27–31.
- Romig, T., Ebi, D. and Wassermann, M.** (2015). Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* sensu lato. *Veterinary Parasitology* **213**, 76–84.
- Sagave, L., Gressler, L. T., Flores, F. C., Silva, C. B., Vargas, A. P. C., Lovato, M., Sangioni, L. A., Pötter, L. and Botton, S. A.** (2015). Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **67**, 221–226.
- Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. L. and Pohlmann, A. R.** (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* **26**, 726–737.
- Sharma, M., Sehgal, R., Fomda, B. A., Malhotra, A. and Malla, N.** (2013). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* cysts in north Indian patients: identification of G1, G3, G5 and G6 genotypes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **7**, e2262.
- Silva, A. M., Caldeira, J. and Nunes, J. N.** (2001). P.A.I.R. – alternativa terapêutica do quisto hidático do fígado. *Portuguese Journal of Gastroenterology* **8**, 113–120.
- Smego, R. A. and Sebanego, P.** (2005). Treatment options for hepatic cystic echinococcosis. *International Journal of Infectious Diseases* **9**, 69–76.
- Walton, S. F., McKinnon, M., Pizzutto, S., Dougall, A., Williams, E. and Currie, B. J.** (2004). Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Archives of Dermatology* **140**, 563–566.

6. DISCUSSÃO

No Brasil a notificação de casos de EC em humanos é extremamente precária, visto que a maioria das infecções causadas por *Echinococcus* spp. não são corretamente diagnosticadas, e conseqüentemente, não notificadas ao Ministério da Saúde. Segundo o DATASUS, os casos de EC no RS são raros, sendo que de 2009 a 2011 foram relatados apenas quatro episódios na região de Porto Alegre. No entanto, em estudo realizado por de la Rue et al. (2011), houveram seis casos de EC em humanos relatados na cidade de Santana do Livramento, divisa com o Uruguai. Sendo assim, questionável os dados disponíveis pelo DATASUS sobre os casos da doença.

Em animais, a notificação para EC é obrigatória em todos os frigoríficos sob Inspeção Veterinária Federal, facilitando, a informação aproximada do número de casos e qual a região mais acometida por *Echinococcus* spp. Todavia, a inspeção feita em animais infectados é realizada apenas por análise macroscópica do cisto presente nas vísceras do animal, sendo que a infecção não é confirmada pela presença de protoescoléces no interior do cisto. Dessa forma, a identificação correta do cisto hidático não fica totalmente elucidada.

A caracterização da espécie de *Echinococcus* responsável pela infecção é de extrema importância, pois alterações no período de maturação do parasito adulto e desenvolvimento preferencial do metacestódeo a um HI específico são algumas características que levam ao desenvolvimento acelerado do ciclo de vida do parasito, alterando a escolha do tratamento (ECKERT et al., 2001). Contudo, a espécie *E. granulosus* sensu stricto tem sido identificada como a responsável pela maioria da contaminação em humanos, relatada também em diversas espécies animais, uma vez que é de fácil adaptação e desenvolvimento nos HI (CUCHER et al., 2016).

Tendo em vista que o RS é o estado brasileiro que apresenta a grande maioria de casos de EC, nosso primeiro estudo aborda a identificação de espécies de *Echinococcus* responsáveis pela formação de cistos hidáticos férteis em bovinos oriundos de frigorífico da região central, onde abate animais provenientes de todo o estado. Os resultados desse estudo demonstraram que *E. granulosus* sensu stricto é o responsável pela contaminação em 13,7% (40/291) das amostras de cistos hidáticos analisadas. Os ovinos são os HI preferenciais de *E. granulosus* sensu stricto, no entanto, os resultados encontrados confirmam a adaptação dessa espécie em bovinos. Provavelmente a contaminação cruzada de diferentes espécies de *Echinococcus* ocorra em propriedades onde há a criação de ovinos e bovinos, na presença de cães completando assim, seu ciclo biológico. Em estudo realizado por Balbinotti et al. (2012)

em bovinos abatidos no RS, foram encontradas 56,6% (361/638) das amostras positivas para *E. granulosus* sensu stricto. A presença de *E. granulosus* sensu stricto nas propriedades rurais é preocupante, visto que essa espécie é considerada a mais patogênica para seres humanos e animais (ALVAREZ-ROJAS et al., 2014).

E. ortleppi é a principal espécie a contaminar bovinos com 85.9% (250/291) das amostras analisadas nessa pesquisa. Nossos resultados estão em concordância com Balbinotti et al. (2012), que relataram 43.4% (277/638) das amostras de cistos hidáticos férteis em bovinos contaminados por *E. ortleppi*. Pode-se inferir que os bovinos continuam sendo o principal alvo de *E. ortleppi*, gerando cistos hidáticos férteis nesses animais pela fácil adaptação desta espécie neste HI. Dessa forma, confirmou-se a existência desse parasito nos sistemas de criação de bovinos no RS.

Das 2396 amostras de cistos em fígado e pulmão de bovinos analisadas neste estudo, apenas 291 amostras apresentaram protoescoléces no seu interior, sendo essas identificadas por cistos hidáticos. Todavia, a grande maioria das amostras (2105/2396) foram caracterizadas por cistos bolhosos e com líquido no seu interior, no entanto, não continham protoescoléces que comprovassem sua fertilidade. Na inspeção realizada pelos frigoríficos em geral, não ocorre a confirmação da fertilidade do cisto, gerando falta de dados específicos e concretos do número de animais contaminados pelo *Echinococcus* spp.

Pulmões e fígado são os órgãos preferencialmente acometidos por diferentes espécies de *Echinococcus* (ECKERT et al., 2001; CUCHER et al., 2016). Segundo Balbinotti et al. (2012), o tropismo do parasito a certos órgãos ocorre devido a características fisiológicas do órgão alvo, proporcionando diferentes condições para o desenvolvimento de cada cisto hidático independente da espécie de *Echinococcus*. Dos 291 cistos hidáticos analisados nesse estudo, 97,6% (284/291) estavam presentes em pulmões e apenas 2,4% (7/291) em fígado. Nossos resultados confirmam a predileção do parasito por estes órgãos, sendo que o pulmão foi o mais acometido, provavelmente por sua maior fragilidade, proporcionando ambiente ideal para o desenvolvimento do metacéstódeo. Segundo Negasha et al. (2013), a consistência macia do tecido pulmonar em comparação com outros órgãos, favorece o desenvolvimento e fertilidade dos cistos.

E. canadensis (G7) preferencialmente acomete hospedeiro suíno e sua patogenicidade está relacionada com a melhor adaptação a esse HI (NAKAO et al., 2014; ROMIG et al., 2015). No RS essa espécie foi previamente relatada por nosso grupo de pesquisa (MONTEIRO et al., 2014) em suínos e por Badaraco et al. (2008) em bovinos. No presente estudo evidenciamos cisto hidático fértil causado por *E. canadensis* (G7) em bovino,

confirmando a adaptação dessa espécie em diferentes hospedeiros. Estes dados tornam-se extremamente relevantes, visto que na Áustria, Schneider et al. (2010) relataram 33 casos de humanos contaminados com *E. canadensis* (G7), demonstrando a capacidade desse genótipo infectar os seres humanos.

O gene mitocondrial da *cox-I* foi utilizado em algumas amostras de cistos hidáticos férteis, com intuito de identificar e confirmar a espécie responsável pela infecção. Em complementação, utilizou-se neste estudo a análise filogenética pelo método de Neighbor-Joining, a fim de compreender os processos evolutivos e adaptação de diferentes espécies (MIYAKI et al., 2001). Nessa análise incorporou-se isolados oriundos do RS, descritos por Monteiro et al. (2014) em suínos e isolados desse estudo. Sequências de DNA de diferentes espécies de *Echinococcus* descritas por Bowles et al. (1992) foram utilizadas como controles de cada espécie. Nessa metodologia, foi possível observar a similaridade entre todos os isolados analisados, independentemente da origem da amostra em relação ao hospedeiro intermediário. É possível que as espécies em questão estejam difundindo-se e adaptando-se a diferentes hospedeiros na região estudada.

As dificuldades de diagnóstico associadas à disponibilidade restrita de opções de tratamento levam a considerar a EC como uma doença negligenciada (SILVA, 2010). Estudos envolvendo métodos alternativos de tratamento utilizando diferentes escolícidas tem sido alvo de excelentes pesquisas (YONES et al., 2011; HAILONG et al., 2013; PENSEL et al., 2014). Em nosso segundo estudo buscou-se nova alternativa terapêutica para essa parasitose, a fim de diminuir os riscos eminentes de uma equinococose secundária e consequentemente buscar melhores índices de cura para esta preocupante zoonose.

O presente estudo é pioneiro na análise da ação do óleo de *M. alternifolia* frente aos protoescolíces de *E. ortleppi*, tanto *in vitro*, quanto *ex vivo*. No segundo artigo, buscou-se identificar um composto extraído de planta medicinal que fosse eficiente contra diversos patógenos e pudesse ser usado como protoescolícida. O óleo essencial de *M. alternifolia* (TTO) é amplamente utilizado, sendo descrito na literatura por diferentes autores por suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, antivirais e antiparasitária (COX et al., 2000; CARSON et al., 2008; FLORES et al., 2013; BALDISSERA et al., 2014; SAGAVE, 2014).

A utilização de um protoescolícida, tanto no procedimento cirúrgico, quanto no método PAIR é recomendado por diferentes autores, a fim de inviabilizar totalmente os protoescolíces no interior do cisto hidático, uma vez que, o risco de disseminação de protoescolíces pelo organismo pode causar recidivas da doença anos após o procedimento (SILVA et al., 2001; SMEGO & SEBANEGO, 2005; PARK et al., 2009).

A ação antiprotozoário do óleo de *M. alternifolia* foi relatada por diferentes autores frente à *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *Trichomonas vaginalis* (CARSON et al., 2006) e *Trypanosoma evansi*, em análise *in vitro* e *in vivo* onde observou-se o controle efetivo da infecção (BALDISSERA et al., 2014). Em nosso estudo, observamos atividade protoescolicida do TTO em todas as concentrações testadas (2,5, 5 e 10mg/ml). Sendo que a concentração de 10mg/ml obteve-se a melhor ação no menor período de tempo (5 min.).

O componente majoritário (terpinen 4-ol) do óleo de *M. alternifolia* foi testado frente aos protoescoléces de *E. ortleppi*, podendo-se observar 100% da mortalidade dos protoescoléces em um curto período de tempo (2 mg/ml em 5 min). O Terpinen 4-ol (2mg/ml) obteve uma melhor ação quando comparado com a maior concentração testada do óleo puro (TTO 10mg/ml). Carson et al. (2006) abordaram em seu estudo o mecanismo de ação antibacteriano de TTO e terpinen 4-ol que consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, com extravasamento de material intracelular, incapacitando células microbianas de manter a homeostase. Em nosso estudo, observou-se uma maior concentração de corante (eosina 0,1%) na membrana cuticular exterior do protoescoléces após contato direto com as diferentes concentrações de óleo de *M. alternifolia*. Desta forma, é possível inferir que ocorreu a lise dos protoescoléces através do comprometimento da integridade da membrana, da mesma maneira como descrito por Carson et al. (2006).

Adicionalmente, nesse estudo, pela primeira vez foi investigado o desempenho de nanoemulsões contendo óleo essencial de TTO frente aos protoescoléces de *Echinococcus ortleppi*. Outros autores relataram o sucesso do uso de nanoformulações de *M. alternifolia* frente a diferentes micro-organismos como o relatado por Flores et al. (2013), onde os autores avaliaram a atividade antifúngica de nanopartículas poliméricas de óleo de *M. alternifolia* frente a isolados de *Trichophyton rubrum*, verificando a eficiência das nanocápsulas na redução do crescimento do fungo. Valente et al. (2016) confirmaram a ação antifúngica do óleo livre e formulação em nanoemulsão do óleo de TTO *in vitro* frente a isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*.

A formulação de nanoemulsão do óleo de *M. alternifolia* empregada neste estudo foi desenvolvida no intuito de minimizar a volatilização do óleo essencial e de dispor o óleo por um tempo prolongado no local de ação, resultando em uma maior eficácia terapêutica, devido principalmente à liberação progressiva e controlada do ativo (FLORES et al., 2011; HARPREET et al., 2011; SOUZA, 2014). Obteve-se nestas análises o resultado esperado *in vitro*, visto que logo nos primeiros cinco minutos de contato da nanoemulsão com os protoescoléces houve um efeito protoescolicida. Este resultado pode ser explicado por uma

maior interação entre a nanoemulsão e a membrana dos protoescoléces, facilitando a penetração do óleo pelo seu reduzido tamanho.

A análise *ex vivo* desenvolvida neste estudo teve por finalidade avaliar a ação protoescolicida de TTO diretamente no cisto hidático, simulando a utilização no método PAIR onde testou-se o óleo nas concentrações 10 e 20mg/ml. Ao contrário a análise *in vitro*, a concentração de 10mg/ml não apresentou o resultado esperado, pois a presente pesquisa buscou obter o menor tempo de ação possível que inviabilizasse totalmente os protoescoléces. No entanto, 20mg/ml de TTO mostrou-se ativo, ocorrendo à inviabilidade total dos protoescoléces de *E. orteppi* em 15 minutos. Dessa forma, foi possível observar que na análise *in vitro* temos o mínimo de interferentes, sendo que a ação do óleo torna-se mais rápida que na análise *ex vivo*, onde analisou-se diretamente no cisto hidático. Portanto, pode-se certificar que o TTO tem efeitos protoescolicida tanto *in vitro* quanto *ex vivo*.

Diante da extrema importância da EC no sul do Brasil e apesar de casos em humanos não serem notificados, acredita-se que a cada dia *E. granulosus* sensu lato possa estar desenvolvendo-se silenciosamente e contaminando humanos e animais no estado do RS. A constatação de que bovinos podem abrigar *E. granulosus* stricto sensu (G1), *E. orteppi* e *E. canadensis* (G7) tem consideráveis implicações para a implementação de um programa de controle da EC, devido principalmente ao período de maturação dos parasitos, dificultando o tratamento medicamentoso regular dos cães (THOMPSON & MCMANUS 2002; MCMANUS & THOMPSON 2003). O expressivo número de casos de *E. orteppi* encontrado em bovinos confirma a patogenicidade desta espécie neste HI e alerta para a presença constante nas propriedades rurais, visto que há relatos de *E. orteppi* em humanos no RS (de la RUE et al., 2011).

Estudos futuros incluindo amostras oriundas de diferentes HI serão úteis no esclarecimento da evolução da EC no RS. Ao mesmo tempo, auxiliarão na compreensão de estratégias evolutivas de cada genótipo, as quais o tornam capazes de invadir e adaptar-se a diferentes hospedeiros, disseminando-se pelo sul do Brasil. Uma monitorização constante e uma rigorosa identificação de cistos hidáticos, poderiam evitar resultados não fidedignos, e auxiliariam na profilaxia da EC, ainda pouco difundida no estado do RS.

Nosso estudo sugere a utilização do óleo de *M. alternifolia* como um protoescolicida eficaz *in vitro* e *ex vivo*. Provavelmente o responsável pela ação do TTO é seu componente majoritário (terpinen 4-ol) que demonstrou ter uma potente atividade protoescolicida. No uso das nanoemulsões do óleo de TTO pode-se observar um efeito constante na inviabilidade dos

protoescóleces, dessa forma, acredita-se que em futuros estudos *in vivo* este efeito possa ser potencializado, gerando assim uma ação prolongada dentro do cisto hidático.

7. CONCLUSÕES

- *E. ortleppi*, *E. granulosus* sensu stricto e *E. canadensis* (G7) são as principais espécies de *Echinococcus* que ocorrem em bovinos no RS.
- Pulmão e fígado foram os órgãos acometidos por cistos hidáticos em todas as amostras de bovinos analisadas neste estudo, sendo que o pulmão destacou-se por abrigar o maior número de metacestódeos.
- O óleo essencial de *M. alternifolia* mostrou-se efetivo na inviabilização dos protoescoléces de *E. ortleppi* *in vitro* nas concentrações testadas de 2,5, 5 e 10mg/ml.
- Terpinem 4-ol demonstrou ser um potente protoescolicida nas diferentes concentrações testadas, visto que em 2mg/ml inviabilizou 100% dos protoescoléces.
- A nanoemulsão do óleo de *M. alternifolia* (10mg/ml) na análise *in vitro* obteve um efeito protoescolicida gradual, inviabilizando mais de 50% dos protoescoléces de *E. ortleppi*.
- Na análise *ex vivo*, o óleo de *M. alternifolia* (20mg/ml) demonstrou ter um efeito protoescolicida ideal, inviabilizando totalmente os protoescoléces de *E. ortleppi*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ESHY, S. Clinical Characteristics, Diagnosis and Surgical Management of Hydatid Cysts. **West African journal of Medicine**, v.25, n. 2, p. 56-59, 2006.
- ABDELRAOUF, A. et al. Clinical and serological outcomes with different surgical approaches for human hepatic hydatidosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 587-593, 2015.
- AHMADNIA, S. et al. *In vivo* evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide loaded solid lipid nanoparticles against hydatid cyst. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 314–319, 2013.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 2701-2714, 2011.
- ALVAREZ ROJAS, C. A. et al. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans – review of current knowledge. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 9–18, 2014.
- ALMEIDA, F. et al. Co-infections of the cestode *Echinococcus vogeli* and the nematode *Calodium hepaticum* in the hystricomorphic rodent *Agouti paca* from a forest reserve in Acre, Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 87, p. 489–493, 2013.
- AMORIM, D.S. Fundamentos de Sistemática Filogenética. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2002. p. 136.
- ANTHONY, J. P. et al. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Parasitology**, v.21, n. 10, p. 1-15, 2005.
- ANTON, N.; BENOIT, J.B.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, 185–199, 2008.
- ARIAS, J. L. et al. Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 8, p. 197-190, 2015.
- ARIF, S.H. et al. Albendazole as an adjuvant to the standard surgical management of hydatid cyst liver. **International Journal of Surgery**, v. 6, p. 448–451, 2008.
- ASLAN, M. et al. The diagnostic value of Western blot method in patients with cystic echinococcosis. **New Microbiologica**, v. 34, n. 2, p. 173-177, 2011.
- BADARACO, J.L. et al. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 453–459, 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

- BALBINOTTI, H. et al. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 4, p. 255-260, 2012.
- BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Experimental Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 21–27, 2014.
- BARCELLOS, J. A. **Potencialidades do uso de sistemas nanoestruturados contendo ácido ursólico para otimização da terapia da doença de chagas**. 2014. 25f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2014.
- BART, J. M. et al. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. **Parasitology Research**, v. 98, n. 2, p. 130-137, 2006.
- BEATO, S. et al. *Echinococcus granulosus* in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 2, p. 235– 239, 2013.
- BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D.P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 165-174, 1992.
- BOWLES, J.; MCMANUS, D.P. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. **International Journal for Parasitology**, v. 23, n. 1, p. 969-972, 1993.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, 2016. Disponível em: <http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons/sigsif.ap_quant_abate_cat_rep_cons>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- BRUNETTI, E. et al. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. **Acta Tropica**, v. 114, n. 1, p. 1–16, 2010.
- CARSON, C. F. et al. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food Chemical Toxicology**, v.44, n. 5, p. 616–25, 2006.
- CARSON, C. F. et al. Use of deception to achieve double-blinding in a clinical trial of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for the treatment of recurrent herpes labialis. **Contemporary Clinical Trials**, v. 29, n. 1, p. 9–12, 2008.
- CARDONA, G.A.; CARMENA. D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 10–32, 2013.
- CASULLI, A. E. et al. *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 2, 168–172, 2008.

CEBALLOS, L. et al. Albendazole treatment in cystic echinococcosis: pharmacokinetics and clinical efficacy of two different aqueous formulations. **Parasitology Research**, v. 103, n. 3, p. 355–362, 2008.

CEVS- Centro Estadual de Vigilância em Saúde do RS- Secretaria de Saúde do RS. Porto Alegre, 2014. Disponível em: < http://www.saude.rs.gov.br/lista/180/Centro_Estadual_Vigi>. Acesso em: 8 de setembro, 2014.

CIFTCI, I. H. et al. Effect of otenidine dihydrochloride on viability of protoscoleces in hepatic and pulmonary hydatid diseases. **Journal of the National Medical Association**, v. 99, n. 6, p. 674-677, 2007.

COX S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n. 1, p.170-175. 2000.

COX, S. D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 492-497, 2001.

CUCHER, A.M. et al. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus* sensu lato in humans and natural domestic hosts. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 2, p. 166–175, 2016.

CRUZ-REYES, A. et al. *Echinococcus granulosus* from Mexican pigs is the same strain as that in Polish pigs. **Journal of Helminthology**, v. 81, n. 3, p. 287-292, 2007.

DATASUS - Departamento de Informática do SUS – Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/nirs.def>>. Acesso em: 15 Jan. 2015.

DE LA RUE, M. L. et al. New data on *Echinococcus* spp. in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 103-104, 2006.

DE LA RUE, M. L. Cystic Echinococcosis in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 53-56, 2008.

DE LA RUE, M.L. et al. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n.2, p. 97-103, 2011.

DINKEL, A. et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus* - complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. **International Journal for Parasitology**, v.34, n. 5, p. 645-653, 2004.

DZIRI, C., HAOUET, K., FINGERHUT, A. Treatment of hydatid cyst of the liver: where is the evidence? **World Journal of Surgery**, v. 28, p. 731–736, 2004.

ECKERT, J. et al. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. **World Organisation for Animal Health**, Paris, v. 1, n. 1, p. 1-264, 2001.

ECKERT, T.; DEPLAZES, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 107-135, 2004.

ELISSONDO, M. et al. *In vitro* and *in vivo* effects of flubendazole on *Echinococcus granulosus* metacestodes. **Parasitology Research**, v. 100, n. 5, p. 1003-1009, 2007.

ELISSONDO, M. et al. Could thymol have effectiveness on scolices and germinal layer of hydatid cysts? **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 251-7, 2013.

FRANCHI, C.; VICO, B.; TEGGI, A. Long-Term Evaluation of Patients with Hydatidosis Treated with Benzimidazole Carbamates. **Clinical Infectious Diseases**, v.29, n. 2, p. 304-309, 1999.

FILICE, C.; BRUNETTI, E. Use of PAIR in human cystic echinococcosis. **Acta Tropica**, v. 64, n. 2 ,p. 95–107, 1997.

FLORES, F. C. **Sistema nanoestruturado contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* desenvolvimento de formulações e atividade biológica**. 2011. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 2011.

FLORES F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 4, n. 6, p. 968-972, 2011.

FLORES F. C. et al. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**. v. 175, p.281–286, 2013.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. São Paulo, Ed. Ícone, v. 2, 2004. 469 p.

GRESSLER, L. T. **Atividade da Curcumina livre e nanoencapsulada *in vitro* e *in vivo* sobre ratos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi***. 2014. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

GROSSO, G. et al. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean área. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 13, p. 1425-1437, 2012.

GRENOUILLET, F. et al. *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, 2014.

GUARNERA, E. A. et al. Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. **Acta Tropica**, v.92, p. 153–159, 2004.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245–251, 2008.

- HAAG, K. L. et al. Livestock Trade History, Geography, and Parasite Strains: The Mitochondrial Genetic Structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 90, n.2, p. 234-239, 2004.
- HAILONG, L. V. et al. *In vitro* and *in vivo* treatments of *Echinococcus granulosus* with *Huaier aqueous* extract and albendazole liposome. **Parasitology Research**, v.111, n. 1, p. 961-966, 2013.
- HAJHASHEMI, V. GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 67-71, 2003.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 853–860, 2003.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 1081-5, 2004.
- HAMMER, K. A et al. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n. 5, p.616-625, 2006.
- HARKENTHAL, M. et al. Comparative study on the *in vitro* antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil. **Pharmazie**,v.54, n.6, p.460-63, 1999.
- HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, n. 11, p. 619-26, 2000.
- HARPREET, S. B.; RUPESH, K.B.; VK JAIN, E. N. Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.5, p.2056–2061, 2011.
- HONG, G. Z. et al. Growth and genotypes of *Echinococcus granulosus* found in cattle imported from Australia and fattened in Japan. **Parasitology International**, v. 10, n. 4, p. 35-39, 2011.
- HUTTNER, M. et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Ortlepp, 1937) (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 861-868, 2008.
- JUNGHANSS, T. et al. Clinical Management of Cystic Echinococcosis: State of the Art, Problems, and Perspectives. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 301–311, 2008.
- KAMENETZKY, L. et al. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n.2, p. 129-136, 2002.

- KAVOOSI, G.; PURFARD, A. M. Scolicidal effectiveness of essential oil from *Zataria multiflora* and *Ferula assafoetida*: disparity between phenolic monoterpenes and disulphide compounds. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 5, p. 999–1005, 2013.
- KUL, O.; YILDIZ, K. Multivesicular cysts in cattle: Characterisation of unusual hydatid cyst morphology caused by *Echinococcus granulosus*. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 2, p. 162–166, 2010.
- KUMARATILAKE, L. M.; THOMPSON, R.C.A. A review of the taxonomy and speciation of the genus *Echinococcus*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 68, n. 2, p. 121–146, 1982.
- LAHMAR, S. et al. Transmission dynamics of the *Echinococcus granulosus* sheep–dog strain (G1 genotype) in camels in Tunisia. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 151–156, 2004.
- LAVIKAINEN, C. et al. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. **Parasitology**, v. 127, p. 207–215, 2003.
- LOW W.L. et al. Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Letters in Applied Microbiology**. v.57, p.33-39, 2013.
- LHERM, C. et al. Unloaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: efficiency against bloodstream trypanosomes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 650–652, 1987.
- MACHADO, M. et al. Os óleos essenciais como agentes anti-parasitários. **Revista de Fitoterapia**, v. 10, n. 1, p. 35-44, 2010.
- MCNANUS, D.P. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. **Parasitology**, v. 140, p. 1617–1623, 2013.
- MCMANUS, D.P.; THOMPSON, R.C.A. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. **Parasitology**, v. 127, p. 37–51, 2003.
- MAGGIORE, M. A. et al. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p.1103-1112, 2012.
- MAHMOUDVAND, H. et al. Scolicidal effects of biogenic selenium nanoparticles against protoscolices of hydatid cysts. **International Journal of Surgery**, v. 12, n. 5, p. 399-403, 2014.
- MANZANO-ROMÁN, R. et al. Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future? **BioMed Research International**, v. 2015, p. 9, 2015.

- MARAVILLA, P. P. et al. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. **Acta tropica**, v. 92, n. 3, p.231-6, 2004.
- MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Successful topical treatment of hand warts in a pediatric patient with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v.14, n. 4 ,p. 225–227, 2008.
- MIKUS, J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, v.66, p. 366-368, 2000.
- MIYAKI, C.Y. et al. Reconstrução Filogenética. Introdução e o Método da Máxima Parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução** 2001.p.97-107.
- MOAZENI, M. et al. *In vitro* lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi L.*) essential oil on hydatid cyst protoscoleces. **Veterinary Parasitology**, v.187, n. 1/2, p. 203-208, 2012.
- MOAZENI, M.; ROOZITALAB, A. High scolicial effect of *Zataria multiflora* on protoscoleces of hydatid cyst: an *in vitro* study. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 3, p. 99-104, 2012.
- MOKS, E. et al. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of ‘genotypes’ G5-G10. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 647-654, 2008.
- MONTEIRO, D.U. et al. *Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) in swine of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3, p. 335-338, 2014.
- MORO, L. P.; SCHANTZ, P. M. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. **Parasitology International**, v. 58, n. 2, p. 184–186, 2009.
- NAKAO, M. et al. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. **Parasitology**, v. 134, n. 5, p. 713-722, 2007.
- NAKAO, M. et al. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12, p. 1017-1029, 2013.
- NEGASHA, K.; BEYENEA, D.; KUMSA, B. Cystic echinococcosis in cattle slaughtered at Shashemanne Municipal Abattoir, south central Oromia, Ethiopia: prevalence, cyst distribution and fertility. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, p. 229–234, 2013.
- NELL, M. et al. Primary extrahepatic alveolar echinococcosis of the lumbar spine and the psoas muscle. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n.13, 2011.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. São Paulo, Ed. Atheneu, v. 11, 2005. 239-246 p.

OIE - **World Organization for Animal Health. Institute for International Cooperation in Animal Biologics**, [on line] OIE, 2011, EchinococcosisDisponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>. Acesso em: 01 set. 2011.

OLIVA, B. et al. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, n. 2, p. 185-7, 2003.

OMS, 2013. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. [online] Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/978941564540/en>. Acesso em: 28 jun. 2016.

OTERO-ABAD, B.; TORGERSON, P.R. A. Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2249, 2013.

OUSADDEN, A. et al. A solitary primary subcutaneous hydatid cyst in the abdominal wall of a 70-year-old woman: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v, 1, n. 1, p. 5-8, 2011.

PARK, K. et al. First Successful Puncture, Aspiration, Injection, and Re-Aspiration of Hydatid Cyst in the Liver Presenting with Anaphylactic Shock in Korea. **Yonsei Medical Journal**, v. 50, n.5, p. 717-720, 2009.

PAZINATO, et al. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, p. 77–83, 2014.

PELÁEZ, V. et al. PAIR as percutaneous treatment of hydatid liver cysts. **Acta Tropica**, v. 75, n. 2, p. 197–202, 2000.

PENA, E.F. *Melaleuca alternifolia* oil—its use for trichomonal vaginitis and other vaginal infections. **Obstetrics & Gynecology**. v. 19, p. 793–795, 1962.

PENSEL, P.E. et al. Efficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 12, 2014.

PERRY, N.S. et al. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, n. 3, p.651–659, 2003.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 447-460 p.

ROMIG, T. Epidemiology of echinococcosis. **Langenbecks Archives of Surgery**, v. 388, n. 4, p.209–217, 2003.

ROMIG, T.; EBI, D.; WASSERMANN, M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* sensu lato. **Veterinary Parasitology**, v. 213, p. 76–84, 2015.

- SAGAVE, L. **Atividade de diferentes formulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens**. 2014. 39f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.
- SAID, D. E.; ELSAMAD, L. M.; GOHAR Y. M. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 545-54, 2012.
- SCARLATA, F. et al. Cystic hydatidosis: a rare case of spine localization. **Le Infezioni in Medicina**, v. 19, n. 1, p. 39-41, 2011.
- SCHNEIDER, R. et al. *Echinococcus canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 871–874, 2010.
- SHAHNAZI, M. et al. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. **Acta Tropica**, v.117, p. 47–50, 2011.
- SHARMA, M.; SEHGAL, R.; FOMDA, B.A.; MALHOTRA, A.; MALLA, N. Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Cysts in North Indian Patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 Genotypes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.6, p. e2262, 2013.
- SIBLEY, C.H.; HUNT, S.Y. Drug resistance in parasites: can we stay ahead of the evolutionary curve? **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, 2003.
- SILVA, A.M.; CALDEIRA, J.; NUNES, J.N. P.A.I.R. – alternativa terapêutica do quisto hidático do fígado. **Journal Port Gastrenterol**, v.8, n.1, p. 113-120, 2001.
- SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal Ethnopharmacology**, v.89, n. 2/3, p. 277-283, 2003.
- SILVA, A.M. Human Echinococcosis: A Neglected Disease. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2010, p. 9, 2010.
- SIQUEIRA, N.G. et al. Polycystic echinococcosis in the state of Acre, Brazil: contribution to patient diagnosis, treatment and prognosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 533-540, 2013.
- SMEGO, R.A. et al. Percutaneous Aspiration-Injection-Reaspiration Drainage Plus Albendazole or Mebendazole for Hepatic Cystic Echinococcosis: A Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 8, p. 1073-1083. 2003.
- SMEGO, R.A.; SEBANEGO, P. Treatment options for hepatic cystic echinococcosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 69-76, 2005.
- ŠNÁBEL, V. et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 145-154, 2009.

SOUZA, M.A.F.; MARDINI, L. B. L. F. Diagnóstico de Hidatidose Humana na População Rural de 18 municípios do Rio Grande do Sul, Brasil. XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas, MG, 1999.

SOUZA, M.E. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de óleo de *Melaleuca alternifolia***. 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Nanociências)- Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

SOUZA, M.E. et al. Antimycobacterial and antifungal activities of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, p. 559-560, 2014.

SORIANO, S.V. et al. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia Argentina. **Parasitology International**, v. 59, p. 626–628, 2010.

TORGERSON, P.R.; HEATH, D.D. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. **Parasitology**, v. 127, p. 143–158, 2003.

THOMPSON, R.C.A.; MCMANUS, D.P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 10, p. 452-457, 2002.

THOMPSON, R.C.A. et al. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. **Parasitology**, v. 132, n.3, p. 439-447, 2006.

VIRGINIO, V.G. et al. Excretory/secretory products from *in vitro*-cultured *Echinococcus granulosus* protoscolices. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 15-22, 2012.

WALTON, S. F. et al. Acaricidal Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil. **Archives of Dermatology**, v. 140, n. 5, p. 563-6, 2004.

XIAO, N. et al. Short report: identification of *Echinococcus* species from a yak in the qinghai-tibet plateau region of china. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 445-446, 2003.

XIAO, N. et al. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. **International Journal for Parasitology**, v.35, p. 693–701, 2005.

YONES, D.; TAHER, G.A.; IBRAHEIM, Z.Z. *In vitro* effects of some herbs used in egyptian traditional medicine on viability of protoscolices of hydatid cysts. **Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 3, p. 255-263, 2011.

VALENTE, J.S.S. et al. *In Vitro* Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 181, p. 7-8, 2016.

VARCASIA, A. et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. **Parasitology Research**, v. 101, p.1135–1139, 2007.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO A - Licença Elsevier para reprodução do artigo I.

14/09/2016

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 14, 2016

This Agreement between Danieli Monteiro ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3947801498900
License date	Sep 14, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Acta Tropica
Licensed Content Title	Echinococcus granulosus sensu stricto, Echinococcus canadensis (G7), and Echinococcus ortleppi in fertile hydatid cysts isolated from cattle in Southern Brazil
Licensed Content Author	Danieli Urach Monteiro, Maria Isabel de Azevedo, Carla Weiblen, Tatiana Correia Ribeiro, Jéssica Emmanouilidis, Alexandre Alberto Tonin, Sônia de Avila Botton, Mário Luiz de la Rue
Licensed Content Date	December 2016
Licensed Content Volume Number	164
Licensed Content Issue Number	n/a
Licensed Content Pages	4
Start Page	41
End Page	44
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	CHARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Echinococcus spp. EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO in vitro E ex vivo DO ÓLEO DE Melaleuca alternifolia FRENTE AOS PROTOESCÓLECES de Echinococcus ortleppi
Expected completion date	Nov 2016
Estimated size (number of pages)	75
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Danieli Monteiro Thomás fortes 378 Alto da Boa Vista Santiago, RS 97700000 Brazil Attn: Danieli Monteiro
Customer VAT ID	BR55
Total	0.00 USD

9.2 ANEXO B – Licença Cambridge para reprodução do artigo II.

26/10/2016

RightsLink Printable License

**CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Oct 26, 2016

This Agreement between Danieli Monteiro ("You") and Cambridge University Press ("Cambridge University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Cambridge University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	3976511160801
License date	Oct 26, 2016
Licensed Content Publisher	Cambridge University Press
Licensed Content Publication	Parasitology
Licensed Content Title	In vitro and ex vivo activity of <i>Melaleuca alternifolia</i> against protoscoleces of <i>Echinococcus ortleppi</i>
Licensed Content Author	DANIELI URACH MONTEIRO, MARIA ISABEL AZEVEDO, CARLA WEIBLEN, SÔNIA DE AVILA BOTTON, NADINE LYSYK FUNK, CRISTIANE DE BONA DA SILVA, RÉGIS ADRIEL ZANETTE, THIAGO GUILHERME SCHWANZ, MÁRIO LUIZ DE LA RUE
Licensed Content Date	Oct 20, 2016
Licensed Content Volume Number	undefined
Licensed Content Issue Number	undefined
Start page	1
End page	6
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author
Portion	Full article
Author of this Cambridge University Press article	Yes
Author / editor of the new work	Yes
Order reference number	
Territory for reuse	World
Title of your thesis / dissertation	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Echinococcus</i> spp. EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO in vitro E ex vivo DO ÓLEO DE <i>Melaleuca alternifolia</i> FRENTE AOS PROTOESCÓLECES de <i>Echinococcus ortleppi</i>
Expected completion date	Nov 2016
Estimated size(pages)	75
Requestor Location	Danieli Monteiro Thomás fortes 378 Alto da Boa Vista Santiago, RS 97700000 Brazil Attn: Danieli Monteiro
Publisher Tax ID	GB823847609
Customer VAT ID	BR55
Billing Type	Invoice

26/10/2016

RightsLink Printable License

Billing Address

Danieli Monteiro
Thomás fortes 378
Alto da Boa Vista

Santiago, Brazil 97700000
Attn: Danieli Monteiro

Total

0.00 USD

Terms and Conditions

TERMS & CONDITIONS

Cambridge University Press grants the Licensee permission on a non-exclusive non-transferable basis to reproduce, make available or otherwise use the Licensed content 'Content' in the named territory 'Territory' for the purpose listed 'the Use' on Page 1 of this Agreement subject to the following terms and conditions.

1. The License is limited to the permission granted and the Content detailed herein and does not extend to any other permission or content.
2. Cambridge gives no warranty or indemnity in respect of any third-party copyright material included in the Content, for which the Licensee should seek separate permission clearance.
3. The integrity of the Content must be ensured.
4. The License does extend to any edition published specifically for the use of handicapped or reading-impaired individuals.
5. The Licensee shall provide a prominent acknowledgement in the following format:
author/s, title of article, name of journal, volume number, issue number, page references, , reproduced with permission.

Other terms and conditions:

v1.0

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.