

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

**EFEITOS *IN VITRO* DE *Blepharocalyx salicifolius*
(H.B.K.) O. BERG NA VIABILIDADE DE
PROTOESCÓLECES DE *Echinococcus* spp.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Charlise Bolson Noal

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**EFEITOS *IN VITRO* DE *Blepharocalyx salicifolius*
(H.B.K.) O. BERG NA VIABILIDADE DE
PROTOESCÓLECES DE *Echinococcus* spp.**

Charlise Bolson Noal

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Mário Luiz de la Rue

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS *IN VITRO* DE *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. BERG
NA VIABILIDADE DE PROTOESCÓLECES DE *Echinococcus* spp.**

elaborada por
Charlise Bolson Noal

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Alexandre Alberto Tonin, Dr.
(UFSM)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr.
(CENTRO UNIVERSITÁRIO FRANCISCANO)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2014.

*Dedico este trabalho à minha família,
ao meu orientador e aos meus amigos,
sem eles essa etapa não seria possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de aprender um pouco mais, por sempre me amparar, guiar meus passos e me dar força para seguir em frente.

A minha mãe, meu exemplo de vida, minha amiga e companheira de todas as horas que fez de tudo para tornar esse momento possível, seu cuidado e sua dedicação me deram forças para seguir. Aos meus irmãos que apesar da distância se fizeram presentes através do incentivo e preocupação constante, obrigada pelo carinho. Vocês são a minha base.

A meu orientador Prof. Dr. Mário Luiz de la Rue, pela confiança, paciência, compreensão e oportunidade de realizar o mestrado ao abrir as portas para que eu pudesse trilhar o meu caminho.

Agradeço de forma muito especial a minha querida amiga Danieli Urach Monteiro que não mediu esforços para me ajudar, por fazer parte e ser parte dessa conquista tão importante da minha vida. Muito obrigada por tudo que fez por mim.

A administração da Sefas, em especial a Irmã Ubaldina, Irmã Ursula e Elisandra pela confiança e liberdade que tornaram possíveis conciliar minhas atividades. Meus sinceros agradecimentos.

A Thiele Faccim de Brum pela preciosa ajuda e disposição de tempo que foram essenciais nas diversas etapas desse trabalho.

Aos membros da banca Dr. Alexandre Alberto Tonin, Dr. Roberto Christ Vianna Santos e Dra. Sônia de Avila Botton que aceitaram compor a comissão examinadora, contribuindo para a conclusão deste trabalho e, por todas as palavras de incentivo.

Ao Régis Adriel Zanette pelas dicas e revisões que foram muito importantes neste estudo.

A Professora Eliza Beti de Cassia Stefanon pela amizade e parceria que foram essenciais para realização deste trabalho.

Ao Professor Ademir Farias Morel pela colaboração e disponibilidade.

As minhas colegas de laboratório, meu muito obrigada a Tatiana, Carla, Vanessa e Isabel, pela amizade e companheirismo. Agradeço em especial a Jéssica por toda força e sempre disposição em ajudar. Vocês todas foram muito importantes.

Ao, Maurício, agradeço todo o seu amor, compreensão e por ser sempre um grande incentivador.

E a todos os amigos, colegas e professores que de alguma forma me auxiliaram, apoiaram e me deram força torcendo por mim.

“O maior ativo que alguém pode ter, são pessoas que acreditam em sua capacidade.”

*“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS *IN VITRO* DE *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. BERG NA VIABILIDADE DE PROTOESCÓLECES DE *Echinococcus* spp.

AUTORA: CHARLISE BOLSON NOAL

ORIENTADOR: MÁRIO LUIZ DE LA RUE

Data e Local da Defesa: 19 de dezembro de 2014, Santa Maria.

Equinococose cística (EC) é uma infecção zoonótica causada por um metacésteoide pertencente à família Taeniidae, gênero *Echinococcus*, ocasionada pelo agente etiológico *Echinococcus granulosus sensu lato*. É uma enfermidade que atinge acidentalmente o homem, podendo causar sérios danos à saúde e, em alguns casos até à morte. Seu ciclo de vida compreende dois hospedeiros distintos, o definitivo que abriga o parasito adulto e o intermediário que abriga a fase larvária (cisto hidático). Muitas vezes o diagnóstico da EC é inespecífico, sendo realizado quando a sintomatologia já está agravada. Na maioria das vezes, seu tratamento necessita de intervenção cirúrgica e apesar dos avanços com esse tipo de tratamento os riscos de extravasamento de protoescóleces não podem ser subestimados, podendo com o passar dos anos desencadear recidivas da doença. Com isso, há um interesse especial pela investigação sobre agentes escolícidas, com a finalidade de inibir a formação de cistos hidáticos secundários. Considerando que os extratos obtidos de diferentes plantas têm sido utilizados como: bactericidas, fungicidas, viricidas, inseticidas e também como antiparasitários, a descoberta da utilização destes no controle e no tratamento da EC faz-se necessária, a fim de obter novas opções de tratamento. Diversos avanços têm sido verificados envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Uma espécie vegetal de interesse medicinal, *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg, conhecida no Brasil como “murta”, apresenta-se como uma opção de estudo. Diante disto, este trabalho objetivou avaliar o efeito *in vitro* do extrato bruto e frações das folhas de *B. salicifolius* sobre a viabilidade dos protoescóleces de *Echinococcus* spp. Protoescóleces de *Echinococcus ortleppi*, espécie identificada através da análise molecular, foram expostos a concentrações do extrato bruto de *B. salicifolius* (100, 200, 300, 400, 500, 1000 e 1500 mg/mL) em tempos previamente definidos (5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos (min)). As frações acetato de etila e n-butanólica obtidas do extrato bruto, foram avaliadas em concentrações de 100 e 200 mg/mL, nos tempos de 5, 10, 15 e 30 min, obtendo-se atividade escolícida de 100% em 200 mg/mL aos 5 min para ambas. Foram identificados nas frações ácido gálico e rutina através da cromatografia líquida de alta eficiência. O padrão de ácido gálico apresentou ação escolícida de 100% em 25 mg/mL aos 5 min. Diante disso, é possível inferir que o extrato bruto e frações de *B. salicifolius*, assim como o padrão de ácido gálico possuem ação escolícida frente aos protoescóleces de *E. ortleppi*.

Palavras-chave: *Echinococcus ortleppi*, cisto hidático, escolícida, ácido gálico.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

IN VITRO EFFECTS OF *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. BERG ON THE PROTOSCOLECES VIABILITY OF *Echinococcus* spp.

AUTHOR: CHARLISE BOLSON NOAL

ADVISER: MÁRIO LUIZ DE LA RUE

Day and Place of the Defense: December 19th, 2014, Santa Maria.

Cystic Echinococcosis (CE) is a zoonotic infection caused by a metacestode belonging to Taeniidae family, *Echinococcus* genus and *Echinococcus granulosus sensu lato* specie. Is a condition that accidentally causes the disease in men, may leading serious damage to health and, in some cases, it can lead to death. Their life cycle comprises two distinct hosts, the final host has the adult parasite forms parasite while the intermediate host has the larval stage (hydatid cyst). Often the diagnosis of CE is non-specific and it is performed when the symptoms are already aggravated. Most of the time, its treatment requires surgery and, despite the advances in this kind of therapeutic procedure, the risk of protoscoleces leakage cannot be ruled out, or underestimated, and it may, over the years, triggers the disease recurrence. Therefore, there is a special interest in researches that investigate scolicalidal agents, particularly in order to inhibit the formation of secondary hydatid cysts. Considering that the extracts of different plants have been used for various purposes such as bactericides, fungicides, herbicides, insecticides, and also as antiparasitic, the investigation of their use in the control and/or treatment of cystic echinococcosis is encouraging, especially because these extracts can consist in new treatment options. Several advances have been established involving chemical and pharmacological studies of medicinal plants which permit new compounds with therapeutic properties. A species of medicinal interest, *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg, known in Brazil as murta, is presented as a promising option for this purpose. In view of this, this study aimed to evaluate the in vitro effect of the crude extract and fractions of leaves of *B. salicifolius* on the viability of protoscoleces of *Echinococcus* spp. Protoscoleces of *Echinococcus ortleppi* were exposed to concentrations of crude extract the *B. salicifolius* (100, 200, 300, 400, 500, 1000 and 1500 mg/mL) on predefined times (5, 10, 15, 30, 45 and 60 minutes (min)). N-butanol and ethyl acetate fractions, obtained from the crude extract, were analyzed at 100 and 200 mg/mL concentrations, at 5, 10, 15 and 30 min, yielding scolicalidal activity of 100% at 200 mg/mL at 5 min of evaluation, for both fractions. The fractions were identified as rutin and gallic acid by high performance liquid chromatography. The standart of gallic acid showed scolicalidal action of 100% at 25 mg/mL in 5 min of evaluation. Therefore, the results reached showed that the crude extract and fractions the *B. salicifolius*, as well as gallic acid standard led to a scolicalidal action on protoscoleces of *E. ortleppi*.

Keywords: *Echinococcus ortleppi*, hydatid cyst, scolicalidal, gallic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Apresentações morfológicas: A. <i>Echinococcus</i> spp. adulto; B. Ovo; C. Cisto hidático com vesículas prolíferas; D. Protoescólex invaginado; E. Protoescólex desinvaginado (presentes no interior do cisto hidático)	19
Figura 2 - Ciclo biológico <i>Echinococcus granulosus</i>	22
Figura 3 - Distribuição mundial da equinococose cística	24
Figura 4 - <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (H.B.K.) O. Berg	33
Figura 5 - <i>B. salicifolius</i> - inflorescência	34

MANUSCRITO

Figura 1-Viability test of protoscoleces after exposure to crude extract <i>B. salicifolius</i> leaves	50
Figura 2 - Protoscoleces viability after exposure to EtOAc and BuOH fractions..	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variantes da espécie <i>E. granulosus sensu lato</i>	20
---	----

MANUSCRITO

Table 1 - Content compounds in EtOAc and BuOH fractions from leaves of <i>B. salicifolius</i> HPLC/DAD	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG - Ácido Gálico

β - Beta

cm - Centímetros

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EC - Equinococose Cística

G - Genótipos

G1 - Linhagem cão-ovelha, *E. granulosus sensu stricto*

G2 - Linhagem cão-ovelha Tasmânia, *E. granulosus sensu stricto*

G3 - Linhagem cão-búfalo, *E. granulosus sensu stricto*

G4 - Linhagem cão-equino, *E. equinus*

G5 - Linhagem cão-bovino, *E. ortleppi*.

G6 - Linhagem cão-camelo, *E. canadensis*

G7 - Linhagem cão-suíno, *E. canadensis*

G8 - Linhagem cão-cervídeos, *E. canadensis*

G9 - Linhagem cão-suíno, *E. canadensis*

G10 - Linhagem cão-cervídeos, *E. canadensis*

HA - Hospedeiros Acidentais

HD - Hospedeiro Definitivo

HI - Hospedeiro Intermediário

m - Metros

mg - Miligrama

mg/mL - Miligrama por mililitro

min - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetros

OMS - Organização Mundial de Saúde

P.A.I.R - Punção, Absorção, Injeção e Reaspiração

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RS - Rio Grande do Sul

spp. - Espécies

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Classificação taxonômica	18
3.2 Morfologia	18
3.3 Espécies e variantes	20
3.4 <i>Echinococcus granulosus sensu lato</i>	21
3.4.1 Ciclo biológico e transmissão	21
3.4.2 Distribuição.....	23
3.4.3 Aspectos clínicos.....	25
3.4.4 Dignóstico.....	26
3.4.5 Controle e prevenção	27
3.4.6 Tratamento	28
3.4.6.1 Cirúrgico	28
3.4.6.2 Quimioterapia	29
3.4.6.3 P.A.I.R	30
3.5 Estudos químicos e farmacológicos e as plantas medicinais.....	31
3.5.1 <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (H.B.K.) O. Berg.....	31
3.5.1.1 Sistemática vegetal	32
3.5.1.2 Uso popular e atividade biológica	34
3.6 Ácido gálico	35
3.6.1 Aplicações e propriedades farmacológicas	36
4 MANUSCRITO – <i>IN VITRO</i> EFFECTS OF <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (H.B.K.) O. BERG ON THE PROTOSCOLECES VIABILITY OF <i>Echinococcus ortleppi</i> ...	37
Abstract	39
Introduction	40
Material and methods.....	41
Results	44
Discussion	45
References.....	46
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÃO**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS** referem-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO DE LITERATURA** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A equinococose ou hidatidose é uma zoonose causada por um metacestóide pertencente a família Taeniidae e gênero *Echinococcus*. *Echinococcus* spp. têm uma distribuição global e exerce vários danos à saúde pública (ECKERT et al., 2001, ECKERT & DEPLAZES, 2004; THOMPSON, 2008; MONTEIRO, 2011; NUNNARI et al., 2012).

O ciclo de vida deste parasito requer dois hospedeiros mamíferos distintos, sendo um hospedeiro definitivo (HD), onde o parasito adulto se desenvolve no intestino delgado e um hospedeiro intermediário (HI), no qual o metacestóide geralmente se desenvolve nas vísceras. O HD é sempre um carnívoro que é infectado pela ingestão de protoescoléces presentes nas vísceras. Este, por sua vez, elimina os ovos produzidos pelo parasito adulto através das fezes. Os ovos são capazes de sobreviver no ambiente por períodos variáveis, sendo infectantes tanto para o HI como para o homem. Os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais (HA), abrigando a forma larvária do parasito em diversos órgãos, denominado de cisto hidático (WEN et al., 1993; ECKERT et al., 2001).

A equinococose em humanos pode ocorrer de três formas: (1) equinococose cística (EC), (2) equinococose alveolar e (3) equinococose policística (ECKERT & DEPLAZES, 2004). A EC, causada pelo *E. granulosus sensu lato*, é uma parasitose comum no sul do Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul (RS) devido à proximidade com regiões de fronteira com Argentina e Uruguai que são países endêmicos (ROSENZVIT et al., 1999; de la RUE, 2011).

O desenvolvimento do cisto hidático nos HA é geralmente lento e assintomático, dificultando o diagnóstico da enfermidade. No Brasil, desde 1987, a notificação desta parasitose em humanos não é obrigatória pelo Ministério da Saúde, o que afeta o desenvolvimento de ações e informações sobre a epidemiologia acerca da equinococose (de la RUE et al., 2011). Em torno de 2-3 milhões de casos de EC humanos são estimados ocorrer em todo mundo (OIE, 2011), tornando-se um problema de saúde pública em vários países (MORO et al., 2009; BALBINOTTI et al., 2012; OIE, 2011).

A opção mais indicada de tratamento em humanos é a plena retirada da massa parasitária através da cirurgia, sendo acompanhada de tratamento medicamentoso na maioria dos casos. Os riscos de tratamentos cirúrgicos podem estar relacionados com o desenvolvimento de equinococose secundária devido ao derramamento de protoescoléces viáveis durante a cirurgia; remoção incompleta do cisto, reação anafilática e/ou reações associadas com intervenções cirúrgicas. Evitar o derramamento do líquido hidático e utilizar um escolicida eficaz no interior do cisto são essenciais para um resultado satisfatório e sem recidivas (HAILONG et al., 2012).

Novas possibilidades de tratamento para CE são necessárias, pois muitas vezes o escolicida de escolha acaba por desencadear danos à saúde humana. Portanto a utilização de um adjuvante protoescolicida eficaz é de extrema importância, pois auxilia na redução da taxa de recorrência (MOAZENI et al., 2012).

Muitos esforços estão sendo realizados para descobrir novos compostos antiparasitários a partir de várias fontes. Medicamentos à base de plantas estão sendo cada vez mais utilizados para tratar muitas doenças, incluindo parasitoses (KHAN et al., 2010; MOAZENI et al., 2012). A utilização de extratos de plantas frente aos protoescoléces de *Echinococcus* spp. vem sendo relatada por alguns autores em todo mundo, descrevendo efeitos promissores no controle da doença (MOAZENI et al., 2012; MOAZENI & NAZER, 2010; HAILONG et al., 2012). Dentre um grande número de espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg pertencente à família Myrtaceae, conhecida no Brasil popularmente por murta (DENARDI & MARCHIORI, 2005). Na medicina popular, esta espécie é utilizada como antileucorreica, antidiarreica, digestiva e no tratamento de cistite e uretrite (ALICE et al., 1991). Estudos para investigar a atividade antiparasitária através de frações do extrato de *B. salicifolius* foram realizados por SIQUEIRA et al. (2010) com resultados satisfatórios.

Diante disso, motivou-se a realização deste trabalho com a finalidade de avaliar a atividade escolicida do extrato bruto e frações das folhas de *B. Salicifolius*, bem como seus padrões identificados, frente aos protoescoléces de *Echinococcus* spp.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o efeito *in vitro* do extrato bruto e frações das folhas de *B. salicifolius* sobre a viabilidade de protoescoléces de *Echinococcus* spp.

2.2 Específicos

- Produzir o extrato bruto e frações das folhas de *B. salicifolius*;
- Identificar e quantificar compostos presentes nas frações acetato de etila e n-butanólica das folhas de *B. salicifolius* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Caracterizar molecularmente os cistos hidáticos oriundos de bovinos, para identificar a espécie de *Echinococcus* spp. presente na amostra;
- Determinar diferentes tempos e concentrações do extrato bruto e frações acetato de etila e n-butanólica das folhas de *B. salicifolius* que possuem ação protoescolicida *in vitro*;
- Verificar a ação escolicida total *in vitro* dos padrões de compostos de *B. salicifolius* frente aos protoescoléces de *Echinococcus* spp. determinando a melhor relação entre concentração versus tempo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação taxonômica

Echinococcus spp. é um helminto que pertence ao filo Platyhelminthes, classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea e família Taeniidae (FORTES, 2004). O gênero *Echinococcus* foi descrito primeiramente por Rudolphi (1801). Este parasito pode contaminar humanos e animais, e em alguns casos levar à morte.

3.2 Morfologia

Os parasitos adultos (Figura 1 A) medem em torno de 4 a 6,0 mm e sua morfologia é constituída de escólex (cabeça), onde encontra-se um rostro com duas fileiras de acúleos. O estróbilo (corpo) é constituído por três a quatro proglotes, sendo a primeira jovem, a segunda madura e a terceira gravídica, que corresponde a metade do comprimento do estróbilo (REY, 1991; ECKERT et al., 2001).

A fase larval de *Echinococcus* spp. (Figura 1 C) é constituída por uma estrutura cística, conhecida por cisto hidático ou hidátide, que possui formato arredondado, volumoso, preenchido de líquido claro, com numerosos protoescóleces, sendo esta a forma infectante para o HD (REY, 1991; FORTES, 2004). O cisto é composto por três membranas: membrana adventícia (a mais externa); membrana laminar (constituindo uma barreira à penetração de microrganismos) e membrana germinativa (função reprodutiva na formação de protoescóleces dando origem as vesículas prolíferas). No interior do cisto encontra-se também, a areia hidática que é composta por protoescóleces, fragmentos de membrana e vesículas prolíferas. Os protoescóleces podem ser utilizados na identificação da fertilidade do cisto hidático, tanto no HI, como no homem (ECKERT et al., 2001; VIRGINIO et al., 2012).

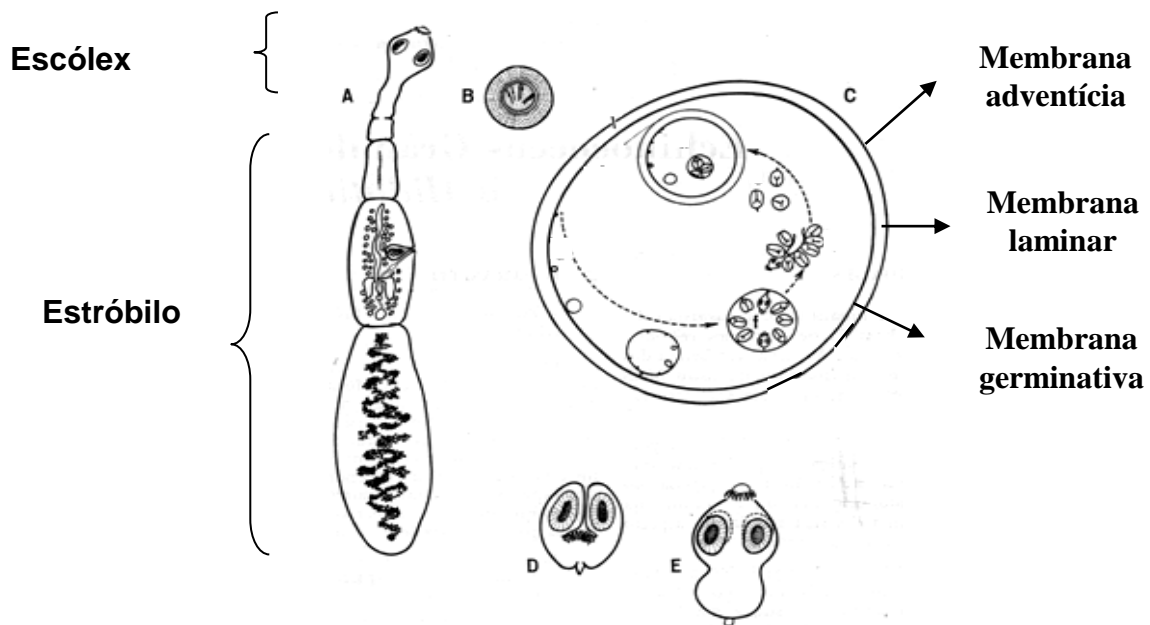


Figura 1 – Apresentações morfológicas: A. *Echinococcus* spp. adulto; B. Ovo; C. Cisto hidático com vesículas prolíferas; D. Protoescólex invaginado; E. Protoescólex desinvaginado (presentes no interior do cisto hidático). Fonte: Adaptação de REY (1991).

Os diâmetros da membrana adventícia diferem dependendo do órgão parasitado, mas geralmente não excedem alguns milímetros. Duas funções estão sendo propostas para esta membrana, a de proteção que embora difícil de avaliar, pode ser apreciada quando considerada a extrema fragilidade do parasito e a nutricional que torna-se mais evidente quando considera-se que a taxa metabólica total do parasito (especialmente aqueles de tamanho maior) exigiria um constante fornecimento nutricional, sendo este provido por canais vasculares dentro desta membrana (GOLZARI & SOKOUTI, 2014).

A membrana germinativa, de forma assexuada por brotamento, dá origem a vesículas prolíferas, e no seu interior originam-se os protoescóceles, sendo que em alguns casos esta pode originá-los diretamente, sem a necessidade das vesículas (ACHA & SZYFRES, 2003). Cada cisto pode conter milhares de protoescóceles, porém nem todos os cistos os produzem. Os cistos que apresentam os protoescóceles são classificados como férteis, enquanto que os que não os formam, são denominados inférteis ou não-férteis (THOMPSON & MCMANUS, 2002).

3.3 Espécies e variantes

Nos últimos anos houve um grande número de avanços no conhecimento molecular do parasito, o que ocasionou um complexo processo de revisão da filogenia e taxonomia do gênero *Echinococcus* (NAKAO et al., 2013). São conhecidas seis espécies de *Echinococcus*, quatro delas são as principais: *E. granulosus* que causa a EC; *E. multilocularis* que provoca a equinococose alveolar; *E. oligarthra* e *E. vogeli* que causam a equinococose policística. Estudos recentes identificaram duas novas espécies, *E. felidis* e *E. shiquicus*, sobre os quais ainda não há dados disponíveis com relação a sua patogenicidade para seres humanos (NUNNARI et al., 2012).

As variantes da espécie *E. granulosus sensu lato* foram definidas em pelo menos dez cepas diferentes (G1 a G10) (ECKERT, 2001), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Variantes da espécie *E. granulosus sensu lato*.

Variantes	Cepa (G: Genótipos)
<i>E. granulosus sensu stricto</i>	cepa de ovelha (G1)
	cepas de ovelhas da Tasmânia (G2)
	cepa de búfalo (G3)
<i>E. equinus</i>	cepa de equinos (G4)
<i>E. ortleppi</i>	cepa de bovino (G5)
	cepa de camelo (G6)
<i>E. canadensis</i>	cepa de suíno (G7 e G9)
	cepa de cervídeos (G8 e G10)

Fonte: Adaptação de ECKERT (2001).

A descrição referente aos dez tipos distintos de cepas (G1-G10) de *E. granulosus* provem de estudos moleculares genéticos que demonstram que *E. granulosus sensu lato* é na verdade um complexo de espécies/genótipos que apresentam uma variabilidade genética marcada (THOMPSON & MCMANUS, 2002; NUNNARI et al., 2012; CARDONA & CARMENA, 2013).

E. granulosus sensu stricto, através da cepa G1, é a causa mais comum de doença em seres humanos podendo ser encontrado em diversos HI (OIE, 2011). No Brasil, a ocorrência da cepa G1 já foi descrita em ovinos, bovinos, suínos, cães e humanos (HAAG et al., 1999; de la RUE et al., 2006; de la RUE et al., 2011, MONTEIRO et al., 2014). Casos de infecção humana com *E. ortleppi* foram relatados por vários autores, dentre eles um caso na Holanda, dois casos na Argentina e um caso no México (BOWLES et al., 1992; KAMENETZKY et al., 2002; GUARNERA et al., 2004; MARAVILLA et al., 2004). Estes resultados são motivo de preocupação epidemiológica, uma vez que *E. ortleppi* pode ser infeccioso para os seres humanos (ECKERT e THOMPSON, 1997).

A identificação das cepas e espécies predominantes em cada região endêmica é crucial, pois identificam algumas características diferentes entre as cepas como: a infectividade para os seres humanos e animais, período de maturação, diferenças biológicas e morfológicas, ciclo biológico, padrão de transmissão, áreas endêmicas afetadas, adaptação a diferentes HI; entre outros (NAKAO et al., 2007; THOMPSON, 2008; ŠNÁBEL et al., 2009; de la RUE et al., 2011).

3.4 *Echinococcus granulosus sensu lato*

3.4.1 Ciclo biológico e transmissão

O ciclo de vida do parasito é do tipo heterôxenico (Figura 2) envolvendo cães e outros canídeos como HD que abrigam a forma adulta do parasito e, ovinos, suínos, caprinos, equinos, entre outros, como HI que podem desenvolver as formas larvais (NUNNARI et al., 2012). Os humanos são os HA, uma vez que não fazem

parte diretamente do ciclo de vida de *Echinococcus* spp. contaminando-se ao ingerir alimentos e/ou água com ovos do parasito (MONTEIRO, 2011).

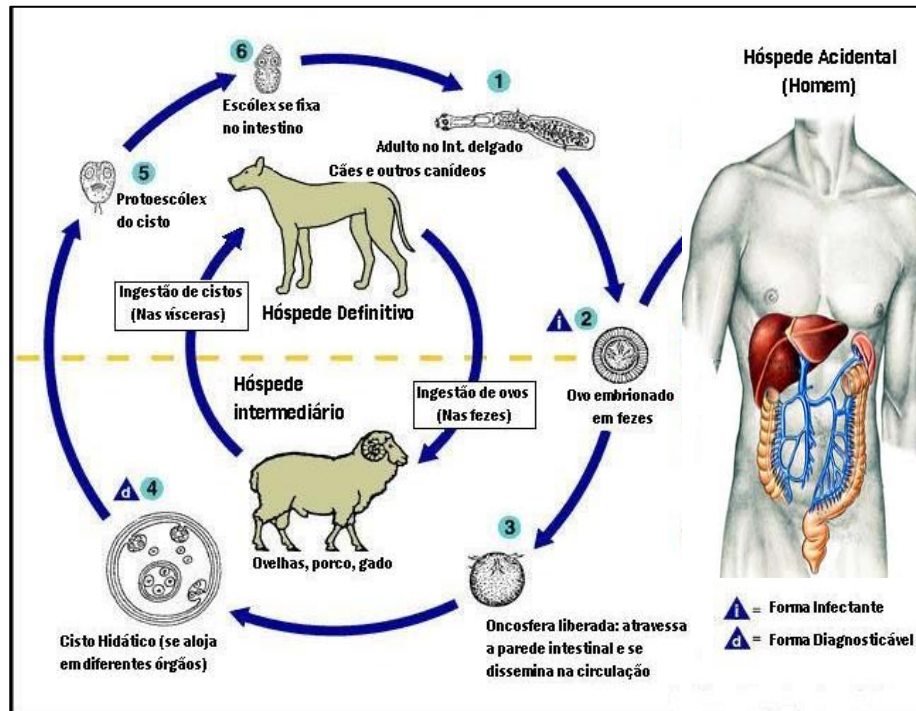


Figura 2 - Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus sensu lato*. Fonte: Adaptação de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Echinococcosis.html>

Os HD são infectados pela ingestão de vísceras contendo cistos hidáticos com protoescóleces no seu interior, estes fixam-se no epitélio do intestino delgado dos canídeos transformando-se em parasitos adultos e se reproduzem sexuadamente por autofecundação (NUNNARI et al., 2012). A proglote madura, que após a fecundação abriga os ovos do parasito em seu interior, passa a ser denominada de proglote gravídica. Esta se desprende do restante do corpo e é eliminada com as fezes do HD, desintegrando-se, liberando os ovos no meio ambiente (ECKERT & DEPLAZES, 2004). Os ovos sobrevivem no ambiente por períodos variáveis, podendo durar até 21 dias em águas pouco profundas ou areia úmida e 11 dias em contato com o ar (REY, 1991; WEN et al., 1993). Cerca de 40 a 60 dias depois que o cão ingeriu as vísceras com hidátides, já estará eliminando ovos do parasito nas fezes (NEVES & FILIPPIS, 2010).

As formas larvais, denominadas de metacestódeos, desenvolvem-se nos órgãos internos de várias espécies de mamíferos (HI), principalmente herbívoros e ocasionalmente em humanos (DINKEL et al., 2004). Sendo assim, a contaminação dos HI ocorre através da ingestão de ovos do parasito presente nas fontes de alimentação destes animais. No intestino delgado, por ação alcalina sobre o embrióforo em presença da bile ocorre à liberação da oncosfera, que auxiliada pelos acúleos invade a mucosa chegando à circulação sanguínea, podendo ser distribuída aos diferentes órgãos do HI. No órgão afetado ocorre um rearranjo estrutural para a formação do cisto hidático ou hidátide (REY, 1991). Este ciclo normalmente é assintomático e o seu desenvolvimento depende do hospedeiro e do órgão parasitado (ALMEIDA et al., 2008).

A transmissão da EC é influenciada por uma série de fatores intrínsecos à região, dentre eles os fatores climáticos que irão favorecer a dispersão dos ovos no meio ambiente através de ventos, chuvas, umidade, radiação solar, entre outros. A manutenção do agente etiológico nos hospedeiros e no meio ambiente, os abates domiciliares sem a devida inspeção sanitária e o fornecimento de vísceras cruas do HI contendo a forma larvária do parasito para os cães, são as principais formas de perpetuar o ciclo de vida de *Echinococcus* spp. (FORTES, 2004).

3.4.2 Distribuição

A EC tem uma distribuição geográfica mundial com a presença de focos da doença em todos os continentes habitados (Figura 3), sendo encontrada principalmente na Ásia, África, América do Sul, Canadá e na região do Mediterrâneo (YONES et al., 2011). Sua alta prevalência em humanos e hospedeiros animais é encontrada em países de clima temperado (GROSSO et al., 2012). Devido a sua ampla distribuição a EC está sendo considerada, emergente em diversos países (REY, 1991; OIE, 2011; GROSSO et al., 2012).

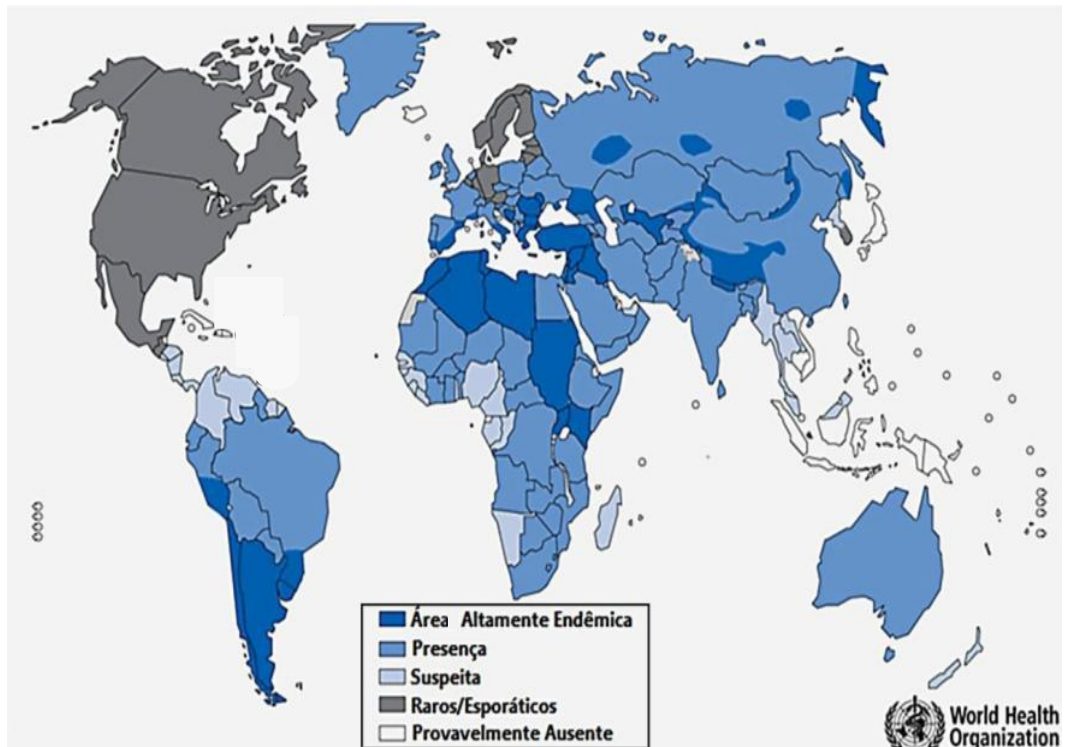


Figura 3 - Distribuição Mundial da Equinococose Cística. Fonte: Adaptação de http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_echinococcosis_2009.png

No Brasil a maioria dos casos de EC é relatada no RS, com os primeiros casos conhecidos no início do século XX. Na metade sul do RS a agricultura e pecuária são importantes atividades econômicas. Nas fazendas o hábito de usar cães para auxiliar na criação de bovinos, juntamente com a prática de alimentá-los com vísceras cruas destes animais, ajuda na perpetuação do ciclo de vida do parasito (TORGERSON & BUDKE, 2003; FARIAS et al., 2004; de la RUE, 2008).

Os locais endêmicos da equinococose geralmente são as pequenas propriedades produtoras de carne, especialmente bovina, caprina, ovina e suína, 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 dos 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).

Nas regiões endêmicas, as taxas de incidência humana para a EC pode chegar a mais de 50 por 100.000 pessoas/ano. Na pecuária, a prevalência da

equinococose encontrada em matadouros de áreas hiperendêmicas da América do Sul varia 20-95% dos animais abatidos. Os custos anuais associados à equinococose são estimados em uma perda de 3 bilhões de dólares (OMS, 2014).

Destaca-se a importância da EC, não só em áreas de endemismo, mas também em locais considerados não endêmicos devido ao comércio de gado, podendo ocorrer novos focos (MAMUTI et al., 2002; YONES et al., 2011). Infelizmente, estudos indicam que a ocorrência da equinococose tem aumentado em diversas regiões do mundo (ECKERT et al., 2000; YONES et al., 2011).

3.4.3 Aspectos clínicos

A infecção humana com *E. granulosus* leva ao desenvolvimento de uma ou mais hidátides localizadas principalmente no fígado (80%) e nos pulmões (20%), e menos frequentemente nos ossos, rins, baço, músculos, sistema nervoso central, olhos, coração e medula óssea (cerca de 0,5%) (MONTEIRO, 2011; OMS, 2014). O acometimento geralmente do fígado e dos pulmões, é provável, que possa ser explicado pelo grande aporte sanguíneo destinado a estes órgãos, uma vez que *Echinococcus* spp. atinge o órgão-alvo através da via sanguínea (MONTEIRO, 2011).

A maioria das infecções primárias consiste de um único cisto, mas há um percentual de 20% até 40% de pessoas infectadas com múltiplos cistos. Os sintomas apresentados dependem não só do tamanho e do número de cistos, mas também do órgão acometido (NUNNARI et al., 2012). A hidátide varia de tamanho, inicialmente mede cerca de 1,0 mm de diâmetro, mas com o passar dos meses e anos pode chegar a 10 cm de diâmetro (NEVES & FILIPPIS, 2010).

Os sinais clínicos podem ser variáveis, a dor e o aumento do volume abdominal são os sintomas mais comuns relatados pelos pacientes, geralmente causados pela compressão do órgão afetado. No pulmão a tosse seca aumenta no decorrer da evolução da hidátide, além de taquipneia, dispneia e febre (FORTES 2004). Dor abdominal, náuseas e vômitos são comumente relatados quando hidátides ocorrem no fígado. Sinais não específicos incluem anorexia, perda de peso e fraqueza, outras ocorrências dependem da localização do cisto hidático e a

pressão exercida sobre os tecidos circundantes (OMS, 2014). Cistos pequenos, calcificados podem permanecer por anos no organismo de forma assintomática (FORTES, 2004).

As formas mais graves da doença podem surgir após a ruptura espontânea ou mecânica de um cisto hidático no organismo, levando ao extravasamento do conteúdo, o que pode desencadear choque anafilático ou o comprometimento de órgãos vitais, podendo ser fatal (NEVES et al., 2005). Devido a menor elasticidade em seu tecido, o pulmão, oferece uma resistência limitada, resultando no crescimento rápido do cisto com aparecimento precoce de sintomas clínicos (FRIDER & LARRIEU, 2010; MOUSAVI et al., 2012). O extravasamento descontrolado de conteúdo da lesão pulmonar pode causar hidatidose pleural ou broncogênica secundária e disseminação peritoneal ou até recidivas da doença. Já no fígado, a resistência do tecido envolvente é forte e, em muitos casos, o crescimento do cisto é lento ou mesmo nulo durante vários anos (FRIDER & LARRIEU, 2010).

Nos HI, os sinais clínicos são variáveis, dependendo da espécie e, principalmente, do comprometimento do órgão parasitado, além do tempo de contaminação. Nas espécies de produção pecuária, geralmente, os sinais são inaparentes e a doença só é percebida na ocasião do abate (ECKERT et al., 2001). No cão, geralmente, o quadro clínico é despercebido, porém quando há grande infecção por *Echinococcus* spp. pode ocorrer diarreia catarral hemorrágica. Uma vez contaminado, o cão pode apresentar ovos do parasito pelo corpo todo, incluindo a região perianal, pelos e focinho (FORTES, 2004; OIE, 2011).

3.4.4 Diagnóstico

A EC, em muitos casos, é subdiagnosticada por ser frequentemente uma condição silenciosa que se desenvolve ao longo de vários anos e cujos sintomas são aparentes apenas quando há uma alteração no funcionamento dos órgãos acometidos (CAPPELLO et al., 2013). Sendo assim, o diagnóstico pode ser acidental, associado a uma ultrassonografia abdominal realizada por outras razões clínicas (NUNNARI et al., 2012). Estas razões podem estar relacionadas quando um

grande cisto ou massa tem algum efeito mecânico na função do corpo; quando fenômenos alérgicos ou outros sintomas como eosinofilia ocorrem sobre ruptura traumática acidental de um cisto com conseqüentes reações de hipersensibilidade aguda; verificação do corpo ou cirurgia por outros motivos (WEN et al., 1993).

A detecção da positividade da parasitose pode ser realizada também através dos ovos nas fezes do HD, por biologia molecular ou pelo exame parasitológico de fezes (FERREIRA et al., 2001). Por se tratar de uma metodologia com boa sensibilidade, especificidade e alta confiabilidade, as técnicas de biologia molecular estão desempenhando um relevante papel no diagnóstico desta enfermidade (FORTES, 2004; THOMPSON et al., 2006; ŠNÁBEL et al., 2009).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo empregada para a identificação correta do parasito, tanto na forma de adulto como na larvária, através diferentes cepas de *Echinococcus* spp. (XIÃO et al., 2003; THOMPSON et al., 2006; ŠNÁBEL et al., 2009; de la RUE et al., 2011). A PCR é uma metodologia baseada na amplificação *in vitro* de segmentos de DNA do parasito que pode estar presente na amostra analisada. Uma vez amplificada, a sequência de nucleotídeos do DNA do parasito poderá ser facilmente detectada por eletroforese em gel de agarose. Entretanto para correta etiologia da amostra utiliza-se o método de sequenciamento, visando realizar análises comparativas para identificação da espécie em questão. Estas metodologias conferem segurança ao diagnóstico e desta forma, pode-se rastrear as áreas de possível contaminação parasitária (FERREIRA et al., 2001).

3.4.5 Controle e prevenção

Programas brasileiros de controle de equinococose são mencionados desde o primeiro acordo entre os governos do Uruguai e do Brasil em 24 de junho de 1941, mas poucos resultados podem ser observados. Algumas tentativas esporádicas foram feitas no passado, porém nenhuma delas continuou por pelo menos durante alguns meses para produzir resultados mensuráveis (de la RUE, 2008).

Enfatizar em longo prazo medidas de educação em saúde pública, atividades veterinárias de melhorias de higiene no abate, registros de cães, inspeção de carnes e posterior condenação de cortes são ações muito importantes. Uma legislação que inclua medidas específicas que orientam para a interrupção da transmissão do parasito também se torna relevante (TORGERSON & BUDKE, 2003; ECKERT & DEPLAZES, 2004).

A identificação de locais endêmicos é de extrema importância, pois as medidas profiláticas de educação sanitária devem convergir em áreas sob-risco de contaminação. A eliminação do parasito deve ser preconizada em todas as fases do seu ciclo biológico, levando em conta que o cisto hidático pode permanecer no HI por toda sua vida, e quando abatido e fornecido para os cães pode dar início a um novo ciclo de vida do parasito. Sendo assim, é indispensável, que todas as ações sejam desempenhadas de maneira sistemática, ininterrupta e rigorosamente controlada (ECKERT et al., 2001; FORTES, 2004).

3.4.6 Tratamento

Nos humanos o tratamento depende basicamente do órgão comprometido, do estágio biológico larvário, bem como da quantidade de cistos hidáticos presentes no órgão afetado (NEVES et al., 2005). Até os anos 1980, a cirurgia era a única opção para o tratamento da EC. A quimioterapia com os compostos benzimidazólicos e, posteriormente, o tratamento por P.A.I.R. (punção do cisto; aspiração; injeção e reaspiração) utilizando produtos como, por exemplo: álcool e solução de sódio hipertônica, foram subsequentemente introduzidos (ELISSONDO et al., 2008; FRIDER & LARRIEU, 2010).

3.4.6.1 Cirúrgico

O tratamento por excisão cirúrgica consiste na retirada do cisto da parede do órgão. Este procedimento requer uma série de cuidados e habilidade do cirurgião,

sendo que aproximadamente 90% dos pacientes evoluem para a cura com este método (ECKERT et al., 2001). A cirurgia não é recomendada em pacientes nos quais contra indicações gerais para a cirurgia se aplicam, por exemplo, mulheres grávidas, cistos assintomáticos inativos, cistos muito pequenos, cistos múltiplos ou cistos que são de difícil acesso (FRIDER & LARRIEU, 2010).

O extravasamento do líquido hidático rico em protoescoléces durante a cirurgia é uma das principais causas de recorrência, sendo esta uma das complicações após o procedimento de remoção cirúrgica (MOAZENI & ROOZITALAB, 2012). Há uma taxa média de 2,2% de morte no pós-operatório para pacientes cirúrgicos e aproximadamente 6,5% dos casos de recidiva após a intervenção requerem tempo de recuperação prolongado (OMS, 2014).

3.4.6.2 Quimioterapia

Com relação à quimioterapia para seres humanos, o albendazol e mebendazol têm sido cada vez mais usados para tratar a EC (FRIDER & LARRIEU, 2010). Esses medicamentos anti-helmínticos são utilizados após o procedimento cirúrgico para evitar recidivas, assim como nos tratamentos de cistos pequenos ou vários órgãos afetados onde, um método invasivo não seria necessário (NEVES et al., 2005).

A quimioterapia é importante porque a cirurgia completamente curativa não é sempre possível. O resultado da terapia com benzimidazólicos está relacionada com a calcificação e fibrose dos cistos, sendo que cistos "recentes" e/ou com paredes finas são mais acessíveis aos fármacos do que os cistos "velhos" mais espessos ou com paredes calcificadas. O albendazol pode ser usado em pacientes de qualquer idade e mostra melhor absorção e distribuição nos tecidos do que o mebendazol. Realizar avaliação dos sinais de hepatotoxicidade é obrigatório em todos os pacientes que recebem albendazol, sendo contraindicado em doenças hepáticas crônicas avançadas. A cura por quimioterapia pode ser esperada em cerca de 30% dos casos (FRIDER & LARRIEU, 2010).

O praziquantel no tratamento das infestações pelo parasito adulto no HD mostrou-se atuante, pois age na permeabilidade da membrana celular causando

perda do cálcio intracelular, provocando a contração da musculatura e consequentemente levando a paralisia e morte dos parasitos. Além disso, o fato de poder ser administrado em uma dose única viabiliza o tratamento dos cães (REGERT, 2008).

3.4.6.3 P.A.I.R.

O tratamento através do método P.A.I.R. consiste na punção/aspiração do cisto, guiada por ecografia, seguida de introdução de um escolicida, o qual se deixa atuar durante alguns minutos. Conclui-se o processo com a reaspiração de todo o conteúdo (ECKERT et al., 2001; NEVES et al., 2005). Este método parece ter uma maior eficácia clínica e inferior taxas de complicações e recorrência da doença em comparação à cirurgia (FRIDER & LARRIEU, 2010). Porém, o método P.A.I.R., apesar de ser uma alternativa potencial para o tratamento, também envolve um risco de 2% a 15% de recidivas da doença (CIFTCI et al., 2007).

O uso de agentes escolicidas eficazes durante o P.A.I.R. é essencial para reduzir a recorrência (WEN et al., 1993; ADAS et al., 2009; MOAZENI & ROOZITALAB, 2012). Não há consenso sobre o agente escolicida ideal, mas suas propriedades devem incluir a capacidade de matar os protoescoléces durante um período de exposição de curta duração e ser atóxico para o paciente (CIFTCI et al., 2007).

A solução salina hipertônica, peróxido de hidrogênio e o álcool etílico são alguns dos compostos utilizados como escolicidas. Todos são dependentes da concentração e do seu grau de diluição no conteúdo do cisto (BESIM et al., 1998). Devido à possibilidade de uma variedade de complicações perigosas como a fibrose das vias biliares e necrose hepática, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma necessidade de encontrar novos agentes protoescolicidas mais eficazes e com menos complicações (ECKERT et al., 2001).

3.5 Estudos químicos e farmacológicos e as plantas medicinais

Visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas, muitos estudos químicos e farmacológicos são realizados representando grandes avanços científicos (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas isoladas, para a síntese, ou modelo para compostos farmacologicamente ativos (CALIXTO, 1997).

O controle de helmintoses e geralmente de todas as doenças parasitárias, normalmente é feito com antiparasitários sintéticos (MAGGIORE et al., 2012). No entanto, de acordo com as circunstâncias e em função da sua eficácia, anti-helmínticos naturais produzidos através de vegetais, podem oferecer uma alternativa sendo até sustentavelmente e ambientalmente aceitáveis (ELISSONDO et al., 2008; YONES et al., 2011).

Extratos de plantas medicinais como *Satureja khuzestanica* e *Olea europaea* foram relatadas por Zibaei et al. (2012), por terem ação protoescolicida. Também Yones et al. (2011) utilizaram ervas da medicina tradicional egípcia como *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*, onde diversas concentrações analisadas obtiveram resultados significativos como protoescolicidas.

3.5.1 *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg

Pertencente à família Myrtaceae e subfamília Myrtoideae, *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg, (DENARDI & MARCHIORI, 2005) é conhecida popularmente por murta, cambuí, cambuim, maria-preta, murtinha, guruçuca, pitanga-da-várzea, vassourinha, guabiju, pitangueira-do-banhado, piúna-preta, murteira, guabiroba e guamirim (CARVALHO, 2006; LANDRUM, 1986; LORENZI, 1998). Myrtaceae é uma família pantropical e abriga cerca de 3.800 espécies organizadas em aproximadamente de 130 gêneros (LUCAS et al., 2005). No Brasil, está representada por 26 gêneros e em torno de 1.000 espécies (BUNGER, 2012).

Blepharocalyx é um gênero sul americano que compreende três espécies, das quais *B. salicifolius* (H.B.K.) O. Berg é a mais difundida, abrangente desde o Equador até o Uruguai. As outras duas espécies têm intervalos mais limitados; *B. cruckshanksii* (Hook. et Arn.) Niedenzu é restrita ao centro e sul do Chile e *B. eggersii* (Kiaerskou) Landrum cresce em Antilhas, Venezuela e norte do Brasil (LANDRUM, 1986; LIMBERGER, 2001).

No Brasil, *B. salicifolius* distribui-se nos estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2006). No RS, a espécie encontra-se em praticamente toda a área de ocorrência do pinheiro brasileiro, bem como na serra do sudeste, sobretudo nos municípios de Canguçu, Dom Feliciano, Santana da Boa Vista e Piratini, e, na campanha do sudoeste, na bacia dos rios Santa Maria e Quaraí (REITZ et al., 1988).

3.5.1.1 Sistemática vegetal

A espécie *B. salicifolius* é uma árvore de pequeno porte até grande (4 a 25 m). Desenvolve-se nos mais variados ambientes ou estágios da vegetação, desde campos abertos até sub-bosques desenvolvidos. É particularmente frequente em solos úmidos de matas ciliares e submatas de pinhais possuindo elevada potencialidade de adaptação. Segundo Alice et al. (1995) *B. salicifolius*, é uma árvore, perenifólia, com tronco reto e cilíndrico, casca grossa e fissurada longitudinalmente (Figura 4).



Figura 4 - *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg. Fonte: CARVALHO (2013).

Landrum (1986) descreve que *B. salicifolius* é uma espécie bem-definida, que se distingue através dos seguintes caracteres: pelos simples, cálice aberto e lobos calicinares fortemente côncavos, deiscentes na ântese. De acordo com o autor, as descontinuidades no padrão de variação não são suficientes para o reconhecimento de espécies distintas, motivo pelo qual mais de sessenta binômios foram por ele reduzidos à sinonímia de *B. salicifolius*. O pensamento taxonômico predominante segue esse autor que reconhece apenas *B. salicifolius* para a flora sul-brasileira.

As folhas de *B. salicifolius* são simples, inteiras, de até 7 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, ápice e base agudos, verde escuras quando adultas (ALICE et. al, 1995). As flores são geralmente hermafroditas e brancas (Figura 5) (REGO, 2008). A floração ocorre de agosto a janeiro, e a polinização é realizada por abelhas e diversos insetos pequenos (REGO, 2012).



Figura 5 - *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg – inflorescência. Fonte: CARVALHO (2013).

O fruto é uma baga globosa de 3 a 5 mm, glabra e avermelhada, com uma a quatro sementes (BARROSO et al., 1999; CARVALHO, 2013). A maturação ocorre de janeiro a março e a dispersão dos frutos e sementes é zoocórica, realizada principalmente pela avifauna e pelo lagarto-teiú (*Theju tupinamba*) (CARVALHO, 2006; SILVA JÚNIOR, 2005).

3.5.1.2 Uso popular e atividade biológica

Na medicina popular, esta espécie é utilizada como antileucorreica, antidiarreica, digestiva e no tratamento de cistite e uretrite. A triagem fitoquímica das folhas revelou a presença de flavonoides, taninos e terpenos (ALICE et al., 1991). Mentz et al. (1997) relatam que as folhas e as cascas contêm princípios ácidos, aromáticos e adstringentes, sendo usadas nos fluxos intestinais, cistites, uretrites e prolapso do reto. Fenner et al. (2006) descreveram o uso das folhas para leucorreia.

Com relação a atividade leishmanicida do extrato bruto de *B. salicifolius*, estudos demonstraram ação citocida contra amastigotas de *Leishmania amazonensis* (SIQUEIRA et al., 2010). Limberger et al. (2001) realizaram análises com infusões obtidas a partir de folhas secas e frescas de *B. salicifolius* para avaliação da atividade antibacteriana e antiespasmódica. Todas as amostras analisadas apresentaram atividade antibacteriana significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A maior atividade foi observada com o extrato obtido das folhas secas para *Escherichia coli*. A infusão a partir de folhas frescas inibiu a ação estimulante da acetilcolina sobre a musculatura intestinal (inibição média de 45%). Nesse estudo também foram avaliados os componentes do óleo essencial obtido a partir de folhas frescas, onde foram identificados 42 componentes, sendo os compostos majoritários representados por 1,8-cineol, linalol e β -cariofileno.

3.6 Ácido gálico

O ácido gálico (AG) é um composto fenólico presente em diversas plantas, que pode ser obtido através de hidrólise ácida ou alcalina de taninos. O AG e seus derivados são abundantemente encontrados em frutas e plantas, sendo um dos principais componentes fenólicos presentes nos chás preto e verde (EGER, 2010).

Quimicamente denominado como ácido 3,4,5-tri-hidróxi-benzóico, sua forma molecular é dada por $C_6H_2(OH)_3COOH \cdot (H_2O)$. Apresenta-se como pó cristalino de coloração branca. É solúvel em acetona, acetato de etila e dimetilsulfóxido (DMSO), apresenta baixa solubilidade em água fria e não é solúvel em clorofórmio e benzeno (POLEWSKI et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

O AG é o principal composto que dá origem aos galotaninos e elagitaninos, os quais são subclasses dos taninos hidrolisáveis. Estudos sugerem que os taninos, dentre os vários metabólitos secundários presentes em plantas, são compostos com potencial atividade anti-helmíntica. Para esta classe de composto foi relatado, um importante papel como agente no controle de *Haemonchus* spp., reduzindo a contagem e o desenvolvimento de ovos (ATHANASIADOU et al., 2001; MOLAN et al., 1999).

3.6.1 Aplicações e propriedades farmacológicas

Os ésteres do AG são amplamente utilizados como antioxidantes em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica. Os ésteres n-alquílicos, também conhecidos como galatos, em especial o galato de propila, octila e dodecila, são utilizados em alimentos, para prevenir mudanças no sabor e no valor nutritivo devido à oxidação de gorduras insaturadas. Além disso, o AG é empregado como fonte para o desenvolvimento de corantes e tintas (MUNOZ et al., 2002; OW & STUPANS, 2003).

Devido ao seu potencial antioxidante, o AG tem a propriedade de atuar como um ótimo inibidor do oxigênio ativo nos radicais livres que são associados como etiologia e patogenia de diversas doenças (STIEVEN et al., 2009). Diversos estudos mostram que estes compostos possuem também propriedades farmacológicas, tais como anticancerígena (LIN & LIANG, 2000), antifúngica (STRIPPOLI et al., 2000; KUBO et al., 2001), antibacteriana (KUBO et al. 2004), antiviral (CHÁVEZ et al., 2006) e anti-inflamatória (LEE et al., 2007).

4 MANUSCRITO

***In vitro* effects of *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. BERG on the
protoscoleces viability of *Echinococcus ortleppi***

Manuscrito submetido a Veterinary Parasitology

***In vitro* effects of *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. BERG on the
protoscolecis viability of *Echinococcus orteppi***

C.B. Noal¹, D. U. Monteiro¹, T. F. Brum², J. Emmanouilidis¹, R. A. Zanette¹, A. F. Morel³, E. B. C. Stefanon⁴, M. L. Athayde², M.L de la Rue^{1*}

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, Brazil.

² UFSM. Department of Industrial Pharmacy, Santa Maria, Brazil.

³ UFSM. Department of Organic Chemistry, Santa Maria, Brazil.

⁴ Centro Universitário Franciscano, Health Sciences Pharmacognosy and Botany Laboratory, Santa Maria, Brazil.

*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: mldelarue@hotmail.com

***In vitro* effects of *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. BERG on the
protoscoleces viability of *Echinococcus ortleppi***

ABSTRACT

The scolical agents are important in the treatment of cystic echinococcosis; however, they often cause significant side effects that may represent harm to human health. Thus, studies seeking for less damaging and more effective scolical agents are justifiable, especially if they also reduce recurrence of the disease. In this sense, *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg (“murta”) has medicinal properties that encouraged us to study its activity as scolical agent, composing the main aim of this research. Protoscoleces of *Echinococcus ortleppi*, species identified through molecular analysis, were exposed to concentrations of crude extract (100, 200, 300, 400, 500, 1000 and 1500 mg/mL) at different time points (5, 10, 15, 30, 45 and 60 minutes). N-butanol and ethyl acetate fractions of *B. salicifolius* (100 and 200 mg/mL) were evaluated at 5, 10, 15 and 30 minutes. It was possible to observe 100% of scolical activity at 200 mg/mL at 5 minutes, using both fractions. Gallic acid and rutin were identified by high performance liquid chromatography. The standard of gallic acid showed scolical action of 100% at 25 mg/mL, at 5 minutes. Therefore, it was possible to observe that the crude extract and fractions of *B. salicifolius* and standard gallic acid have shown scolical action on protoscoleces of *E. ortleppi*.

Keywords: *Echinococcus ortleppi*; protoscolical; scolical agent; gallic acid.

1. Introduction

Echinococcus ortleppi is one of the species of *Echinococcus* spp. found in southern Brazil (Balbinotti et al., 2012) and in determined parts of Europe, Africa, South Asia and the Americas (Dinkel et al., 2004). There are also reports of *E. ortleppi* causing cystic echinococcosis in humans (Maravilla et al., 2004; Sharma et al., 2013).

Until the 80', surgery was the only option for treatment of cystic echinococcosis (CE). Subsequently, chemotherapy with benzimidazole compounds and, later, treatment by PAIR (cyst puncture, aspiration, injection of chemicals, and re-aspiration) were introduced (Moro and Schantz, 2006). One of the major surgical complications of CE is recurrence, after operation of the primary hydatid disease. Dissemination of protoscolex-rich fluid during surgery is a major cause of recurrence and multiple secondary EC (Moro and Schantz, 2009). The use of an effective scolicidal solution during the procedure surgery is an important tool in CE treatment, and this can significantly reduce the rate of disease recurrence (Wen et al., 1993).

Among the countless species of medicinal interest, *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg (Myrtaceae) is distributed on South America from Ecuador to Uruguay (Limberger, 2001). In folk medicine *B. salicifolius* is known as "*murta*" and there are reports of its use in the treatment of leukorrhea, diarrhea, digestive problems and to treat cystitis and urethritis (Alice et al., 1991). Siqueira et al. (2010) reported the antiparasitic activity of *B. salicifolius* extract with satisfactory results against *Leishmania amazonensis*. Whereas scolicidal agents are limited and may cause side effects that can be harmful to human health, the aim of this study was to evaluate the scolicidal action of *B. salicifolius* on protoscoleces of *Echinococcus ortleppi*, as well as determine the possible(s) constituent(s) in charge for this action.

2. Material and methods

2.1 Preparation of plant material

2.1.1 Crude extract

Leaves of *B. salicifolius* were collected in the town of Nova Prata, Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil, in November of 2011. A fertile branch was identified and deposited in the Herbarium of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) under SMDB 13.515.

The leaves of *B. salicifolius* were dried in a laboratory oven, with air circulation, at 40 °C for 72 hours, ground in a Wiley knife mill. After, the plant material was submitted to aqueous extraction for 30 minutes (min) at 70 °C. Later the extract was stored in Petri dishes and transferred to an oven with air circulation, at 42 °C for 48 hours. The plates scraping produced the crude extract of the plant (Palmeiro et al., 2002).

2.1.2 Fractions

For obtaining the components fractions, a crude extract portion was dissolved in 50 mL of distilled water. Initially ethyl acetate was extracted (EtOAc) (3x20 mL) in a separatory funnel, and the solvent was dried through evaporation until the total dryness of the EtOAc fraction. The same procedure was carried out to obtain the fraction of n-butanol (BuOH). The remaining aqueous extract was lyophilized, yielding of aqueous fraction.

2.2 High performance liquid chromatography with diode array detector efficiency (HPLC-DAD) quantitative analysis of rutin and gallic acid

Reverse phase chromatography analyses were carried out under gradient conditions using a Techno Sciences C-18 column (4.6 mm x 250 mm). The flow rate was 0.6 mL/min, the injection volume was 40 µL and the gradient elution was conducted according to the Boligon et al., (2012) method with minor modifications.

Mobile phase consists of water containing 2.0% acetic acid (solvent A) and acetonitrila (solvent B). The ultraviolet (UV) absorption spectra of the standards rutin (R) (Sigma) and gallic acid (GA) (Vetec), as well as the samples were recorded in the range of 230–400 nm. Samples and standards solutions as well as the mobile phase were degassed and filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore). Chromatographic operations were carried out at room temperature and in triplicate. Identification of the compounds was done by comparison of their retention's time and UV absorption spectrum with the respective standards. The substances content were obtained for the calibration curve GA ($y=71293x - 76386$, $r=0.9958$) and R ($y=75045x - 18282$, $r=0.9929$).

2.3 Collection of protoscoleces

Hydatid cysts in lungs of naturally infected bovine were collected in a slaughterhouse in the central region of RS. The hydatid cyst fluid was aseptically transferred to glass cylinders. After 30 minutes, the protoscoleces were deposited on the bottom. The supernatant was then removed and the protoscoleces were washed three times in a saline solution, for later use. The protoscoleces viability was assessed with 0.1% eosin (Moazeni et al., 2012). The percentage considered suitable for the development of our experimental test was 98% of viability.

2.4 Molecular analisys

DNA extraction was performed using an aliquot of the liquid containing hydatid protoscoleces, using a commercial kit (QIAamp tissue) (QIAGEN Inc. Chatsworth, CA) according to the manufacturer's instructions. After extraction it was performed the polymerase chain reaction (PCR) using a pair of primers (5' TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT 3' 5' TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG 3') to amplify a fragment of COX-I gene (Bowles et al., 1992), with modifications. The reactions were carried out in a thermocycler model PTC100 (MJ Research, Inc.). To detect the pattern of bands, the electrophoresis in 1% agarose gel was performed, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The similarity of DNA

sequencing samples of gene COX-I was carried out with using BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool).

2.5 Scolicidal assay

For analysis of the scolicidal effect, it was used a volume of 100 μL for both, hydatid fluid and the testing agents (crude extract, fractions or standard), along with 200 μL of 0.1% eosin. Distilled water was used as dilution vehicle of the agents. The negative control group received 100 μL of hydatid fluid and distilled water, and 200 μL of 0.1% eosin.

2.5.1 Crude extract and fractions of *B. salicifolius*; gallic acid (GA) and rutin (R)

Crude extract was tested at concentrations of 100, 200, 300, 400, 500, 1000 and 1500 mg/mL, at 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min. The BuOH and EtOAc fractions were analyzed at 100 and 200 mg/mL at 5, 10, 15 and 30 min. Patterns of GA and R were evaluated in order to find and record the lowest concentration and the lowest time with full scolicidal action. The negative control group was also assessed in the same conditions.

2.6 Viability test

In the present study, 0.1% eosin was used to check the viability of the protoscoleces. The viability was evaluated by the same optical microscope, at different times and concentrations described, observing motility and eosin staining, performing a count of 100 protoscoleces each evaluation. The protoscoleces were considered viable, when they presented motility and unstained, and not viable with no motility and stained (Moazeni et al., 2012; Yones et al., 2011).

2.7 Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate on different days. Survival curves were plotted using Kaplan-Meier analysis and differences in survival rates were analyzed using the log-rank test in the GraphPad Prism software (version 6.1; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). A P value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The identification and quantification of compounds tests carried out in fractions of *B. salicifolius* are shown in Table 1. The aqueous fraction has not been evaluated by HPLC due to the absence of scolicalidal action in the tests, being, then, none included.

The protoscoleces obtained in this study were identified molecularly as the species *E. orteppi*. Figure 1 shows the *in vitro* effects on the viability of protoscoleces, when submitted to crude extract of *B. salicifolius* in different concentrations, as well as the exposure times. Each point on the figure represents the mean percentage of viable protoscoleces, in different concentrations. It is noteworthy that the concentrations of 300, 400 and 500 mg/mL showed similar results, and the results obtained were considered as effects dose and time-dependent. The negative control group did not present changes throughout the experimental time, maintaining a viability of 98%.

The viability assays for BuOH and EtOAc fractions are shown in Figure 2. The HPLC-DAD analysis revealed two distinct patterns in the extract and fractions of *B. salicifolius*: gallic acid and rutin. The assay performed with standard gallic acid introduced scolicalidal activity of 100%, at concentration of 25 mg/mL/5 min. However, rutin did not present any scolicalidal action in the tests.

4. Discussion

The identification of *E. ortleppi* in this study confirmed the presence of this species of *Echinococcus* in cattle raised in the state of RS. According to Nakao et al. (2013) this parasite is highly fertile and prolific in cattle. In this study the tests with *B. salicifolius* showed highly significant scolicedal effects. According to the results obtained in the tests, using the crude extract, the scolicedal effect was observed at concentrations of 300, 400, 500, 1000 and 1500 mg/mL and it is comparable to the scolicedal action of hypertonic saline (at 20% during 15 min) and with the action of ethyl alcohol (at 95 % during 15 min) (Moazeni and Nazer, 2010). On the other hand, BuOH and EtOAc fractions reached 100% of scolicedal effect at 200 mg/mL in 5 min, presenting the same results in action and time-exposure reported in another study that used sodium chloride at 20% (Ghazanfari et al., 1998). These results were able to validate the methodology used in this study, and most important, it confirmed the scolicedal action of the plant evaluated in our experiment.

The compounds analysis presents in the fractions of *B. salicifolius* identified GA as one component of it, and its scolicedal effect was fully established. GA was found in higher proportion into the fractions EtOAc than in BuOH. The difference from the representativeness of greater scolicedal EtOAc fraction action, when compared with BuOH fraction, at the same time and standard concentration (100 mg/mL), confirmed the action of GA as a scolicedal agent, since it was found in larger amount into the EtOAc fraction, showing a greater effect in a shorter time.

The result obtained with the standard GA presented scolicedal activity, evaluated as ideal, in the shortest time and lowest concentration, demonstrating effectiveness against *E. ortleppi*. Studies with GA, and some of its derivatives, were already reported as effective against *Trypanosoma cruzi* (Albino, 2005; Letelier et al., 1990) and *T. brucei brucei* (Koide et al., 1998). So far, in our study, it has not yet been evaluated the cell death mechanism of protoscolecetes. However, Eger (2010) points out, in his analysis, that the presence and the size of the alkyl chain in GA is related to lipid solubility characteristics and, consequently, it can confer different degrees of cell permeability. It was already stated that a derivative of GA caused ultrastructural changes of *T. cruzi*, with mitochondrial edema and cell lyses. This is related to the report of Pérez-Serrano et al. (1994) reporting that the microtriches probably interferes with protoscolecetes nutrition since microtriches are directly

associated with the nutrients absorption. These considerations may explain a likely GA mechanism of action that leads to protoscoleces death.

Considering the need of new perspectives on the treatment of CE, this study identified the effective scolicidal action of crude extract of *B. salicifolius*, as well as the standard of gallic acid as one of its fractions, against protoscoleces of *E. ortleppi*. However, it is necessary to investigate the action mechanism(s) and the different scolicidal effects of *B. salicifolius in vivo*; so that, the use of this plant, and its derivatives, may become a promising tool as an effective protoscolicidal agent.

References

- Albino, D.B.L., 2005. Avaliação da atividade tripanocida de compostos fenólicos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 74f.
- Alice, C.B. et al., 1991. *Screening* of plants used in south Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol*: 35, 165-171.
- 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.
- Boligon, A.A., Brum, T.F., Frohlich, J.K., Froeder, A.L.F., Athayde, M.L., 2012. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Res J Phytochem*: 6, 84-91.
- Bowles, J., Blair, D., Mcmanus, D. P., 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem Parasit*: 54, 165-174.
- 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.
- Eger, I. 2010. Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo*.

Tese de Doutorado (Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 127 f.

Ghazanfari T., Hassan Z.M., Yaraii R., 1998. The in vitro effects of aqueous garlic extract and garlic fractions on the growth of *Leishmania major*. Kowsar Med J: 5, 117-122.

Koide, T., Nose, M., Inoue, M., Ogihara, Y., Yabu, Y., Ohta, N., 1998. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. Planta Medica: 64, 27-30.

Letelier, M.E., Rodriguez, E., Wallace, A., Lorca, M., Repetto, Y., Morello, A., Aldunate, J., 1990. *Trypanosoma cruzi*: A possible control of transfusion- induced chagas disease by phenolic antioxidants. Exp Parasitol: 71, 357-363.

Limberger, R.P., Sobral, M.E.G., Zuanazzi, J.A.S., Moreno, P.R.H., E.E.S. Schapoval, E.E.S., Henriques, A.T., 2001. Biological Activities and Essential Oil Composition of Leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. Pharm Biol: 39, 308-311.

Maravilla, P., Thompson, R.C.A., Palacios-Ruiz, J.A., Estcourt, A., Ramirez-Solis, E., Mondragon-de-la-Peña, C., Moller-Moreno, M., Cardenas-Mejia, A., Mata-Miranda, P., Aguirre-Alcantara, M.T., Bonilla-Rodriguez, C., Flisser, A., 2004. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. Acta Trop: 92, 231-236.

Moazeni, M., Saharkhiz, M.J., Hoseini, A.A., Alavi, A.M., 2012. *In vitro* scolicial effect of *Satureja khuzistanica* (Jamzad) essential oil. Asia Pac J Trop Biomed: 8, 616-620.

Moazeni, M., Nazer, A., 2010. In vitro Effectiveness of Garlic (*Allium sativum*) Extract on Scolices of Hydatid Cyst. World J Surg: 34, 2677-2681.

Moro P.L., Schantz P.M., 2006. Echinococcosis: historical landmarks and progress in research and control. Ann Trop Med Parasitol: 100, 703-714.

Moro P.L., Schantz P.M., 2009. Echinococcosis: a review. Int J Inf Dis: 13,125-133.

Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A., 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). Internacional J Parasitol: 43, 1017-1029.

Palmeiro, N.M.S., Almeida, C.E., Ghedini, P.C., 2002. Evaluation of the acute toxicity of the aqueous crude extract of leaves of *Plantago australis*. Rev Brasil Toxicol: 15, 15-17.

Pérez-Serrano J., Casado N., Denegri G., Rodríguez-Caabeiro F., 1994. The effects of albendazole and albendazole sulphoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus in vitro*. Int J Parasitol: 24, 219–24.

Sharma, M., Sehgal, R., Fomda, B. A., Malhotra, A., Malla, N., 2013. Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Cysts in North Indian Patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 Genotypes. PLOS Neglect Trop D: 7, 2262.

Siqueira, E. P., Souza-Fagundes, E. M., Sobral, M. E. G., Alves, T. M. A., Rabello, A., Zani, C. L., 2010. Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. Braz J Pharmacog: 20, 416-421.

Yones, D., Taher, G.A., Ibraheim, Z.Z., 2011. *In vitro* effects of some herbs used in egyptian traditional medicine on viability of protoscolices of hydatid cysts. Korean J Parasitol: 49, 255-263.

Wen H., New R.R.C., Craig P.S., 1993. Diagnosis and treatment of human hydatidosis. Br J Clin Pharmac: 35, 565-574.

Table 1 - Content compounds in EtOAc and BuOH fractions from leaves of *B. salicifolius* HPLC/DAD.

Fraction	Compound (mg/g DF \pm SD)	
	GA	R
EtOAc	91,3 \pm 0,70 ^a	95,20 \pm 0,88 ^b
BuOH	66,22 \pm 1,09 ^b	65,26 \pm 0,93 ^c

Values are expressed as the mean (mg/g DF) \pm standard deviation (SD). Letters differ by statistical analysis ($p < 0.05$) ($n = 3$). DF: dry fraction; GA: gallic acid; R: rutin.

FIGURE 1

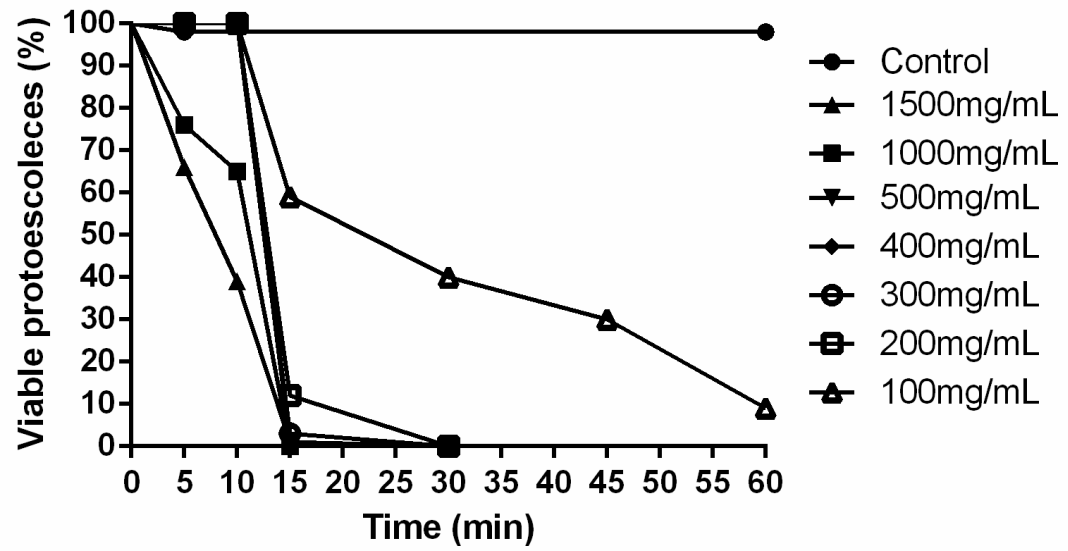
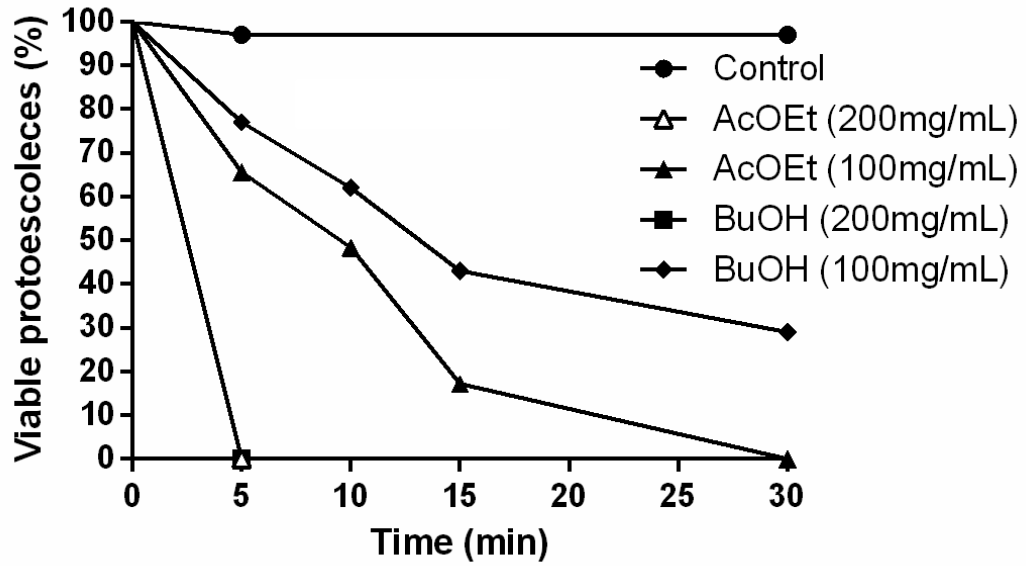


Fig. 1 Viability test of protozoa after exposure to crude extract of *B. salicifolius* leaves ($P < 0.001$).

FIGURE 2

Fig. 2 Protozoales viability after exposure to EtOAc and BuOH fractions ($P < 0.001$).

CONCLUSÃO

- Identificou-se *E. orteppi* em cisto hidático de bovinos no RS.
- O extrato bruto das folhas de *B. salicifolius* possui ação escolicida frente aos protoescoléces de *E. orteppi* em diversas concentrações e tempos avaliados.
- As frações n-butanólica e acetato de etila obtidas do extrato bruto das folhas de *B. salicifolius* possuem ação escolicida frente aos protoescoléces de *E. orteppi*.
- A fração acetato de etila possui maior ação escolicida quando comparada a fração n-butanólica nos mesmos parâmetros tempo versus concentração (100 mg/mL).
- Através da CLAE foram identificados ácido gálico e rutina como componentes ativos das frações n-butanólica e acetato de etila de *B. salicifolius*.
- O padrão de rutina não apresentou ação escolicida frente a *E. orteppi*.
- O padrão de ácido gálico apresentou ação protoescolicida total frente à espécie de *E. orteppi*.
- Novos estudos *in vivo* com *B. salicifolius* são promissores, representando um grande potencial na descoberta de novos ativos no combate da EC.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N., SZYFRES, B.; PAHO. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3. ed. Washington: PAHO, p. 210-215, 2003.
- ADAS, G. et al. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicidal agents on hydatid cysts (in vitro study). **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 1, p. 112-116, 2009.
- ALICE, C.B. et al. *Screening* of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 165-171, 1991.
- ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. 1. ed. Canoas: Editora da Ulbra, p. 109-112, 1995.
- ALMEIDA, F. et al. *Echinococcus granulosus*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p. 1-6, 2008.
- ATHANASIADOU, S. et al. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, n.3, p. 205-219, 2001.
- BALBINOTTI, H. et al. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 255– 260, 2012.
- BARROSO, G. M. et al. **Frutos e Sementes: Morfologia Aplicada à Sistemática de Dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, p. 301, 1999.
- BESIM, H. et al. Scolicidal agents in hydatid cyst surgery. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 10, n. 6, p. 347-351, 1998.
- BOWLES, J., VANKNAPEN, F., MCMANUS, D.P. **Cattle strain of *Echinococcus granulosus* and human infection**. 339, 1358, 1992.

BUNGER, M. O. et al. Myrtaceae no Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 63, n. 4, p. 857-881, 2012.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência hoje**, v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997.

CAPPELLO, E. et al. Epidemiology and clinical features of cystic hydatidosis in Western Sicily: a ten-year review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 2, p. 9351-9358, 2013.

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, n. 3, p. 10-32, 2013.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. 2. ed. Colombo: Embrapa Florestas, p. 312-314, 2006.

CARVALHO, P. T. **Ecologia e relações filogenéticas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae)**. 104 f. Tese de Doutorado (Ecologia). Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2013.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHÁVEZ, J.H. et al. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v.116, n.1-3, p. 53-59, 2006.

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.

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. 1-2, p. 97-103, 2011.

DENARDI, L.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia ecológica da madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. K.) Berg. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 2, p. 119-127, 2005.

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.

ECKERT, J., THOMPSON, R.C.A. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. **Acta Tropica**, v. 64, n. 1, 19-34, 1997.

ECKERT, J., CONRATHS, F. J.; TACKMANN, K. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? **International Journal for Parasitology**, v. 30, n.12, p. 1283-1294, 2000.

ECKERT, J. et al. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. **World Organization for Animal Health**, v. 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.

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo***. 127 f. Tese de Doutorado (Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ELISSONDO, M. C. et al. Efficacy of thymol against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 185-190, 2008.

FARIAS, L.N. et al. Echinococcosis in Southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 46, n. 3, p.153-156, 2004.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**. v. 42, n. 3, 3425-3429, 2006.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 153, 2001.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 453- 469, 2004.

FRIDER, B.; LARRIEU, E. Treatment of liver hydatidosis: How to treat an asymptomatic carrier? **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 33, p. 4123-4129, 2010.

GOLZARI, S. E. J.; SOKOUTI, M. Pericyst: The outermost layer of hydatid cyst. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 5, p. 1377-1378, 2014.

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

GUARNERA, E.A. et al. Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. **Acta Tropica**, v. 92, n. 2, p. 153-159, 2004.

HAAG, K.L. et al. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (cestoda: Taeniidae): selfing or outcrossing? **Parasitology**, v. 118, n.1, p. 63-71, 1999.

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.3, p. 961-966, 2012.

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.

KHAN, R. et al. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal strains. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 5, p. 292-300, 2010.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, n.3, p. 347-350, 2001.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.5, p. 1072-1076, 2004.

LANDRUM, L.R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, v.45, n.4, p.116-160, 1986.

LEE, S.H. et al. Allose gallates suppress expression of pro-inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB in human mast cells. **Planta Medica**, v.73, n.8, p. 769-773, 2007.

LIMBERGER, R.P. et al. Biological Activities and Essential Oil Composition of Leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 4, p. 308-311, 2001.

LIN, J.K.; LIANG, Y.C. Cancer chemoprevention by tea polyphenols. **Proceedings of the National Science Council**, v.24, n.1, p. 1-13, 2000.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum. 125-126, 1998.

LUCAS, E.J. et al. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n.1, p. 35-5, 2005.

MAGGIORE, M. A. et al. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protozoa and metacestodes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p.1103-1112, 2012.

MAMUTI, W. et al. Usefulness of Hydatid Cyst Fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 573-576, 2002.

MARAVILLA, P. et al. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. **Acta Tropica**, n. 92, v.3, p. 231-236, 2004.

MENTZ, L. A. et al. Flora Medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a Obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**. v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MOAZENI, M. et al. *In vitro* scolicial effect of *Satureja khuzistanica* (Jamzad) essential oil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 616-620, 2012.

MOAZENI, M.; NAZER. A. In vitro Effectiveness of Garlic (*Allium sativum*) Extract on Scolices of Hydatid Cyst. **World Journal of Surgery**, v.34, p. 2677-2681, 2010.

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.

MOLAN, A.L.; WAGHORN, G.C.; MCNABB, W.C. Condensed tannins and gastro-intestinal parasites in sheep. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v.61, p.57-61, 1999.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, p.53, 2011.

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. et al. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. **Parasitology International**. v. 58, p. 184–186, 2009.

MOUSAVI, S. R., et al. A retrospective survey of human hydatidosis based on hospital records during the period of 10 years. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 36, n. 7, p. 7-9, 2012.

MUNOZ, D. et al. Dermatitis de contacto por galatos. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 17, n. 2, p. 173-177, 2002.

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.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. Ed. São Paulo: Atheneu, p. 239-246, 2005.

NEVES, D.P.; FILIPPIS, T. **Parasitologia Básica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 101-102, 2010.

NUNNARI, G. et al. Hepatic echinococcosis: Clinical and therapeutic aspects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 13, p. 1448-1458, 2012.

OIE - World Organization for Animal Health. Institute for International Cooperation in Animal Biologics, [on line] OIE, 2011, **Echinococcosis**. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2014.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *WHO*: **Echinococcosis**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs377/en/> Acesso em: 1 set. 2014.

OW, Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, v.4, n. 3, p. 241-248, 2003.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SLAWINSKA, D. **Ácido gálico, um antioxidante natural, em solução aquosa e meio ambiente micelar: estudos espectroscópicos**. Disponível em: <<http://taninos.tripod.com/acidogalico.htm>>. Acesso em: 5 set. 2014.

REGERT, J. **Alternativas para tratamento para a equinococose cística**. 75f. Monografia (Título de Farmacêutico) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

REGO, S. S. **Germinação, morfologia e sanidade de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg E *Myrceugenia gertii* Landrum – Myrtaceae**. 114 f. Tese de mestrado (Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

REGO, S. S. **Tolerância à desidratação e armazenamento de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) Berg. e *Casearia decandra* Jacq.** 142 f. Tese de Doutorado (Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Sudesul. 419-426, 1988.

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

ROSENZVIT, M. C. et al. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. **Parasitology**, v. 118, n. 5, p. 523-530, 1999.

SANTOS, S.C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 615-656, 2007.

SILVA JÚNIOR, M. C. **100 árvores do Cerrado: guia de campo.** Brasília, DF: Rede de Sementes do Cerrado. 129-130, 2005.

SIQUEIRA, E. P. et al. Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 416-421, 2010.

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.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos Essenciais de Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética química**, v. 34, n. 3, p. 7-16, 2009.

STRIPPOLI, V. et al. Propyl gallate increases in vitro antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, n.1, p. 73-76, 2000.

TORGERSON, P. R.; BUDKE, C.M. Echinococcosis – an international public health challenge. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 3, p.191-202, 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.

THOMPSON, R. C. A. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. **Experimental Parasitology**, v.119, n. 4, p. 439-446, 2008.

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.

XIÃO, 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.

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.

ZIBAEI, M. et al. Scolicidal effects of *Olea europaea* and *Satureja khuzestanica* extracts on protoscolices of hydatid cysts. **Korean Journal of Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 53-56, 2012.

WEN, H.; NEW R. R. C.; CRAIG, S. Diagnosis and treatment of human hydatidosis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, n.6, p. 565-574, 1993.