

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Identificação de ovos de *Diectophyma renale* no ambiente e na urina de cães e gatos de Pelotas, e avaliação *in vitro* de extratos vegetais da família Lamiaceae sobre os ovos do nematódeo

Soliane Carra Perera

Pelotas, 2016

Soliane Carra Perera

Identificação de ovos de *Diectophyma renale* no ambiente e na urina de cães e gatos de Pelotas, e avaliação *in vitro* de extratos vegetais da família Lamiaceae sobre os ovos do nematódeo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Josaine Cristina da Silva Rappeti

Pelotas, 2016.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P434i Perera, Soliane Carra

Identificação de ovos de *Diectophyma renale* no ambiente e na urina de cães e gatos de Pelotas, e avaliação in vitro de extratos vegetais da família Lamiaceae sobre os ovos do nematódeo / Soliane Carra Perera ; Marlete Brum Cleff, orientadora ; Josaine Cristina da Silva Rappeti, coorientadora. — Pelotas, 2016.

80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. *Diectophyma renale*. 2. *Origanum vulgare*. 3. *Origanum majorana*. 4. *Rosmarinus officinalis*. 5. Cães e gatos. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Rappeti, Josaine Cristina da Silva, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Soliane Carra Perera

Soliane Carra Perera

Identificação de ovos de *Diectophyma renale* no ambiente e na urina
de cães e gatos de pelotas, e avaliação *in vitro* de extratos vegetais
da família Lamiaceae sobre os ovos do nematódeo

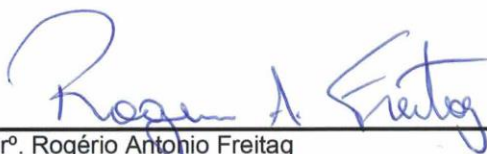
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de
Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de fevereiro de 2016

Banca examinadora:



Profª. Drª. Marlete Brum Cleff (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profº. Drº. Rogério Antonio Freitag
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria



Profª. Drª. Patrícia da Silva Nascente
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico esse trabalho a minha família, em especial ao meu pai e a minha mãe pelo apoio em todos os momentos, amor, carinho e compreensão.

Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus pela vida, pelas pessoas queridas que Ele colocou no meu caminho e também por me permitir concluir mais esta realização profissional;

Ao meu pai e a minha mãe, Osmar e Solange, por todo o amor e confiança, sempre acreditando em mim em todas as situações e me incentivando a seguir firme no meu caminho, independente da dificuldade;

Ao meu irmão, Solimar, pelo incentivo e conselhos para buscar ser sempre melhor;

Ao meu namorado, Thiago, pelo amor, paciência e compreensão, estando sempre ao meu lado e acreditando no meu potencial;

A minha família em geral, principalmente ao tio Gilberto e ao meu primo Gabriel, pois foram importantes ouvintes, conselheiros e apoiadores das minhas decisões;

Aos meus amigos que estiveram comigo no decorrer do mestrado, em especial a Gabi, a Antonieta e a Rosária, que estavam sempre dispostas a me ajudar;

Aos meus amigos que de uma forma ou de outra me acompanharam nessa caminhada e que estiveram por perto e tornaram os meus dias mais felizes;

A minha orientadora, Marlete Brum Cleff, pela ajuda, paciência e apoio no decorrer desse período de estudos e desafios;

A minha co-orientadora, Josaine Rappeti, por ter me incentivado a ingressar no mestrado e dar continuidade à pesquisa com a qual trabalhei;

A professora Gertrud por me ajudar pacientemente todas as vezes necessárias durante a realização prática do trabalho;

A todos os integrantes dos grupos FITOPEET e PRODIC, em especial a Gabi, a Carol, a Karina, a Claudinha, a Cris, pelo convívio, colaboração e aprendizado;

A todos os colaboradores dos Laboratórios de Química, Parasitologia, e Virologia da UFPel, e também do Hospital de Clínicas Veterinária, do Canil Municipal e do Ambulatório Ceval, que permitiram e auxiliaram de forma muito importante o desenvolvimento desse trabalho;

À UFPel e ao PPGBBio pelas oportunidades de cursar a graduação e a pós-graduação em uma instituição e em um programa de pós-graduação renomados;

A todos os animais que, de alguma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

PERERA, Soliane Carra Perera. **Identificação de ovos de *Diectophyma renale* no ambiente e na urina de cães e gatos de Pelotas, e avaliação *in vitro* de extratos vegetais da família Lamiaceae sobre os ovos do nematódeo**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Diectophyma renale parasita diversas espécies de animais carnívoros e o homem, localizando-se com maior frequência no rim direito dos hospedeiros definitivos. Assim, o trabalho teve como objetivos verificar a presença de ovos de *D. renale* no ambiente e na urina de cães e gatos de Pelotas-RS, relatar um caso clínico-cirúrgico da parasitose em canino, avaliar o efeito *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* sobre ovos do nematódeo, além de analisar a toxicidade embrionária dos óleos. Para a avaliação da contaminação ambiental e de animais parasitados na cidade de Pelotas, foram analisadas 100 amostras de solo e coletadas amostras de urina de animais provenientes de diversos bairros do município. As amostras de solo e urina foram processadas pelas técnicas de centrifugo-flutuação e centrifugo-sedimentação, respectivamente, e analisadas em microscópio. No relato clínico-cirúrgico, o paciente apresentou histórico de eliminação de três espécimes de *D. renale* pela urina, e foi diagnosticado com diectofimose na cavidade abdominal e no rim esquerdo. Durante a cirurgia do canino, foram encontrados 23 parasitos na cavidade abdominal. Os extratos hidroalcoólicos e os óleos essenciais foram obtidos a partir de folhas secas de cada espécie vegetal. Os extratos foram utilizados nas concentrações de 0,31% a 10%, e os óleos nas concentrações de 0,09% a 6%. Utilizou-se ainda controle positivo com ivermectina (0,025 mg/mL a 0,1 mg/mL) e tiabendazol (0,025 mg/mL), controle negativo com água destilada estéril e controle de tween 80. As placas foram incubadas por quatro semanas e examinadas semanalmente em microscópio de luz invertida. O teste de toxicidade embrionária foi desenvolvido em ovos de codorna a partir da avaliação da mortalidade embrionária por sete dias. Nos resultados, observou-se ovos de *D. renale* em 3% das amostras de solo analisadas. Das 43 amostras de urina, apenas uma era proveniente de felino e o restante de caninos (n=42), sendo sete amostras de urina de cães (16,66%) e a amostra do felino (100%) positivas. Em relação aos testes com os extratos vegetais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*, observou-se que todos apresentaram efeito na inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale*, sendo que os óleos essenciais apresentaram eficácia de 100% nas concentrações iguais e acima de 0,37%, com destaque para os óleos dos gêneros *Origanum*. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram eficácia em torno de 70% na concentração de 10%. Conclui-se que há presença de ovos de *D. renale* no ambiente da cidade de Pelotas, assim como caninos e felinos se apresentam parasitados, sendo este um importante alerta para a saúde do município por esta parasitose ser uma zoonose e a maioria dos animais ser assintomática. Além disso, as plantas utilizadas nesse estudo apresentaram importante eficácia no combate dos ovos do nematódeo.

Palavras-chave: *Diectophyma renale*; *Origanum vulgare*; *Origanum majorana*; *Rosmarinus officinalis*; ovos; ambiente; cães e gatos.

Abstract

PERERA, Soliane Carra Perera. ***Diectophyma renale* eggs identification in the environment and in the urine of dogs and cats from Pelotas, and *in vitro* avaluation of plants extracts of Lamiaceae Family on the eggs of the nematode.** 2016. 76 f. Dissertation (Master Degree in Science) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Diectophyma renale parasites several species of carnivorous animals and man, being located more frequently in the right kidney of the definitive hosts. Thus, the study aimed to verify the presence of eggs of *D. renale* in the environment and in the urine of dogs and cats from Pelotas, report a clinical and surgical case of parasitosis in canine, evaluate the *in vitro* effect of essential oils and hydroalcoholic extracts of *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* and *Rosmarinus officinalis* on nematode eggs, in addition to analyzing the embryonic toxicity of oils. For the assessment of environmental contamination and infected animals in the city of Pelotas, were analyzed 100 samples of soil and animals collected urine samples from different districts of the municipality. Soil samples and urine samples were processed by the centrifugal-flotation and centrifugal sedimentation techniques, respectively, and examined under a microscope. In clinical and surgical report, the patient presented with a history of eliminating three specimens of *D. renale* the urine, and was diagnosed with diectophymosis the abdominal cavity and the left kidney. During surgery canine, 23 parasites were found in the abdominal cavity. The hydroalcoholic extracts and essential oils were obtained from the dried leaves of each plant species. The extracts were used at concentrations of 0,31% to 10%, and oils in concentrations of 0,09% to 6%. It was also used positive controls with ivermectin (0,025 mg/mL to 0,1mg/mL) and thiabendazole (0,025 mg/ml), negative control with sterile distilled water and control tween 80. The plates were incubated for four weeks and examined weekly in inverted light microscope. The embryo toxicity test was developed in quail eggs from the assessment of embryo mortality for seven days. In the results, there was eggs of *D. renale* at 3% of the soil samples analyzed. Of the 43 urine samples, only one was from feline and the remaining canines (n=42), and seven dogs urine samples (16,66%) and the sample of feline (100%) positive. For tests with the plant extracts of *O. vulgare*, *O. majorana* and *R. officinalis*, it was observed that all of them showed effect in the inhibition of embryonated eggs of *D. renale*, wherein the essential oils showed 100% efficiency in concentrations equal and above 0,37%, highlighting the oils of *Origanum* genres. The hydroalcoholic extracts showed effectiveness around 70% in the concentration of 10%. It is concluded that there is presence of eggs of *D. renale* in the city of Pelotas environment, as well as dogs and cats present parasitized, which is an important alert for the city's health by this parasitosis be a zoonosis and most animals be asymptomatic. In addition, the plants used in this study had significant combat effectiveness of nematode eggs.

Keywords: *Diectophyma renale*; *Origanum vulgare*; *Origanum majorana*; *Rosmarinus officinalis*; eggs; environment; dogs and cats.

Lista de Figuras

Artigo 2: Eliminação de *Dioctophyma renale* pela urina em canino com dioctofimose em rim esquerdo e cavidade abdominal – Primeiro relato no Rio Grande do Sul

Figura 1	Exemplares de <i>Dioctophyma renale</i> removidos cirurgicamente da cavidade abdominal do paciente canino	43
Figura 2	Imagens ultrassonográficas dos exemplares de <i>Dioctophyma renale</i> no interior do rim esquerdo (A) e na cavidade abdominal (B) do paciente canino	44

Artigo 3: Potencial de inibição de embrionamento de ovos de *Dioctophyma renale* com extratos vegetais da família Lamiaceae

Figura 1	Demonstração do cromatograma com os picos dos compostos químicos caracterizados no óleo essencial de <i>O. vulgare</i> , sendo os majoritários correspondentes aos números 16 (4-terpineol), 10 (γ -terpineno), 6 (α -terpineno) e 21 (timol)	53
Figura 2	Demonstração do cromatograma com os picos dos compostos químicos caracterizados no óleo essencial de <i>O. majorana</i> , sendo os majoritários correspondentes aos números 15 (4-terpineol), 9 (γ -terpineno) e 6 (α -terpineno)	53
Figura 3	Demonstração do cromatograma com os picos dos compostos químicos caracterizados no óleo essencial de <i>R. officinalis</i> , sendo os majoritários correspondentes aos números 7 (cineol), 10 (cânfora) e 1 (α -pineno)	54

Lista de Tabelas

Artigo 1: Primeiro isolamento de ovos de *Dioctophyma renale* do ambiente e presença na urina de cães e gatos da cidade de Pelotas, RS

Tabela 1	Distribuição dos animais parasitados por <i>D renale</i> na cidade de Pelotas em relação às variáveis sexo, espécie, raça, idade e tutor	36
----------	--	----

Artigo 3: Potencial de inibição de embrionamento de ovos de *Dioctophyma renale* com extratos vegetais da família Lamiaceae

Tabela 1	Taxas de inibição de embrionamento dos ovos de <i>D. renale</i> na 4ª semana, após tratamento com os óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> , <i>O. majorana</i> e <i>R. officinalis</i>	55
Tabela 2	Taxas de inibição de embrionamento dos ovos de <i>D. renale</i> na 4ª semana, após tratamento com os extratos hidroalcoólicos de <i>O. vulgare</i> , <i>O. majorana</i> e <i>R. officinalis</i>	56
Tabela 3	Taxa de viabilidade embrionária em ovos de codorna no 7º dia, após inoculação com diferentes concentrações dos óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> , <i>O. majorana</i> e <i>R. officinalis</i>	56

Sumário

1	Introdução	11
2	Objetivos do trabalho	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	Revisão de literatura.....	14
3.1	<i>Dioctophyma renale</i>	14
3.1.1	Características morfológicas, hospedeiros e ciclo biológico	14
3.1.2	Patogenia e sinais clínicos	16
3.1.3	Diagnóstico, tratamento e controle	17
3.1.4	Importância da dioctofimose para os animais e para o homem .	20
3.1.5	Importância do estudo da dioctofimose na cidade de Pelotas ...	22
3.2	Plantas medicinais e família Lamiaceae	26
3.2.1	<i>Origanum vulgare</i> , <i>Origanum majorana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	27
3.3	Potencial tóxico dos extratos vegetais	31
4	Artigo 1: Primeiro isolamento de ovos de <i>Dioctophyma renale</i> do ambiente e presença na urina de cães e gatos da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	33
5	Artigo 2: Eliminação de <i>Dioctophyma renale</i> pela urina em canino com dioctofimose em rim esquerdo e cavidade abdominal – Primeiro relato no Rio Grande do Sul	39
6	Artigo 3: Potencial de inibição de embrionamento de ovos de <i>Dioctophyma renale</i> com extratos vegetais da família Lamiaceae	48
7	Considerações finais	65
	Referências	67
	Anexos	

1 Introdução

O uso contínuo e desordenado de quimioterápicos com ação antiparasitária em medicina veterinária vem propiciando o desenvolvimento de resistência aos fármacos (Moreira et al., 2015), além de promover danos aos animais, pessoas e ao ambiente (Corrêa; Salgado, 2011). Na atualidade, é conhecida a problemática das parasitoses, tanto no que se refere ao controle e tratamento, como em relação a presença de resíduos ambientais e em produtos de origem animal (Domingues, 2013).

As parasitoses causadas por helmintos e protozoários em cães e gatos estão entre as enfermidades mais comuns, afetando mais gravemente os animais jovens e imunocomprometidos (Barnabe et al., 2015), sendo responsáveis pelo aumento da morbidade e mortalidade nos animais de companhia. Além disso, muitas das parasitoses são zoonoses e, devido à proximidade dos animais com homem, vem aumentando o risco de transmissão dessas enfermidades, implicando em problemas de saúde pública (Matos, 2013).

Entre as parasitoses zoonóticas, destaca-se a dioctofimose, causada por *Dioctophyma renale*, um nematóide que afeta carnívoros domésticos e silvestres, e também humanos (Nakagawa et al., 2007). Esse helminto tem predileção por parasitar o rim direito do hospedeiro, destruindo todo o parênquima do órgão, porém também pode ser encontrado no peritônio e em outros órgãos e regiões anatômicas (Urquhart et al., 1998).

No exame clínico do paciente parasitado, não são observadas alterações significativas e os sinais clínicos, quando presentes, costumam ser de disúria, hematúria e dor lombar. O diagnóstico é confirmado pela observação de ovos de *D. renale* no sedimento urinário (Urquhart et al., 1998), e o tratamento é realizado por remoção cirúrgica dos parasitos, devido ao fato de não haver terapia medicamentosa eficaz contra a parasitose (Kommers et al., 1999).

Nesse sentido, as plantas tem importante papel, tanto na descoberta de novas opções de tratamento, como tornando possível a substituição ou a redução do uso de fármacos sintéticos (Oliveira et al., 2008). A família Lamiaceae é a terceira maior família de plantas com ação antiparasitária (Furtado, 2006), sendo que diversos estudos com plantas dessa família vem demonstrando efetividade frente a bactérias, fungos, vírus e parasitos. Entre as plantas estudadas, destacam-se *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, conhecidas popularmente como orégano,

manjerona e alecrim, respectivamente (Vági et al., 2005; Freire, 2008; Cleff et al., 2010; Okoh et al., 2010; Freire et al., 2011; Cleff et al., 2012; Castro et al., 2013; Abdel-Massih; Abraham, 2014; Bomfim et al., 2015; Marques et al., 2015). Especificamente com parasitas, o uso de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* pouco tem sido explorado e, com *D. renale* não foram encontrados trabalhos. Dias de Castro et al. (2013) avaliaram a atividade da tintura, extrato hidroalcoólico e extrato aquoso de *O. vulgare* em ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos. Observou-se que todos extratos apresentaram atividade ovicida, destacando-se a tintura e o extrato hidroalcoólico. Azambuja (2015) analisou a atividade dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* em ovos de *Ancylostoma* spp., sendo que todos apresentaram potencial inibitório acima de 90% de eclodibilidade nos ovos de *Ancylostoma* spp.

Assim, a busca por uma forma de controle e tratamento da dioctofimose se torna essencial, uma vez que essa parasitose causa severos danos à saúde dos animais e do homem. Além de apresentar elevada importância em saúde pública, devido ao potencial zoonótico, principalmente na cidade de Pelotas, onde as condições ambientais e sanitárias favorecem o ciclo do parasito, o que justifica os vários casos relatados em animais de companhia (Rocco et al., 2001; Brun et al., 2002; Monteiro et al., 2002; Kommers et al., 1999; Stainki et al., 2011; Milech et al., 2012; Eicke et al., 2014; Pedrassani et al., 2014; Caye et al., 2015).

Diante da dificuldade de tratamento, o ideal no caso da dioctofimose seria interromper o ciclo do parasito. Considerando que as plantas da família Lamiaceae vem apresentando ação efetiva em diversos microrganismos, acredita-se que estas também possam apresentar atividade antiparasitária frente a ovos de *D. renale*.

2 Objetivos do trabalho

Objetivo geral

Identificar a presença de *Diocetophyma renale* no ambiente e em animais, e verificar a atividade *in vitro* de extratos vegetais de plantas da família Lamiaceae em ovos do parasito.

Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de dioctofimose em cães e gatos da cidade de Pelotas a partir da avaliação da presença de ovos de *D. renale* no ambiente e do relato de um caso clínico-cirúrgico atípico da parasitose em um canino;
- Determinar a casuística de cães e gatos diagnosticados com dioctofimose na cidade de Pelotas a partir da análise laboratorial de amostras de urina;
- Verificar o potencial de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale* utilizando óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, e determinar a concentração mais efetiva de cada extrato vegetal nos ovos do nematódeo;
- Verificar a qual dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos possui maior poder de inibição de embrionamento de ovos de *D. renale*;
- Avaliar o potencial tóxico em ovos embrionados de codornas das concentrações mais efetivas dos extratos testados nos ovos de *D. renale*;
- Realizar a análise cromatográfica dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*, a fim de determinar a sua composição fitoquímica e os seus constituintes majoritários.

3 Revisão de literatura

Diectophyma renale

Características morfológicas, hospedeiros e ciclo biológico

Diectophyma renale, também conhecido como *Ascaris renalis*, *Ascaris visceralis*, *Strongylus gigas* e *Eustrongylus gigas*, é popularmente chamado de “verme gigante do rim” devido as suas características morfológicas e por parasitar os rins do hospedeiro definitivo. O helminto pertence à classe Nematoda e à superfamília Diectophymatoidea (Urquhart et al., 1998), sendo descrito pela primeira vez por Goeze, em 1782, quando exemplares do parasito foram encontrados no rim de um cão (Pedrassani, 2009).

Morfolologicamente, o nematódeo apresenta extremidade afiladas com esôfago longo, estreito e com discreta dilatação posterior (Pedrassani, 2009). Além disso, o parasito adulto apresenta coloração vermelho-sangue, devido à forma de alimentação por hematofagia (Colpo et al., 2007).

A sexagem do *D. renale* é realizada por diferenciação morfológica dos nematódeos. O macho é caracterizado por uma bolsa espessa, muscular e em forma de campânula na extremidade posterior, e apresenta tamanho médio de 14 a 45 cm de comprimento e 4 a 6 mm de largura. Por outro lado, a fêmea é caracterizada pela extremidade posterior obtusa, com ânus terminal e ovário único, e apresenta tamanho médio de 20 a 100 cm de comprimento e 5 a 12 mm de largura. Os ovos de *D. renale* são de formato elíptico, coloração castanho-amarelada, parede espessa e rugosa, tampões bipolares, e medições de 73 a 83 µm de comprimento e 45 a 47 µm de largura (Colpo et al., 2007; Pedrassani, 2009).

O período pré-patente do nematódeo é de, aproximadamente, dois a três meses (Urquhart et al., 1998). Por outro lado, o período patente não é bem conhecido, mas há relatos de que o parasito pode viver por três a cinco anos no hospedeiro definitivo (Pedrassani, 2009).

Os hospedeiros definitivos de *D. renale* são canídeos domésticos, principalmente os não domiciliados, e canídeos silvestres, devido a esses animais apresentarem hábitos alimentares pouco seletivos (Figueiredo et al., 2013). Há relatos de diversas espécies de animais infectadas com *D. renale*, destacando-se a

ocorrência em macaco (Ishizaki et al., 2010), lobo-guará (Cansi et al., 2012), furão (Pesenti et al., 2012), gato (Pedrassani et al., 2014), cachorro-do-mato (Ribeiro et al., 2009) e, principalmente, em cães (Stainki et al., 2011; Milech et al., 2012; Caye et al., 2015). Além desses, há relatos de ocorrência de dioctofimose também em humanos (Li et al., 2010; Katafigiotis et al., 2013; Venkatrajaiah et al., 2014).

Os *visions* (*Mustela vision*) são considerados os verdadeiros hospedeiros definitivos de *D. renale*, além de servirem como reservatório para o parasito no ambiente. Estes animais são geralmente infectados por uma grande quantidade de nematódeos machos e fêmeas que se localizam frequentemente no rim, liberando ovos férteis no ambiente, perpetuando o ciclo. O cão é definido como um hospedeiro definitivo anormal e terminal, devido ao ciclo do parasito ser muitas vezes interrompido quando o helminto realiza ciclo errático (Kommers et al., 1999).

D. renale apresenta ciclo indireto pela necessidade de um hospedeiro intermediário para ser concluído. Neste caso, o hospedeiro intermediário é o *Lumbriculus variegatus*, um anelídeo oligoqueta aquático com tamanho de 4 a 10 cm de comprimento por 1,5 mm de largura, e que habita o sedimento no fundo de rios e lagoas de água doce (Pedrassani, 2009).

Além dos hospedeiros definitivos e intermediário, há também os hospedeiros paratênicos envolvidos no ciclo de *D. renale*, que são representados por sapos, rãs e peixes de água doce (Measures; Anderson, 1985; Pedrassani, 2009). Além destes, Mascarenhas & Müller (2014) realizaram o primeiro relato de presença de larvas no estágio infectante em tartarugas de água doce (*Trachemys dorbigni*), sugerindo que estes animais possam atuar no ciclo de *D. renale* como hospedeiros paratênicos. As tartarugas analisadas eram provenientes das cidades de Pelotas e Capão do Leão, e 50% destas apresentaram as larvas encistadas em diversas áreas do corpo, como cavidade abdominal, músculos, mesentério, revestimento seroso do estômago e superfícies do coração, fígado, pâncreas, baço e intestino.

D. renale é um parasito ovíparo de ciclo evolutivo indireto. Os ovos com somente uma célula no interior são eliminados pela urina em grumos ou cadeias, e se desenvolvem em meio aquático até que ocorra o desenvolvimento da larva de primeiro estágio (L1) no seu interior. Após, o ovo com a L1 é ingerido pelo hospedeiro intermediário onde ocorre o desenvolvimento da larva até o terceiro estágio (L3), tornando-se infectante aos hospedeiros definitivos. Estes se infectam ao ingerir o anelídeo com a água de beber, ou pela ingestão de um hospedeiro paratênico que

tenha ingerido anteriormente o hospedeiro intermediário infectado (Urquhart et al., 1998; Measures; Anderson, 1985).

A localização do nematódeo adulto no hospedeiro definitivo pode estar relacionada com o local de penetração da larva infectante no trato gastrointestinal. Se a migração das larvas ocorrer pelas curvaturas menor e maior do estômago, e pelo duodeno, as larvas tendem a se desenvolver, respectivamente, entre os lobos do fígado, no rim esquerdo e no rim direito (Serpa, 2008), sendo esta última a de maior ocorrência relatada (Rocco et al., 2001; Cottar et al., 2012; Zardo et al., 2012). Outros autores sugerem que, o rim direito pode ser o órgão mais acometido por haver um tropismo do próprio parasito em relação a este órgão (Pedrassani, 2009).

As formas adultas fêmeas de *D. renale* nos rins dos hospedeiros definitivos, depositam ovos que são eliminados no ambiente pela urina (Pedrassani, 2009). Nos casos de parasitose por espécimes machos e fêmeas juntos, os ovos eliminados são potencialmente férteis (Figueiredo et al., 2013) e, desta forma, infectantes, dando sequência ao ciclo.

Patogenia e sinais clínicos

O parasito se localiza com maior frequência no rim direito do hospedeiro definitivo (Urquhart et al., 1998; Amaral et al., 2008). Na maioria dos casos, se estiver com suas funções preservadas, o rim esquerdo sofrerá hipertrofia compensatória (Kommers et al., 1999; Leite et al., 2005).

Quando o rim é parasitado, ocorre acúmulo de fluido hemorrágico no seu interior (Serpa, 2008) e o parênquima renal é destruído, restando somente a cápsula do órgão (Urquhart et al., 1998). A liberação de enzimas proteolíticas e lipolíticas, a partir das glândulas esofágicas do parasito, permitem a penetração e a destruição do parênquima renal (Serpa, 2008; Pedrassani, 2009). Além disso, o rim pode apresentar aumento de volume devido à presença dos parasitos no interior (Monteiro et al., 2002), alteração da consistência à palpação, resistência ao corte, cápsula espessa, e superfície da pelve dilatada e irregular devido à formação de grandes cavidades onde os helmintos ficam alojados (Serpa, 2008).

Na presença de *D. renale* na cavidade abdominal, pode haver formação de fibrina (Monteiro et al., 2002), peritonite, aderência e destruição do parênquima do fígado, além de variados graus de inflamação, necrose no peritônio e fluido

serosanguinolento (Monteiro et al., 2002; Rahal et al., 2014). A peritonite é causada pela ruptura dos órgãos por ação das enzimas liberadas pelo nematódeo, e também pela grande quantidade de ovos liberados pelas fêmeas quando presentes na cavidade abdominal (Serpa, 2008). Da mesma forma, a formação de fibrina ocorre pelo início de um processo inflamatório, devido à presença do parasito na serosa do peritônio (Monteiro et al., 2002).

Nos casos em que a cavidade abdominal ou somente um rim é parasitado, os animais com dioctofimose costumam ser assintomáticos (Urquhart et al., 1998; Zardo et al., 2012; Figueiredo et al., 2013). Entretanto, quando as manifestações clínicas surgem, estas costumam ser inespecíficas e relacionadas com peritonite e insuficiência renal, variando conforme a localização, o grau de desenvolvimento do parasito, a reação dos tecidos lesados e a espécie parasitada (Pedrassani, 2009).

Quando o parasito se localiza no rim, o animal parasitado pode apresentar sinais de arqueamento dorsal, dores fortes, hematúria, estrangúria, aumento de volume palpável na região renal e andar vacilante. Outros sinais clínicos apresentados por pacientes com dioctofimose são: fraqueza, relutância em caminhar, maior frequência de micção, anorexia, convulsões, ascite, cólicas abdominais, perda de peso, disúria e irritabilidade (Pedrassani, 2009; Serpa, 2008). Nos relatos de dioctofimose em humanos, os sinais clínicos descritos foram de dor na região lombar direita e febre elevada (Li et al., 2010; Katafigiotis et al., 2013; Venkatrajaiah et al., 2014).

Diagnóstico, tratamento e controle

As formas de diagnóstico da dioctofimose citadas na literatura são por meio de observação de ovos no exame de urina, e achado em cirurgias e necropsias (Kommers et al., 1999; Milech et al., 2012; Perera et al., 2015). Além destes, há os exames de imagem, sendo a ecografia abdominal e a tomografia computadorizada os mais utilizados (Li et al., 2010; Veiga et al., 2011; Cottar et al., 2012; Zardo et al., 2012; Rahal et al., 2014; Silva et al., 2015).

A identificação de ovos na urina é uma das principais formas de diagnóstico da parasitose, sendo estes observados no sedimento urinário (Pedrassani, 2009), mas só é eficaz quando houver presença de parasito fêmea em um dos rins do animal parasitado. Para o exame, a urina pode ser coletada de diferentes formas, como por

cistocentese, cateterismo e micção espontânea. O sedimento é analisado a partir da centrifugação de, no mínimo, 2 mL de urina a 1.500 rpm por 5 minutos. Após, o sobrenadante é descartado e uma fração do sedimento é analisada em microscópio óptico (Lopes et al., 2007). Os ovos de *D. renale* observados no exame de urina são de formato elipsoidal, com tampões bipolares, coloração marrom-claro a amarelada, tamanho variado de 60-80 µm por 39-46 µm, e com uma única célula no interior (Pedrassani, 2009).

Pedrassani et al. (2009) avaliou o tempo de desenvolvimento de ovos de *D. renale* coletados na urina de cães parasitados em diferentes meios e temperaturas. Os ovos foram coletados de urina de cães e incubados a 15°C, 20°C e 26°C em estufa B.O.D., sendo uma parte em meio com água mineral e outra em meio com formalina a 0,1%. Em ambos os meios, os ovos se desenvolveram normalmente sem que ocorresse alteração pela formalina a 0,1%. Por outro lado, as temperaturas afetaram no tempo de formação da larva no interior dos ovos, uma vez que o desenvolvimento ocorreu em menor período de tempo nas temperaturas mais elevadas, sendo ideal a temperatura de 25 a 30°C para o embrionamento em 30 dias.

A ultrassonografia é um método eficiente de evidenciar a presença de *D. renale*, sendo o principal achado a presença de estruturas tubulares de bordos hiperecogênicos e centro hipoeecóico (Ferreira et al., 2010). Esse exame permite avaliar o rim em relação à arquitetura do parênquima, tamanho, regularidade dos bordos, definição córtico-medular e ecogenicidade do tecido (Cottar et al., 2012).

No estudo realizado por Cottar et al. (2012), os autores analisaram sete cães que foram diagnosticados com dirofilariose através do exame de urina concomitantemente com o exame ultrassonográfico. Neste estudo, foi observado que somente o rim direito dos pacientes estava parasitado, sendo que este apresentou imagens com estruturas tubulares de ecogenicidade variável, pouca diferenciação córtico-medular e tamanho reduzido. A partir da análise do rim de um paciente com dirofilariose, Secchi et al. (2010) observaram contorno renal irregular e cápsula delgada. Em ambos estudos, o rim esquerdo se apresentou sem alterações ultrassonográficas nos animais avaliados.

Outra forma de diagnóstico da dirofilariose é através do exame de tomografia computadorizada, como é o caso dos relatos de uma mulher com *D. renale* em ambos os rins (Li et al., 2010) e de um homem com dirofilariose no rim direito (Katafigiotis et al., 2013). Em cães, também foi realizado um estudo de diagnóstico com tomografia

computadorizada contrastada. Nesse estudo, o exame revelou perda da diferenciação da região cortical do rim direito, discreta captação de contraste na periferia e várias formas de anel e estruturas alongadas com parede hiperecólica e centro hipoecólico nos 13 cães avaliados. Em 11 cães, as mesmas estruturas foram observadas de forma livre na cavidade abdominal, principalmente próximas aos lobos hepáticos direito; e em um cão, um parasito foi observado saindo pela cápsula do rim direito.

O diagnóstico de *D. renale* também é feito, muitas vezes, por achados de parasitos em cirurgias e necropsias (Sousa et al., 2011). Milech et al. (2012) relataram o caso de uma fêmea canina encaminhada para ovariosalpingohisterectomia eletiva que, durante o procedimento cirúrgico, apresentou quatro parasitos na cavidade abdominal e cinco parasitos no interior do rim direito. No estudo realizado por Kommers et al. (1999), foram evidenciados 16 cães com dioctofimose a partir de achados de necropsia no período de 1978 a 1996 na Universidade de Santa Maria.

Após o diagnóstico confirmado de dioctofimose, o tratamento indicado é a remoção cirúrgica dos parasitos (Kommers et al., 1999). O tratamento clínico não apresenta bons resultados (Brun et al., 2002; Secchi et al., 2010), uma vez que todo o parênquima do rim é destruído, restando somente a cápsula renal com o parasito dentro e, conseqüentemente, havendo a perda de função do órgão (Urquhart et al., 1998; Secchi et al., 2010; Eicke et al., 2014). Mesmo que o parasito fosse morto pela ação do medicamento antihelmíntico, a sua eliminação do rim seria dificultada devido à espessura e ao tamanho do nematódeo (Pedrassani, 2009). A nefrectomia do rim afetado é realizada e, muitas vezes, o paciente apresenta boa recuperação, como relatado por diversos autores (Brun et al., 2002; Milech et al., 2012; Katafigiotis et al., 2013; Oliveira et al., 2015).

Medidas de prevenção devem ser realizadas, principalmente em ambientes favoráveis ao desenvolvimento da dioctofimose (Russo et al., 2014). Devido ao fato do nematódeo acometer humanos e, principalmente, cães de vida errante, uma forma de controle seria evitar o consumo de água não potável com possível presença do hospedeiro intermediário infectado. Além disso, deve-se evitar a ingestão de carne crua ou pouco cozida de peixes e anfíbios, principalmente em locais em que há elevada prevalência da parasitose (Urquhart et al., 1998; Pedrassani, 2009; Li et al., 2010; Katafigiotis et al., 2013). É necessário também conscientizar a população sobre a relevância dessa parasitose, que gera riscos à saúde humana e animal, e detectar a doença nos animais parasitados. Assim, deve-se investigar o local de convívio dos

mesmos a fim de se conhecer melhor os dados a respeito da distribuição e do tempo de sobrevivência dos ovos de *D. renale* no ambiente (Perera et al., 2015).

Ovos de *D. renale*, tanto com a larva em desenvolvimento no seu interior quanto já embrionados, são sensíveis às condições ambientais com relação às altas temperaturas, ao congelamento e à dessecação (Pedrassani, 2009). Devido a essa sensibilidade dos ovos, uma possível forma de controle da dioctofimose seria pela inibição do desenvolvimento larval no interior do ovo que ocorre no ambiente aquático. Assim, seria possível evitar a infecção dos hospedeiros intermediário, paratênicos e definitivos, impossibilitando que o ciclo fosse concluído.

Importância da dioctofimose para os animais e para o homem

D. renale é um parasito de distribuição mundial (Sousa et al., 2011), sendo que, desde a sua descoberta, muitos trabalhos tem sido publicados a respeito da doença. Entre esses trabalhos, a maioria é de casos clínicos e cirúrgicos referente a animais, principalmente cães, havendo muitos relatos no Brasil (Nakagawa et al., 2007; Stainki et al., 2011; Oliveira et al., 2015).

No Rio Grande do Sul, muitos casos da parasitose tem sido diagnosticados desde 1999. Em Porto Alegre, Brun et al. (2002) descreveram um caso cirúrgico de um cão com dioctofimose. O paciente foi encaminhado para a realização de nefrectomia do rim direito, onde foram encontrados dois parasitos de 58 cm e 84 cm, além de exsudato sanguinolento. Em Uruguaiana, Monteiro et al. (2002) relataram um caso de infecção por *D. renale* em um cão que foi encaminhado para eutanásia. Na necropsia, foram encontrados 28 exemplares do parasito na cavidade abdominal e 6 exemplares no rim direito, totalizando uma infecção por 34 nematódeos.

Ribeiro et al. (2009) relataram o primeiro caso de dioctofimose em *Cerdocyon thous*, popular cachorro-do-mato, na cidade de Seropédica, no Rio de Janeiro. O animal foi capturado pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro, porém estava muito debilitado e foi a óbito por causa desconhecida. Na necropsia, um nematódeo foi encontrado na cavidade abdominal, não havendo mais nenhum achado parasitológico no animal.

Rocco et al. (2001) relataram sete casos de dioctofimose em cães de rua em Angra dos Reis, no Rio de Janeiro, no período de 1995 e 1996. Dos animais encaminhados para necropsia, seis eram machos e um era fêmea, e todos

apresentaram parasitismo único no rim direito, exceto pela fêmea que apresentou parasitismo múltiplo no rim direito e na cavidade abdominal.

Eicke et al. (2014) relataram um caso de dioctofimose no rim direito em uma fêmea canina em Dourados, no Mato Grosso do Sul. Entre os sinais clínicos apresentados pela paciente, destacaram-se hematúria, prostração, dor na região lombar e febre. Após o diagnóstico, a paciente foi encaminhada para a realização de nefrectomia, onde encontrou-se um único exemplar de *D. renale*.

Em gatos domésticos, os relatos são escassos, havendo raros relatos da doença nesses animais. Um deles foi descrito por Pedrassani et al. (2014) a respeito de um caso de dioctofimose em felino na cidade de Canoinhas, em Santa Catarina. No relato, identificou-se o parasito no rim supranumerário e na cavidade abdominal, havendo hipertrofia do rim esquerdo.

Além da importância clínica que representa o helminto *D. renale* na medicina veterinária, esse parasito é de grande relevância devido ao seu potencial zoonótico (Alves et al., 2007), sendo que muitos fatores envolvidos com a parasitose apresentam risco à saúde do homem. Entre eles, podem ser citados a prevalência de cães infectados, os altos níveis de contaminação superficial, o uso dos rios para transporte, a recreação com a pesca esportiva ou para alimentação da população quando os hospedeiros paratênicos se apresentam crus ou mal cozidos, entre outros (Urquhart et al., 1998; Silva et al., 2015). Neste contexto, além de relatos de dioctofimose em animais, casos da doença em humanos também tem sido citados em diversos países, conforme demonstrado por vários autores (Li et al., 2010; Katafigiotis et al., 2013; Venkatrajaiah et al., 2014).

Na grande maioria dos relatos, os sinais apresentados por humanos são inespecíficos estando relacionados, principalmente, a dores na região lombar e hematúria. Na maioria dos casos, o diagnóstico é feito por exames de imagem, porém a primeira suspeita costuma ser de cistos e não de parasitismo, retardando o diagnóstico correto da doença (Li et al., 2010; Katafigiotis et al., 2013). Katafigiotis et al. (2013) relataram um caso de dioctofimose em um homem de 39 anos na Grécia. O paciente apresentou sinal clínico de dor na região lombar direita, e foi diagnosticado com exames de ultrassom abdominal, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Após, o paciente foi encaminhado para a realização de nefrectomia do rim direito, onde havia exemplares de *D. renale* mortos.

Li et al. (2010) descreveram um caso de dioctofimose em uma mulher chinesa de 51 anos com ambos os rins parasitados. A paciente relatou que havia consumido peixe cru anteriormente, e apresentou como sinal clínico dor na região lombar direita por dois meses, hematúria e piúria. A paciente foi tratada para colecistite por uma semana, porém a dor lombar permanecia. Nos exames de ultrassom, tomografia computadorizada e angiografia, observaram-se alteração hiperecólica, uma massa de maior densidade, e defeitos na vascularização do rim direito, respectivamente. Após o diagnóstico de tumor no rim direito, a paciente recusou o tratamento cirúrgico. No ano seguinte, a paciente retornou apresentando grave hematúria, aumento da massa no rim direito e presença de um cisto no rim esquerdo. No ano seguinte, esta expeliu fragmentos de *D. renale* e ovos do parasito pela urina. A partir disso, foi indicado à paciente o tratamento com albendazol, que não foi realizado. Após 18 meses, a paciente foi a óbito devido à insuficiência renal.

Venkatrajaiah et al. (2014) descreveram um caso de parasitose por *D. renale* em um homem de 70 anos na Índia com histórico de diabetes e hipertensão. Os sinais clínicos do paciente foram febre alta por 10 dias e taquicardia. Após três dias do atendimento, o paciente expeliu dois exemplares de *D. renale* pela urina. A urinálise mostrou hematúria e ovos do parasito. Segundo os autores, ambos os rins foram parasitados, sendo o rim direito o mais afetado.

Diante dos relatos, percebe-se a necessidade de cuidados com a higiene e a alimentação da população, especialmente daquela que vive próximo à região ribeirinha quanto à possibilidade de contraírem a infecção por *D. renale*, que pode causar graves lesões renais e a outros órgãos. Seria interessante uma investigação por parte da vigilância sanitária, principalmente nos indivíduos que fazem uso da alimentação de peixes e anfíbios crus ou pouco cozidos, a fim de buscar informações sobre a epidemiologia da dioctofimose. Além disso, deve divulgar informações e prestar auxílio à população suscetível, buscando identificar e orientar os grupos de risco (Monteiro et al., 2002).

Importância do estudo da dioctofimose na cidade de Pelotas

A cidade de Pelotas está localizada na região sudeste do Rio Grande do Sul, com coordenadas geográficas de 31º 46' 19" de latitude Sul e de 52º 20' 33" de longitude Oeste, e possui mais de 300.000 habitantes (Coradi et al., 2009). As

características geográficas de Pelotas são importantes devido às condições favoráveis que a cidade apresenta ao nematóide *D. renale* (Pereira et al., 2006). O clima da cidade é subtropical com temperatura média anual de 17,8°C, sendo o mês de janeiro o mais quente com média de 23,2°C (Embrapa, 2000). Essas condições podem ser favoráveis à ocorrência da dioctofimose, uma vez que o embrionamento dos ovos ocorre na água com temperatura de 14 a 30°C. Para que se desenvolva a larva de primeiro estágio no interior dos ovos em até 30 dias, o ideal é que a temperatura seja de 25 a 30°C (Pedrassani et al., 2009).

O município está situado às margens do Canal São Gonçalo, que liga a Lagoa dos Patos e a Lagoa Mirim. Os arroios Pepino, Santa Bárbara e Pelotas desaguardam no Canal São Gonçalo e provem deles a maior parte da água destinada ao abastecimento humano da cidade (Coradi et al., 2009). Essas particularidades geográficas podem vir a ter relação com a ocorrência de dioctofimose, visto que o elevado potencial hídrico da cidade favorece o aparecimento dos hospedeiros intermediário e paratênicos de *D. renale* (Pereira et al., 2006).

Pelotas abrange um bairro de pescadores, a Colônia Z-3, estando este localizado às margens da Lagoa dos Patos, a 20 km do centro da cidade, e com uma população de 3.166 habitantes (Anjos et al., 2004; Delamare et al., 2015). Esse local apresenta o maior número de famílias que realizam a atividade pesqueira no litoral da Lagoa dos Patos. Em 2004, um estudo entrevistou 70 famílias da Colônia Z3, e identificou que 32,9% destas famílias exerciam atividade exclusivamente pesqueira e 67,1% exerciam outras atividade além da pesca (Anjos et al., 2004). Assim, o compartilhamento do ambiente onde é exercida a atividade pesqueira, e a alimentação de carne crua de peixes e/ou rãs, fazem com que aumente a probabilidade de adquirir a parasitose (Russo et al., 2014).

Agravando a situação, estima-se que haja cerca de 60.000 a 80.000 cães errantes ou semidomiciliados na cidade (Meirelles, 2014). O acesso de animais parasitados a ambientes aquáticos justifica a importância destes na transmissão de *D. renale* (Kano et al., 2003), uma vez que a ocorrência de dioctofimose nos animais está relacionada ao contato dos cães com zonas alagadiças (Russo et al., 2014). Essas condições podem influenciar na elevada casuística de animais com a doença em Pelotas, sendo que vários trabalhos tem sido divulgados nos últimos anos (Pesenti et al., 2008; Stainki et al., 2011; Milech et al., 2012; Caye et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Perera et al., 2015; Silva et al., 2015).

Os primeiros relatos de dioctofimose na cidade de Pelotas são recentes, sendo que a maioria deles são em cães, como é o caso de Stainki et al. (2011) que relataram um caso clínico-cirúrgico de filhote canino de seis meses. O cão apresentava obstrução uretral devido à presença de um exemplar de *D. renale* na uretra, sendo encaminhado para a realização de cirurgia a fim de remover o parasito. Milech et al. (2012) relataram um caso de achado cirúrgico de parasitos na cavidade abdominal e no rim direito em uma fêmea canina durante o procedimento de ovariosalpingohisterectomia eletiva.

Caye et al. (2015) relataram um caso de migração de *D. renale* em um cão, sendo localizado um exemplar de *D. renale* lateralmente ao pênis no tecido subcutâneo. Após, o paciente foi encaminhado para a realização do procedimento cirúrgico a fim de remover o parasito, mas este não foi encontrado na localização apresentada pelo exame de ultrassom. Sendo assim, se fez necessária a realização de laparotomia exploratória a fim de investigar a localização do parasito. Realizou-se a divulsão do músculo reto abdominal após a visualização de galerias na musculatura indicativas de migração do parasito por essa região.

Oliveira et al. (2015) realizaram um levantamento de casos de dioctofimose de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFPel no período de 2014 a 2015. Neste trabalho, foram diagnosticados 15 animais com dioctofimose, sendo que somente sete pacientes apresentaram sinais clínicos relacionados ao sistema urogenital. Todos os pacientes foram encaminhados para a realização de procedimento cirúrgico a fim de remover os parasitos, incluindo a nefrectomia quando necessária.

Silva et al. (2015) realizaram um levantamento de casos de dioctofimose em cães e gatos diagnosticados somente por meio de exame ultrassonográfico em uma clínica veterinária particular de diagnóstico por imagem em Pelotas. No período de agosto de 2010 a julho de 2015, 5.531 exames de ultrassom foram realizados, sendo 50 cães e dois gatos positivos para dioctofimose, correspondendo 0,94% de exames positivos no total.

No estudo realizado por Perera et al. (2015), realizou-se a coleta de 40 amostras de urina de cães e uma de gato a fim de detectar ovos de *D. renale*. As amostras foram coletadas de animais provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFPel, Ambulatório Veterinário Ceval e Canil Municipal de Pelotas, no

período de abril a junho de 2015. Após realizadas as análises laboratoriais, observou-se que 15,9% das amostras foram positivas, inclusive a amostra de urina do felino.

Como é possível observar, a espécie canina é a mais afetada por *D. renale*, sendo os felinos diagnosticados com menor frequência em Pelotas. Mesmo assim, um caso cirúrgico de um gato foi relatado por Milech et al. (2014) nesta cidade, sendo este o primeiro caso de dioctofimose em um felino no Rio Grande do Sul. Depois de realizados a urinálise e o exame de ultrassom abdominal, foram observados ovos do helminto no sedimento urinário e presença de *D. renale* no interior do rim direito. Após procedimento cirúrgico, a nefrectomia do rim parasitado foi realizada, sendo encontrados no seu interior um nematódeo fêmea e outro macho. Além disso, outro parasito macho foi encontrado na região peri-renal do rim esquerdo e removido em seguida.

Além de cães e gatos, o nematódeo também foi descrito parasitando espécies silvestres no município, correspondendo também ao primeiro relato da helmintose em *Galictis cuja* (furão) no Rio Grande do Sul. Os furões parasitados foram encontrados atropelados nas rodovias da cidade de Pelotas nos anos de 2005, 2007 e 2011, totalizando três animais. No primeiro, havia três espécimes de *D. renale* no rim direito; no segundo, havia apenas um exemplar do nematódeo no rim direito; e no terceiro, havia nove parasitos no rim direito e um na cavidade abdominal (Pesenti et al., 2008).

O município de Pelotas apresenta importantes agravantes para a ocorrência de dioctofimose, pois possui um grande número de cães que tem acesso à rua, um elevado potencial hídrico, além de exercer a atividade pesqueira. A alta ocorrência de cães errantes e seus hábitos alimentares pouco seletivos predispõem o parasitismo por *D. renale* (Urquhart et al., 1998; Kommers et al., 1999). Além disso, as boas condições ambientais de Pelotas favorecem o desenvolvimento das formas pré-parasitárias de *D. renale*, auxiliando na transmissão do parasito. O consumo de peixes crus e mal cozidos é perigoso, pois as larvas de *D. renale* também podem estar presentes na musculatura desses animais (Pedrassani, 2009), representando uma ameaça à população local que está exposta aos mesmos fatores de risco que os animais (Kano et al., 2003).

Plantas medicinais e família Lamiaceae

Plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que possuem substâncias com ação terapêutica (Messias et al., 2015). O uso de plantas para fins medicinais é uma prática antiga e baseada no conhecimento popular transmitido oralmente entre a população (Caroccia et al., 2013). Nos tempos atuais, as plantas são utilizadas por grande parte da população mundial, como um recurso medicinal alternativo para o tratamento de inúmeras enfermidades (Carneiro et al., 2014) por apresentar diversas vantagens, como: baixo custo, fácil acesso e com reduzidos efeitos adversos (Caroccia et al., 2013).

O Brasil possui a maior diversidade genética de plantas do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000. Ademais, conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações (Simões; Schenkel, 2002; Carneiro et al., 2014). Estima-se que pelo menos a metade das espécies nativas possua alguma propriedade medicinal, entretanto nem 1% dessa diversidade foi estudada adequadamente (Messias et al., 2015).

O uso de plantas consideradas medicinais pela população é bastante difundido no Brasil e suas potencialidades são reconhecidas mundialmente (Simões; Schenkel, 2002). Grande parte da população brasileira encontra nas plantas medicinais a única fonte de recursos terapêuticos. De acordo com Di Stasi & Hiruma-Lima (2002), isto se justifica tanto pela riqueza da biodiversidade e pela tradição popular desta prática, como também pelo baixo poder aquisitivo da população.

A composição química das plantas ou dos produtos de origem vegetal dependem de fatores climáticos, sazonais, geográficos, período de colheita do vegetal e também da técnica de obtenção do produto derivado (Corrêa, 2008). Nos óleos essenciais, há muitos princípios ativos conhecidos, e estes podem estar presentes em certos órgãos das plantas, como nas flores, folhas, cascas, tronco, galhos, raízes, frutos ou sementes (Silva, 2011). Esses princípios ativos, como os terpenóides, carvacrol e timol, por exemplo, contribuem tanto para os sabores e aromas das plantas quanto para sua atividade medicinal (Marques et al., 2015; Messias et al., 2015).

O uso de extratos vegetais tem apresentado eficácia no tratamento de diversas enfermidades veterinárias, entre elas as causadas por nematóides gastrintestinais. Entre as plantas com atividade antiparasitária estudadas, encontram-se as da família

Lamiaceae, a qual é conhecida como a terceira maior família de plantas com ação antihelmíntica (Furtado, 2006). Por isso, torna-se cada vez mais importante o crescimento da pesquisa relacionada às plantas desta família a fim de comprovar a sua ação frente a diversos parasitos, incluindo o helminto *D. renale*.

Segundo Almeida & Albuquerque (2002), a Lamiaceae é uma das principais famílias botânicas por apresentar muitas plantas medicinais e condimentares, representando grande importância econômica devido à produção de óleos essenciais por grande parte de suas espécies. Estima-se que há 300 gêneros e 7.500 espécies contidas nesta família (Zambon; Agostini, 2015).

Em um estudo de identificação de uso popular de plantas medicinais realizado por Messias et al. (2015) na cidade de Ouro Preto, em Minas Gerais, a família Lamiaceae foi uma das mais citadas, estando em segundo lugar em números de espécies vegetais nesse estudo. Zambon & Agostini (2015) também realizaram um estudo de identificação e catalogação de plantas utilizadas pelas comunidades rurais de Piracicaba, em São Paulo, e observaram que as plantas da família Lamiaceae estiveram entre as mais citadas pela população.

Estudos tem demonstrado que plantas da família Lamiaceae tem grande potencial terapêutico pelo fato de seus extratos apresentarem atividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária (Vági et al., 2005; Freire, 2008; Cleff et al., 2010; Okoh et al., 2010; Freire et al., 2011; Cleff et al., 2012; Dias de Castro et al., 2013; Abdel-Massih; Abraham, 2014; Bomfim et al., 2015; Marques et al., 2015). Assim, para a realização desse trabalho, três plantas da família Lamiaceae foram selecionadas devido aos bons resultados que vem apresentando em pesquisas nos últimos anos, sendo elas: *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum majorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim).

Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis

Origanum vulgare, popularmente conhecido como orégano, é uma planta de origem mediterrânea, aromática, com preferência pelo clima quente, e de boa adaptação em solos secos, rochosos, calcários e com pouca humidade (Martino et al., 2009; Jorge et al., 2014). Essa planta é um dos condimentos mais utilizados na culinária brasileira no preparo de carnes, ovos, peixes, panificações e frutos do mar. Além disso, o óleo essencial de orégano também é utilizado na indústria de alimentos,

visando controlar microrganismos causadores de deterioração e também de doenças veiculadas por alimentos (Corrêa, 2008). Na medicina popular, é usado para tratar distúrbios respiratórios, dor menstrual, artrite, distúrbios no trato urinário, entre outros (Jorge et al., 2014).

Devido a sua ação antimicrobiana, estudos tem sido realizados a fim de caracterizar a composição química dos diferentes extratos de orégano (Pizzale et al., 2002; Silva et al., 2010). O aroma característico do orégano é próprio de plantas com nível relativamente alto de carvacrol e timol, sendo o óleo essencial de orégano rico nesses fenóis (Fonseca, 2011). Por outro lado, o extrato hidroalcoólico de orégano é composto por outros compostos, como os ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido rosmarínico) e os flavonóides (rutina, luteolina, quercetol, apigenina e kaempferol). Entre esses compostos, os majoritários foram o ácido ferúlico, rutina e ácido rosmarínico (Danila et al., 2011).

Dias de Castro et al. (2013) avaliaram a ação de diferentes formas de extrato das folhas secas de *Origanum vulgare* em ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos a fim de inibir a eclodibilidade dos mesmos. Os extratos testados foram tintura, extrato hidroalcoólico e extrato aquoso nas concentrações de 0,62 mg/mL a 80 mg/mL. Nos resultados obtidos, observou-se que todos os extratos inibiram a eclodibilidade dos ovos com percentual de inibição variando de 8,8 a 100%, sendo a tintura e o extrato hidroalcoólico as formas mais eficazes.

Xóchihua et al. (2013) verificaram a eficácia da suspensão aquosa (260 mg/kg) de orégano em ovinos parasitados por *Haemonchus contortus*. A suspensão aquosa de orégano apresentou efeito quanto à eliminação da carga parasitária dos animais (64,9%), porém essa redução foi menor do que àquela apresentada pelo controle com o antihelmíntico cloridrato de levamisol (90,2%). Mesmo assim, o orégano se mostrou uma boa alternativa no controle de nematódeos de forma natural no sistema de produção animal.

O. vulgare tem sido extensivamente avaliado pelo grupo de pesquisa, e vem demonstrando efetividade tanto na forma de extratos aquoso e hidroalcoólico como de tintura e óleo essencial, agindo como promissor agente antifúngico (Cleff et al., 2008b; Matos, 2014), antiviral (Blank, 2013) e antimicrobiano (Guterres, 2015). Além disso, trabalhos *in vitro* e *in vivo* tem sido desenvolvidos a fim de averiguar a segurança da aplicação do *O. vulgare* como produto terapêutico (Cleff et al, 2008a; Hollenbach et al., 2015).

Origanum majorana, popularmente conhecida como manjerona, é uma planta de folhas verde-claras, aroma agridoce e flores brancas ou púrpuras que se inserem em fascículos. Essa planta tem origem no Egito e no leste do Mediterrâneo, sendo cultivada em solo arejado, seco, alcalino e rico em nutrientes, com preferência para o clima tropical, quente e úmido. Apresenta sabor fresco, sendo utilizada como condimento na culinária (Kufner, 2010; Abdel-Massih; Abraham, 2014). Com relação às características visuais, o óleo essencial de manjerona apresenta cor amarela, com odor picante, canforáceo e amadeirado. Por outro lado, o extrato de manjerona em pó é de cor escura cristalina, com cheiro característico e altamente hidrófilo (Kufner, 2010).

Popularmente, o óleo essencial de *O. majorana* é utilizado a fim de combater tosse, problemas vesicais, cólicas gastrintestinais, entre outros (Kufner, 2010). No meio científico, o óleo essencial vem sendo estudado demonstrando ação contra bactérias, fungos e ação antioxidante devido à composição dos extratos (Vági et al., 2005; Freire, 2008; Freire et al., 2011; Abdel-Massih; Abraham, 2014; Marques et al., 2015). No caso do óleo essencial, tem sido descrita a presença de compostos químicos, como sabineno, α -terpineno, p-cimeno, limoneno, γ -terpineno, hidrato de cis-sabineno, hidrato de trans-sabineno, 4-terpineol, α -terpineol e trans-cariofileno, sendo 4-terpineol e γ -terpineno os compostos majoritários (Freire, 2008).

Azambuja (2015) analisou a atividade antihelmíntica *in vitro* dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* em ovos de *Ancylostoma* spp. provenientes de fezes de cães. Neste trabalho, foram testadas seis concentrações em diluição seriada (0,07% a 2,5%), sendo as mesmas para cada óleo essencial. Como resultados, foi possível observar que os óleos essenciais das três plantas apresentaram ação inibitória de eclodibilidade nos ovos de *Ancylostoma* spp. de 90 a 100% na maioria das concentrações testadas, demonstrando ser promissores no controle da ancilostomíase.

A atividade antimicrobiana dos extratos tem sido relacionada à composição química. Vági et al. (2005) verificaram que o óleo essencial de manjerona promoveu notável inibição no crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus cereus*, e atribuíram essa atividade à presença do seu componente majoritário, o 4-terpineol. Da mesma forma, Freire (2008) avaliou a ação do óleo essencial de manjerona sob as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, sendo que o óleo essencial testado apresentou efeito inibitório de ambas as bactérias.

Rosmarinus officinalis é popularmente conhecido como alecrim e possui óleo aromático nas suas folhas. Essa planta é amplamente encontrada na região do Mediterrâneo, sendo muito conhecida desde a antiguidade e usada para várias aplicações, entre elas: ação antiespasmódica, analgésica, antirreumática, diurética e antiepilética. A planta também é utilizada no processamento e preservação na indústria alimentícia por ter afeitos antioxidantes e antimicrobianos naturais (Abdel-Massih; Abraham, 2014). Pode apresentar algumas contraindicações, como: alterações no sono, irritações gastrintestinais e nefrite quando utilizada em doses elevadas. Em gestantes, pode causar aborto por estimular as contrações uterinas (Fonseca, 2011).

O alecrim tem sido estudado em relação a sua composição química e suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. O maior alvo de estudo é o seu óleo essencial que é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona, acetato de isobornila, terpenóides (carnosol, ácido carnosílico, ácido oleânico e ácido ursólico), flavonóides (diosmetina, diosmina, gencuanina, luteolina, hispidulina e apigenina), além de ácido rosmarínico, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido neoclorogênico e ácido labiático (Silva et al., 2008).

Uma outra espécie de alecrim, o alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham) tem sido muito estudada com relação a sua ação contra nematódeos gastrintestinais de ovinos e caprinos (Vasconcelos, 2006; Souza et al., 2011). Souza et al. (2011), avaliaram a ação *in vitro* do extrato hidroalcoólico seco de *L. sidoides* em larvas infectantes de nematódeos da família Trichostrongylidae de caprinos. Após o teste, foi observado que o extrato na concentração de 500 mg/mL apresentou ação larvívica de 95,89% de eficácia nas larvas infectantes dos nematódeos. Vasconcelos (2006) analisou a ação *in vitro* do óleo essencial de *L. sidoides* em nematoides gastrintestinais de ovinos, sendo que a concentração de 0,062 mg/mL inibiu 94,84% da eclosão dos ovos, e as concentrações acima desta inibiram 100% da eclosão.

Além da atividade em nematódeos (Azambuja, 2015), os extratos de *R. officinalis* tem sido avaliados em relação a atividade em ectoparasitos. Velazquez et al. (2011) averiguaram o efeito carrapaticida dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis*, *Allium sativum* e *Lippia graveolens* sob larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. As concentrações testadas de cada óleo foram obtidas por diluição seriada de 1,25 a 20%, sendo que o alecrim apresentou 85% e 100% de mortalidade das larvas do carrapato nas concentrações de 10% e 20%, respectivamente. Batista et al.

(2013) avaliaram a atividade *in vitro* do extrato etanólico de *R. officinalis* frente à *Ctenocephalides felis felis* (pulga), e a fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus*. Nos resultados apresentados, observou-se que o alecrim apresentou alta ação frente às pulgas (95%) e baixa ação frente aos carrapatos (45,33% para *R. sanguineus* e 28,5% para *R. microplus*).

Potencial tóxico dos extratos vegetais

O uso de produtos derivados de plantas apresentam muitas vantagens em relação ao uso de produtos sintéticos pelo fato de serem obtidos de recursos renováveis com degradação rápida, evitando que resíduos permaneçam acumulados no meio ambiente (Batista et al., 2013). As plantas são compostas por substâncias que podem fazer parte da produção de medicamentos, mas deve-se considerar que toda substância química deve ser vista como potencial agente tóxico. Por isso, existe a necessidade de se conhecer o potencial tóxico de determinada planta e estabelecer as condições de utilização segura da mesma, a fim de não afetar a saúde humana e animal (Veiga Junior; Pinto, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pela avaliação dos critérios de qualidade, eficácia e segurança dos fitoterápicos, aplicando exigências semelhantes aos medicamentos convencionais (Carvalho et al, 2008). A fim de avaliar a toxicidade, são recomendados testes *in vitro* e *in vivo*. Em relação aos testes *in vitro*, o mais utilizado é o da citotoxicidade (Sivropoulou et al., 1996; Rogero et al., 2003; Meneses et al., 2009; Gavanji et al., 2014), enquanto que os testes *in vivo* são realizados geralmente em animais de laboratório, como ratos Wistar (Cleff et al., 2008a; Hollenbach et al, 2015) e coelhos (Santin, 2013). A fim de buscar novas opções ao uso precoce de animais, novas técnicas de avaliação tem sido desenvolvidas, como a toxicidade em ovos embrionados (Yamawaki et al., 2013; Lobo, 2015).

Os produtos naturais devem ser utilizados uma vez que apresentam eficácia e segurança. Por isso, devem ser analisados fatores relacionados à toxicidade ao animal, ao ser humano e ao meio ambiente (Batista et al., 2013). O grau de toxicidade de um extrato vegetal é influenciado por diversos fatores, como a dose aplicada e a frequência de uso. Em alguns casos, até mesmo doses baixas podem vir a causar intoxicação devido a uma sensibilidade individual, resultando em alergia ou em

consequências mais graves, principalmente quando administrados por via oral (Hollenbach, 2013). Tendo em vista esses fatores, testes de toxicidade de extratos vegetais tem sido realizados a fim de avaliar a segurança da sua utilização (Cleff et al., 2008a; Santin, 2013; Hollenbach et al., 2015).

Hollenbach et al. (2015) avaliaram o potencial tóxico do óleo essencial de *O. vulgare* em relação à fertilidade masculina por meio de aspectos reprodutivos de ratos Wistar tratados cronicamente com o extrato vegetal. As concentrações do óleo essencial testado foram de 3%, 9% e 27%, sendo os compostos majoritários caracterizados pelo timol e pelo 4-terpineol. Os autores concluíram que a taxa de infertilidade foi dose-dependente da concentração, sendo a dose mais elevada a de maior nível de infertilidade. Além disso, a infertilidade ocorreu pela redução na produção de esperma, menor número de espermatozóides armazenados e presença de espermatozóides anormais.

Santin (2013) avaliou a irritação cutânea e ocular aguda provocada pelos óleos essenciais de *O. majorana* e *R. officinalis* em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*). As concentrações testadas foram de 6% para *O. majorana* e 24% para *R. officinalis*, sendo estas o dobro das concentrações que apresentaram atividade antifúngica *in vitro* previamente. Ao término do estudo, foi possível concluir que o óleo essencial de manjerona causou irritação cutânea e ocular aguda e leve, enquanto que o óleo essencial de alecrim causou as mesmas lesões porém de forma moderada.

De acordo com os estudos citados a respeito da eficácia das plantas da família Lamiaceae, observa-se que diferentes extratos vem demonstrando importante potencial terapêutico frente a diversos microrganismos (Vági et al., 2005; Cleff et al., 2008b; Azambuja, 2015; Guterres, 2015), porém com algum grau de toxicidade (Cleff et al., 2008a; Santin, 2013; Hollenbach et al., 2015). Portanto, diante dos resultados obtidos acerca da toxicidade, observa-se a necessidade aprofundar as pesquisas a fim de determinar doses efetivas dos extratos dessas plantas, porém com reduzido potencial tóxico ao organismo.

4 Artigo 1

Primeiro isolamento de ovos de *Dioctophyma renale* do ambiente e presença na urina de cães e gatos da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Soliane Carra Perera, Gabriela de Almeida Capella, Natália Berne Pinto,
Josaine Cristina da Silva Rappeti, Rosária Helena Machado Azambuja,
Claudia Giordani, Gertrud Müller, Marlete Brum Cleff

Formatado conforme as normas da revista Journal of Helminthology para a qual foi submetido (Anexo A)

Nota: Primeiro isolamento de ovos de *Diectophyma renale* eggs do ambiente e presença na urina de cães e gatos da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Soliane Carra Perera, Gabriela de Almeida Capella, Natália Berne Pinto,
Josaine Cristina da Silva Rappeti, Rosária Helena Machado Azambuja,
Claudia Giordani, Gertrud Müller, Marlete Brum Cleff

E-mail do autor correspondente: soliane.cp@hotmail.com

Resumo

Diectophyma renale tem distribuição cosmopolita, com descrição da parasitose em diferentes espécies de animais e no homem, entretanto sua incidência em algumas partes do mundo não é conhecida, sendo vital a obtenção destes dados, já que se trata de zoonose de importância em saúde pública. Assim, o objetivo foi avaliar a ocorrência de dioctofimose em cães e gatos da cidade de Pelotas, assim como avaliar a presença de ovos de *D. renale* no ambiente. Para análise da contaminação ambiental, foram coletadas 250 g de solo de quatro pontos da comunidade Ceval. No laboratório, foram divididas e processadas por uma técnica de centrifugo-flutuação, totalizando 100 amostras. As amostras de urina foram coletadas por micção natural e processadas pela técnica de centrifugo-sedimentação, que possibilitou a identificação de ovos de *D. renale*. Todas as amostras foram analisadas em microscópio óptico para a identificação de ovos de *D. Renale*. Das 100 amostras de solo analisadas, observou-se que em 4,11% destas havia presença de ovos de *D. Renale*. Das 43 amostras de urina analisadas, apenas uma era proveniente de felino e o restante de caninos (n=42), sendo sete amostras de urina de cães (16,66%) e a amostra do felino (100%) foram positivas para *D. renale*. Conclui-se que ovos de *D. renale* estão presentes no ambiente da cidade de Pelotas, assim como os caninos e felinos apresentam-se parasitados. Estes achados são um alerta para a saúde do município, uma vez que a parasitose é uma zoonose e a maioria dos animais são assintomáticos.

Introdução

Diectophyma renale pertence à classe Nematoda e à superfamília Dioctophymatoidea (Urquhart *et al.*, 1998), sendo descrito pela primeira vez por Goeze, em 1782, quando exemplares do parasito foram encontrados no rim de um cão (Pedrassani, 2009). Apesar de *D. renale* ter distribuição cosmopolita, sua incidência em algumas partes do mundo não é conhecida, sendo vital a obtenção destes dados, já que se trata de zoonose de importância em saúde pública. Existem muitos relatos de diversas espécies de animais infectadas com *D. renale*, destacando-se a ocorrência em macaco (Ishizaki *et al.*, 2010), lobo-guará (Cansi *et al.*, 2012), furão (Pesenti *et al.*, 2012), felino (Pedrassani *et al.*, 2014), cachorro-do-mato (Ribeiro *et al.*, 2009) e cães domésticos (Stainki *et al.*, 2011; Milech *et al.*, 2012; Caye *et al.*, 2015), destacando-se os relatos também em humanos (Li *et al.*, 2010; Katafigiotis *et al.*, 2013; Venkatrajaiah *et al.*, 2014).

A ocorrência de dioctofimose em determinadas regiões pode ser devido ao elevado potencial hídrico das mesmas, favorecendo o aparecimento dos hospedeiros paratênicos e intermediário do nematóide (Pereira *et al.*, 2006), como é o caso de Pelotas. Além disso, a cidade apresenta outros importantes agravantes para a ocorrência de dioctofimose, como o grande número de cães com acesso à rua e a presença de roedores, assim como existem muitas famílias que exercem fortemente a atividade pesqueira no litoral da Lagoa dos Patos (Anjos *et al.*, 2004).

Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a ocorrência de dioctofimose em cães e gatos da cidade de Pelotas, assim como avaliar a presença de ovos do parasito em amostras de solo.

Materiais e Métodos

O trabalho foi dividido em duas etapas: análise da contaminação ambiental por ovos de *D. renale* em uma comunidade em vulnerabilidade social, e estudo epidemiológico de dioctofimose em

cães e gatos residentes da cidade de Pelotas. As coletas das amostras de urina dos animais foram realizadas no Ambulatório Ceval, no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFPel e no Canil Municipal. Os animais alojados no Canil Municipal eram provenientes de diversos bairros da cidade, e ficavam alojados por pequeno período em sistema de rodízio até sua liberação do local, possibilitando a introdução de outros cães. Os animais atendidos no Ambulatório Ceval eram provenientes de comunidade em vulnerabilidade localizada próxima ao centro da cidade.

A etapa de análise da contaminação ambiental foi realizada na região do Ambulatório Veterinário Ceval, no centro da cidade de Pelotas, município localizado na região sul do Rio Grande do Sul (31° 46' 19" S, 52° 20' 33" W). As amostras de solo foram coletadas e posteriormente processadas no Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), durante os meses de julho a agosto de 2015. O local foi definido em virtude de serem diagnosticados muitos animais positivos para essa parasitose nessa comunidade que é atendida por um projeto de extensão da Faculdade de Veterinária da UFPel.

Para análise parasitológica, foram coletadas 250 g de solo de quatro ângulos e do centro, sendo determinados quatro pontos da comunidade, totalizando 20 amostras. Estas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados, armazenadas sob refrigeração e encaminhadas ao laboratório para análise, onde cada amostra foi subdividida em cinco frações com 6 g cada, de acordo com o ponto de coleta, totalizando 100 amostras para análise. O material foi processado pela técnica de centrifugo-flutuação em dicromato de sódio (Caldwell & Caldwell adaptada por Gallina *et al.*, 2011). Todas as amostras foram analisadas ao microscópio óptico com aumento de 40X para a identificação dos ovos de *D. renale*.

Para a realização do estudo epidemiológico, foram coletadas amostras de urina de animais atendidos no HCV da UFPel, no Ambulatório Ceval e do Canil Municipal da cidade de Pelotas no período de abril a junho de 2015. As amostras de urina foram armazenadas em frascos estéreis e mantidas refrigeradas até a análise no laboratório de Parasitologia do DEMP.

Os animais provenientes do Ambulatório Ceval e do HCV foram incluídos no estudo mediante autorização dos proprietários e as coletas nos animais do Canil Municipal foram autorizadas pelo Médico Veterinário responsável pelo mesmo. Para obtenção de dados sobre a condição de saúde e manejo dos animais incluídos no estudo, foi utilizado um questionário, sendo que este foi preenchido no momento da coleta das amostras dos pacientes em que os tutores aceitaram que os animais participassem do estudo. As informações obtidas com o questionário foram endereço residencial, sexo, idade e raça dos animais.

As amostras de urina foram processadas pela técnica de centrífugo-sedimentação (Lopes *et al.*, 2007), para identificação dos ovos de *D. renale* presentes nas amostras de urina coletadas dos pacientes. Os resultados foram analisados através do Teste do qui-quadrado e distribuição de frequência utilizando o *software* Statistix 9.0.

Resultados e discussão

Em relação à coleta de solo na região do Ambulatório Veterinário Ceval foram analisadas 100 amostras de solo, sendo que três revelaram contaminação por ovos de *D. renale*, representando um percentual de 3% de amostras positivas. Vale ressaltar que foi avaliado este local devido à grande casuística da dioctofimose canina que vem sendo diagnosticada na região (Stainki *et al.*, 2011; Milech *et al.*, 2012; Gamboa & Rappeti, 2013; Perera *et al.*, 2015). Estudos têm demonstrado a contaminação dos solos de praças e creches por ovos de nematódeos gastrintestinais em diversas cidades do Brasil (Oliveira *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2008), entretanto não existem trabalhos demonstrando a presença de *D. renale* nestes ambientes, sendo este o primeiro relato de identificação de ovos do nematódeo isolado de solo no Brasil.

O local escolhido para o estudo apresenta condições favoráveis para a presença do nematódeo, o que poderia favorecer a disseminação dessa parasitose, pois a comunidade está localizada a beira do Canal São Gonçalo e apresenta áreas alagadiças. Essa particularidade geográfica pode ter relação com a ocorrência de dioctofimose, pois o elevado potencial hídrico da cidade favorece o aparecimento dos hospedeiros intermediário e paratênicos de *D. renale* (Pereira *et al.*, 2006).

Para avaliação da ocorrência de diotofimose nos animais de companhia, foram analisadas 43 amostras de urina, sendo 42 provenientes de caninos e uma de felino. Das 42 amostras de urina provenientes de caninos, sete foram positivas para *D. renale*, assim como a amostra de urina proveniente do felino, totalizando 18,6% de amostras positivas. No entanto, não foi possível visualizar diferença estatística ($P=0,03$) cruzando os dados: sexo, espécie, raça, idade e tutor com o resultado da urina. (Tab. 1).

Tab. 1. Distribuição dos animais parasitados por *D. renale* na cidade de Pelotas em relação às variáveis sexo, espécie, raça, idade e tutor.

Variáveis		Positivos	Negativos
Sexo	Macho	7	25
	Fêmea	1	10
Espécie	Canino	7	35
	Felino	1	0
Raça	SRD	8	31
	Pitbull	0	4
Idade	< 1 ano	0	3
	1 - 8 anos	8	30
	> 8 anos	0	2
Proprietário	Com	4	20
	Sem	4	15

A frequência encontrada nesse estudo foi superior a estudos anteriores, que observaram em 475 cães 1,68% positivos para *D. renale* (Colpo *et al.*, 2007), enquanto outros autores ao avaliar 197 amostras de cães do Distrito São Cristóvão, em Três Barras – SC, observaram que 28 (14,2%) foram positivas para pesquisa de ovos do parasito na urina (Pedrassani, 2009). Em relação a variável sexo dos animais, o resultado encontrado está em desacordo a estudos anteriores, onde foi verificada maior frequência da parasitose em caninos do sexo feminino (Cottar *et al.*, 2011; Gamboa & Rappeti, 2013).

Para o diagnóstico de diotofimose, foi utilizado a observação microscópica dos ovos do parasito na urina. Segundo a literatura a identificação de ovos na urina é uma das principais formas de diagnóstico da parasitose (Pedrassani, 2009). Os ovos de *D. renale* observados estão de acordo com o descrito na literatura, sendo que apresentam formato elíptico, coloração castanho-amarelada, parede espessa e rugosa, tampões bipolares, medições de 73 a 83 µm de comprimento e 45 a 47 µm de largura (Colpo *et al.*, 2007; Pedrassani, 2009). Os ovos são eliminados na urina do hospedeiro definitivo após quatro a seis meses de realizada a infecção. No ambiente, ocorre desenvolvimento da larva de primeiro estágio (L1), sendo influenciado pelas condições ambientais, com variação de sete dias a sete meses. Estes ovos podem permanecer viáveis no ambiente de dois a cinco anos o que possibilita uma maior contaminação.

Além disso, é importante durante a anamnese investigar o tutor sobre os sinais clínicos, a evolução da doença, os medicamentos administrados, se o animal tem hábito de ir à rua sozinho, se revira lixo, se já foi um animal de rua, se tem hábito de nadar em açudes ou rios, e se tem ou teve contato direto com sapos ou rãs (Aiello & Mays, 2001; Tilley & Smith Jr., 2003). Também deve-se questionar sobre os hábitos alimentares do animal, se a sua dieta é controlada ou não, e se há possibilidade de ingestão de peixes crus, rãs, ou até de sobras de alimentos. Outra avaliação é com relação a presença de roedores e o contato com estes, assim como se vive em áreas próximas de rios, lagoas ou até mesmo em áreas ribeirinhas e alagadiças.

A presença de roedores pode ser um fator importante para uma maior frequência do parasito na região, pois existem áreas infestadas e sem nenhum controle, aliado ao fato dos cães habitarem locais alagadiços e se alimentarem de forma pouco seletiva, visto que existem alguns relatos que demonstram o parasitismo por *D. renale* em *Rattus norvegicus* (Coppo & Brem, 1983; Kommers *et al.*, 1999). Sendo assim, estes roedores poderiam atuar como hospedeiros paratênicos de *D. renale*, servindo como fonte de infecção para os cães e gatos.

Diante do exposto, conclui-se que há contaminação ambiental por ovos de *D. renale* na cidade de Pelotas, assim como caninos e felinos apresentam-se parasitados. Estes achados são um alerta para a saúde pública do município, já que a parasitose é uma zoonose e a maioria dos animais não apresentam nenhum sinal clínico e convivem intimamente com pessoas em locais sem nenhum controle sanitário.

Agradecimentos

Um agradecimento especial à Comunidade a qual o Ambulatório Ceval presta atendimento veterinário, e aos colaboradores do Canil Municipal de Pelotas, do HCV-UFPe e do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFPe pelo apoio, assistência e disponibilidade para realização deste trabalho.

Suporte financeiro

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaração de interesse

Nenhum.

Padrões éticos

Os autores afirmam que todos os procedimentos que contribuem para este trabalho estão em conformidade com os padrões éticos dos guias nacionais e institucionais relevantes sobre o cuidado e uso de animais. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (CEEa 4390/2015).

Referências

- Aiello, S.E. & Mays, A.** (2001) *Manual Merck de Veterinária*. 8rd edn. 1861pp. São Paulo, Roca.
- Anjos, F.S., Niederle, P.A. & Caldas, N.V.** (2004) Pluriatividade e pesca artesanal: o caso da Colônia Z-3 em Pelotas, RS. *Sociedade em debate, Pelotas* **10**, 9-42.
- Araújo N.S., Rodrigues, C.T. & Cury, M.C.** (2008) Helmintos em caixas de areia em creches da cidade de Uberlândia, Minas Gerais. *Revista Saúde Pública* **42**, 150-153.
- Cansi, E.R., Bonorino, R., Mustafa, V.S. & Guedes, K.M.R.** (2012) Multiple parasitismo in wild maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Mammalia: Canidae) em Central Brazil. *Comparative Clinical Pathology*, **21**, 489-493.
- Caye, P., Milech, V., Lima, C.S., Braga, F.V.A., Durante, F.H. & Rappeti, J.C.S.** (2015) Relato de caso sobre *Diectophyma renale* na musculatura abdominal. *XXIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas*.
- Colpo, C.B., Silva, A.S., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., Camargo, D.G. & Colpo, E.T.B.** (2007) Ocorrência de *Diectophyma renale* em cães no Município de Uruguaiana – RS. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia* **14**, 175-180.
- Coppo, J.A. & Brem, J.J.** (1983) Canine diectophymosis in the north east of Argentine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **25**, 259-262.
- Cottar, B.H., Dittrich, G., Ferreira, A.A., Carvalho, A.C.P., Albernaz, V.G.P., Luz, M.T. & Tasqueti, U.I.** (2012) Achados ultrassonográficos de cães parasitados por *Diectophyma renale* – estudo retrospectivo. *Veterinária e Zootecnia* **19**, 8-11.
- Gallina, T., Silva, M.A.M.P., Castro, L.L.D., Wendt, E.W., Villela, M.M. & Berne, M.E.A.** (2011) Presence of eggs of *Toxocara* spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **20**, 176-177.

- Gamboa, D.P. & Rapetti, J.C.S.P.** (2013) A dioctofimose em cães dos municípios de Pelotas e Capão do Leão/RS. Estudo fundamentado na detecção, controle e profilaxia da enfermidade na região. *XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas*.
- Ishizaki, M.N., Imbelonib, A.A., Muniz, J.A.P.C., Scalercio, S.R.R.A., Benigno, R.N.M., Pereira, W.L.A. & Lacrete Jr., A.C.C.** (2010) *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) in the abdominal cavity of a capuchin monkey (*Cebus apella*), Brazil. *Veterinary Parasitology* **173**, 340-342.
- Katafigiotis, I., Fragkiadis, E., Pournaras, C., Nonni, A. & Stravodimos, K.G.** (2013) A rare case of a 39 year old male with a parasite called *Dioctophyma renale* mimicking renal câncer at the computed tomography of the right kidney. *Parasitology International* **62**, 459-460.
- Kommers, G.D., Ilha, M.R.S. & Barros, C.S.L.** (1999) Dioctofimose em cães: 16 casos. *Ciência Rural* **29**, 517-522.
- Li, G., Liu, C., Li, F., Zhou, M., Liu, X. & Niu, Y.** (2010) Fatal bilateral dioctophymatosis. *Journal of Parasitology* **96**, 1152-1154.
- Lopes, S.T.A., Biondo, A.W. & Santos, A.P.** (2007) *Manual de patologia clínica veterinária*. 3rd adn. 107pp. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria.
- Milech, V., Perera, S.C., Ramos, S., Pedrozo, J.C.S.R. & Braga, F.V.A.** (2012) Achado acidental de dioctofimose durante procedimento cirúrgico em um canino – relato de caso. *21º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas*.
- Oliveira, C.B., Silva, A.S. & Monteiro, S.G.** (2007) Ocorrência de parasitas em solos de praças infantis nas creches municipais de Santa Maria - RS, Brasil. *Revista da FZVA* **14**, 174-179.
- Pedrassani, D.** (2009) *Aspectos morfológicos, imunológicos e epidemiológicos do Dioctophyma renale em cães no distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina*. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- Pedrassani, D., Wendt, H., Rennau, A., Pereira, S.T. & Wendt, S.B.T.** (2014) *Dioctophyma renale* Goeze, 1782 in a cat with a supernumerary kidney. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* **23**, 109-117.
- Pereira, B.J., Girardelli, G.L., Trivilin, L.O., Lima, V.R., Nunes, L.C. & Martins, I.V.F.** (2006) Ocorrência de dioctofimose em cães do município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, Brasil, no período de maio a dezembro de 2014. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **15**, 123-125.
- Perera, S.C., Capella, G.A., Pinto, N.B., Ananã, D.C., Rappeti, J. & Cleff, M.B.** (2015) Investigação de *Dioctophyma renale* em amostras de urina em cães e gatos na cidade de Pelotas. *XVII Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas*.
- Pesenti, T.C., Mascarenhas, C.S., Krügerl, C., Sinkoc, A.L., Albano, A.P.N., Coimbra, M.A.A. & Müller, G.** (2012) *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) collet-meygret, 1802 (Diotophymatidae) in *Galictis cuja* (Molina, 1782) (Mustalidae) in Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Helminthology* **6**, 301-305.
- Ribeiro, C.T., Verocai, G.G. & Tavares, L.E.** (2009) *Dioctophyme renale* (Nematoda, Dioctophymatidae) infection in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Brazil. *Journal of Wildlife Diseases* **45**, 248-250.
- Stainki, D.R., Pedrozo, J.C.S.R., Gaspar, L.F.J., Zanette, R.A., Silva, A.S. & Monteiro, S.G.** (2011) Urethral obstruction by *Dioctophyma renale* in puppy. *Comparative Clinical Pathology* **20**, 535-537.
- Tilley, L. & Smith Jr., F.** (2003) *Consulta veterinária em 5 minutos: espécies canina e felina*. 3rd adn. 1604pp. Barueri, Manole.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W.** (1998) *Parasitologia veterinária*. 2nd adn. 273pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.
- Venkatrajaiah, N., Kalbande, S.H., Rao, G.V.N., Reddy, V.C., Reddy, S.H., RAO, P.R., Babu, K. & Keerthi, A.** (2014) Dioctophymatosis renalis in humans: first case report from India. *Journal of the Association of Physicians of India* **62**, 70-73.

5 Artigo 2

Eliminação de *Dioctophyma renale* pela urina em canino com dioctofimose em rim esquerdo e cavidade abdominal – Primeiro relato no Rio Grande do Sul

Soliane Carra Perera, Josaine Cristina da Silva Rappeti, Vanessa Milech,
Fabrício Arigony Braga, Guilherme Albuquerque de Oliveira Cavalcanti,
Ceres Nakasu, Luana Durante, Patrícia Vives, Marlete Brum Cleff

Formatado conforme as normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia para a qual foi submetido (Anexo B)

Eliminação de *Diectophyma renale* pela urina em canino com dioctofimose em rim esquerdo e cavidade abdominal – Primeiro relato no Rio Grande do Sul

Elimination of *Diectophyma renale* to urine in canine with dioctophymosis in the left kidney and abdominal cavity - First report in Rio Grande do Sul

Soliane Carra Perera^{1*}, Josaine Cristina da Silva Rappeti¹, Vanessa Milech²,
Fabrício Arigony Braga¹, Guilherme Albuquerque Cavalcanti¹, Ceres Nakasu²,
Luana Durante², Patrícia Vives², Marlete Brum Cleff¹

¹Fauldade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS

¹Hospital de Clínicas Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS

*Autor correspondente: soliane.cp@hotmail.com

RESUMO

Diectophyma renale é um parasito que afeta tanto animais como humanos, e tem como órgão de eleição o rim direito. Relata-se o caso clínico-cirúrgico de paciente canino com histórico de eliminação de três exemplares de *D. renale* pela urina e presença de parasitos no rim esquerdo e na cavidade abdominal. No Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, foram realizados exames pré-cirúrgicos, entre eles a ultrassonografia abdominal que identificou a localização dos nematódeos, e o exame de Doppler pulsado dos vasos intrarenais que demonstrou aumento nos índices resistivos nas regiões avaliadas. O paciente foi conduzido para a realização de laparotomia exploratória, sendo removidos 23 parasitos da cavidade abdominal. A presença de *D. renale* causa graves lesões nos rins e nos demais órgãos da cavidade abdominal, sendo essencial o diagnóstico precoce e a remoção dos nematódeos para recuperação do paciente.

Palavras-chave: parasitos, ultrassom abdominal, Doppler pulsado, laparotomia exploratória.

ABSTRACT

Diectophyma renale is a parasite that attacks animals as well as humans and has the right kidney as preferred target organ. This document reports the case of a clinical-surgical canine patient with a history of elimination of three *D. renale* samples through its urine and presence of parasites at its left kidney and abdominal cavity. Pre-surgical exams were performed at the Veterinary Hospital of the Federal University of Pelotas. Among these exams, the Abdominal Ultrasonography identified the nematode's location and the Pulse-Doppler of the intrarenal vessels showed an increase in the resistive indices of the evaluated areas. An Exploratory Laparotomy was conducted with the patient who had 23 parasites removed from its abdominal cavity. The presence of *D. renale* causes severe lesions at kidneys and other organs of the abdominal cavity, for this reason early diagnosis and nematode's removal are essential for the patient's recovery.

Keywords: parasites, abdominal ultrasonography, Pulse-Doppler, exploratory laparotomy.

INTRODUÇÃO

O nematódeo *Diectophyma renale*, conhecido como o “verme gigante do rim”, acomete principalmente os cães de vida errante e também o homem (Alves *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2007). O rim direito é parasitado com maior frequência, ocorrendo a destruição do parênquima do órgão (Urquhart *et al.*, 1998). Porém, também pode ser localizado livre na cavidade abdominal e em outros órgãos (Nakagawa *et al.*, 2007).

Os hospedeiros definitivos eliminam os ovos de *Diectophyma renale* pela urina (Urquhart *et al.*, 1998), contaminando o ambiente. Após um período de incubação em meio aquático, os ovos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, o anelídeo oligoqueta, e se tornam infectantes (Alves *et al.*, 2007). A infecção ocorre pela ingestão de anelídeos aquáticos, assim como de carne crua ou pouco cozida de peixe e rã contendo a larva infectante (Urquhart *et al.*, 1998).

O diagnóstico da dioctofimose é realizado por meio de achados ocasionais de helmintos em necropsias e procedimentos cirúrgicos (Kommers *et al.*, 1999), exames de ultrassom (Cottar *et al.*, 2012), observação de ovos na urina e de exemplares do nematóide também na urina (Li *et al.*, 2010), sendo esta última pouco relatada na literatura.

Assim, o objetivo desse trabalho é relatar a ocorrência incomum de *Dioctophyma renale* no rim esquerdo e na cavidade abdominal de uma fêmea canina com eliminação de parasitos pela via urinária.

CASUÍSTICA

Um paciente da espécie canina, fêmea, sem raça definida (SRD), porte médio, com 12 kg de peso corporal, adulto, foi atendido no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (HCV-UFPel). Na anamnese, foi relatado que era um cão errante que havia sido adotado recentemente, sendo que a queixa principal foi de que o paciente havia eliminado três parasitos pela urina. No exame clínico geral, observaram-se apenas alterações de condição corporal, classificada como magra, e mucosa oral de coloração rósea pálida.

Foram realizados exames complementares do canino, como hemograma, bioquímica sérica e exame ultrassonográfico abdominal. No hemograma e bioquímica sérica, foram detectadas grave anemia, leucocitose e alterações das enzimas renais, conforme os seguintes resultados: hemácias $3,53 \times 10^6$, hemoglobina 7,1 g/dl, hematócrito 21,4%, leucócitos totais 22.500/ μ l, segmentados 19.125/ μ l, ureia 133,1 mg/dl, e creatinina 2,4 mg/dl, sendo os valores de referência considerados de acordo com LOPES et al. (2007). Após o diagnóstico de dioctofimose, o paciente foi internado para estabilização do quadro clínico com fluidoterapia de ringer lactato (10 ml.kg^{-1} , a cada hora, via IV), cloridrato de tramadol (2 mg.kg^{-1} , BID, via SC) e enrofloxacino (5 mg.kg^{-1} , BID, VO). Após dois dias de internação, o paciente foi encaminhado para a realização de procedimento cirúrgico. Imediatamente antes da cirurgia, realizaram-se exames de Doppler renal e ultrassom abdominal, sendo este último feito para verificar novamente a localização dos exemplares de *D. renale* nos rins.

Como protocolo anestésico, realizou-se medicação pré-anestésica com metadona ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, via IM), indução anestésica com propofol (3 mg.kg^{-1} , via IV), e manutenção com isoflurano ao efeito por via inalatória. No pós-operatório imediato, realizou-se analgesia com meloxicam ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, via SC) e cloridrato de tramadol (3 mg.kg^{-1} , via SC).

Após a indução anestésica e a antisepsia da área cirúrgica, realizou-se celiotomia exploratória com a remoção de 23 parasitos, entre eles 16 machos e 7 fêmeas, sendo que 16 estavam vivos (Fig. 1). A cavidade abdominal foi lavada com solução fisiológica aquecida e, posteriormente, procedeu-se com a celiorrafia.



Figura 1. Exemplares de *Dioctophyma renale* removidos cirurgicamente da cavidade abdominal do paciente canino. Fonte: arquivo fotográfico do PRODiC.

O paciente permaneceu internado por oito dias para administração da fluidoterapia de manutenção, antibioticoterapia e medicação de suporte, mantendo-se o protocolo de analgesia por três dias. Além disso, foi administrado também sulfato ferroso e eritropoetina (100 UI.kg^{-1} , a cada 48 horas, via SC), havendo uma elevação progressiva do hematócrito.

DISCUSSÃO

O cão parasitado havia sido recolhido das ruas da cidade, corroborando com Kommers *et al.* (1999) que relatam que a dioctofimose é uma enfermidade que acomete principalmente animais de vida errante devido a hábitos alimentares pouco seletivos. Ademais, até a eliminação dos parasitos pela urina, os tutores não haviam observado alterações ou sintomas clínicos no canino. Segundo Urquhart *et al.* (1998), os animais acometidos costumam ser assintomáticos, entretanto quando há sinais clínicos, estes geralmente estão relacionados à disúria, hematúria e dor lombar.

Uma das formas de diagnóstico da parasitose é a visualização de exemplares de *D. renale* na urina (Li *et al.*, 2010), entretanto isto é raramente encontrado na literatura, sendo este o primeiro relato na veterinária em nossa região. Stainki *et al.* (2011) relataram a ocorrência de *D. renale* em um cão de seis meses com obstrução uretral devido à presença do parasito. Por outro lado, em humanos, Li *et al.* (2010) relataram um caso de dioctofimose bilateral em uma mulher chinesa que expeliu fragmentos do parasito pela urina.

Apesar da intensa infestação parasitária, o paciente canino não apresentava indisposição física, apesar de anemia, leucocitose e elevação dos níveis de ureia e creatinina. Estes resultados

contradizem aqueles observados por Mesquita *et al.* (2014), que não observaram alterações de ureia e creatinina em nenhum dos oito animais com dioctofimose renal avaliados pré-cirurgicamente, fato que poderia ter ocorrido pelo rim contralateral ter compensado a disfunção do rim lesado. Entretanto, Cottar *et al.* (2012) citam algumas situações em que o rim contralateral não consegue compensar e manter a função renal, o que poderia justificar as alterações observadas nos exames apresentados do paciente aqui relatado.

No primeiro exame de ultrassom do canino, observou-se alteração no baço, com presença de pequenas áreas hipocogênicas de contorno irregular dispersas pelo parênquima. Ademais, apresentou a vesícula urinária com grande quantidade de sedimento, omento difusamente hiperecogênico, e imagem sugestiva de exemplares de *D. renale* livres na cavidade abdominal.

Além das alterações citadas, observou-se que os rins apresentavam formato anatômico alterado: no rim esquerdo, observou-se um aumento de volume e presença de *D. renale* de 0,4 cm de diâmetro (Fig. 2); enquanto que, no rim direito, observou-se diminuição de tamanho, calcificação na região proximal do ureter e sem distinção de cortical e medular. Esta última alteração também foi observada em um estudo ultrassonográfico realizado por Mesquita *et al.* (2014) em cães com dioctofimose. A presença de calcificação no ureter levanta a hipótese de que o rim direito do paciente pode ter sido parasitado, havendo eliminação do parasito pela via urinária, o que justificaria o relato do proprietário sobre a eliminação dos parasitos.

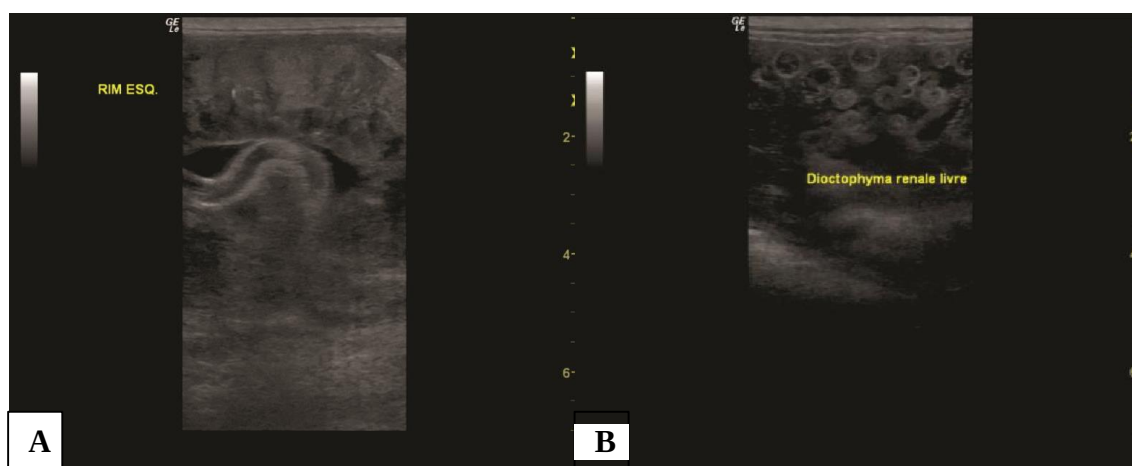


Figura 2. Imagens ultrassonográficas dos exemplares de *Dirofilaria immitis* no interior do rim esquerdo (A) e na cavidade abdominal (B) do paciente canino. Fonte: arquivo fotográfico do PRODÍC.

No segundo exame ultrassonográfico realizado previamente à cirurgia, as alterações observadas inicialmente se mantinham, exceto que não foi observado o parasito no rim esquerdo. Conforme citam Li *et al.* (2010), isto pode ser explicado pela possibilidade de o paciente ter eliminado o parasito.

A presença de *D. renale* no rim esquerdo é rara (Li *et al.*, 2010), sendo o rim direito o mais acometido (Nakagawa *et al.*, 2007) devido à migração das larvas pela parede duodenal no animal acometido. No caso de parasitismo na cavidade abdominal e rim esquerdo, a migração das larvas ocorre pelas curvaturas menor e maior do estômago, respectivamente (Sousa *et al.*, 2011).

No paciente relatado, realizou-se o estudo de Doppler pulsado dos vasos intrarenais nas regiões cranial, média e distal de ambos os rins. Os índices resistivos (IR) observados nas três regiões avaliadas estavam aumentados, apresentando, respectivamente, os valores de 0,77, 0,76 e 0,74 no rim direito, e de 0,73, 0,8 e 0,73 no rim esquerdo (valor de referência $IR < 0,7$). De acordo com Rivers *et al.* (1997), o exame de Doppler renal é capaz de caracterizar doenças que alteram o fluxo de sangue nos rins através do valor do IR, havendo já relatos de valores de IR aumentados em cães com uropatia obstrutiva, assim como no caso de diotofimose relatado no presente trabalho.

Durante o procedimento cirúrgico, observou-se que o omento estava alterado e com coloração avermelhada, enquanto o peritônio estava espessado e com aspecto micronodular. Nesses casos, a peritonite ocorre devido à presença de ovos e à migração dos parasitos na cavidade abdominal, levando a uma reação inflamatória crônica no peritônio, e também pela presença de ovos eliminados pelos parasitos fêmeas na cavidade abdominal (Pedrassani *et al.*, 2014). Além disso, os rins também apresentavam irregularidades nas cápsulas renais, e os ureteres estavam com espessura aumentada.

No pós-operatório, exames hematológicos e urinálises foram realizados para acompanhamento do quadro clínico do paciente. Nos hemogramas, observou-se acentuada queda no hematócrito, agravando o quadro de anemia. Na avaliação da bioquímica sérica, observou-se azotemia, enquanto que nenhuma alteração foi observada na urinálise. Os resultados semelhantes nos exames de bioquímica sérica antes e após a cirurgia podem ser justificados pela possível presença de parasitos em ambos os rins, o que causou a destruição do parênquima renal (Urquhart *et al.*, 1998; Cottar *et al.*, 2012).

CONCLUSÕES

De acordo com o apresentado, é possível concluir que a presença de *D. renale* no rim esquerdo e na cavidade abdominal causa danos severos nos órgãos parasitados pelo helminto, principalmente em relação à função renal. Ademais, apesar de rara, a eliminação de parasitos pela urina pode acontecer em infestações parasitárias renais, além de o tratamento cirúrgico ser imprescindível para a remoção dos parasitos e recuperação do paciente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.C.; SILVA, D.T.; NEVES, M.F. *Diocotophyma renale*: O parasita gigante do rim. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n.8, 2007.
- COTTAR, B.H.; DITTRICH, G.; FERREIRA, A.A. et al. Achados ultrassonográficos de cães parasitados por *Diocotophyma renale* – Estudo retrospectivo. *Veterinária e Zootecnia*, v.19, n.1, p.8-11, 2012.
- KOMMERS, G.D.; ILHA, M.R.S.; BARROS, C.S.L. Diocotofimose em cães: 16 casos. *Ciência Rural*, v.29, n.3, p.517-522, 1999.
- LI, G.; LIU, C.; LI, F. et al. Fatal bilateral diocotophymatosis. *Journal of Parasitologists*, v.96, n.6, p.1152-1154, 2010.
- MESQUITA, L.R.; RAHAL, S.C.; FARIA, L.G. et al. Pre- and post-operative evaluations of eight dogs following right nephrectomy due to *Diocotophyma renale*. *Veterinary Quarterly*, v.34, n.3, p.167-171, 2014.
- NAKAGAWA, T.L.D.R.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; REIS, A.C.F. et al. Giant kidney worm (*Diocotophyma renale*) infections in dogs from Northern Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.145, p.366-370, 2007.
- PEDRASSANI, D.; WENDT, H.; RENNAU, E.A. et al. *Diocotophyme renale* Goeze, 1982 in a cat with a supernumerary kidney. *Brazilian Journal Veterinary Parasitology*, v.23, n.1, p.109-117, 2014.

RIVERS, B.J.; WALTER, P.A.; POLZIN, D.J.; KING, V.L. Duplex Doppler estimation of intrarenal pourcelot resistive index in dogs and cats with renal disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.11, n.4, p.250-260, 1997.

SOUSA, A.A.R.; SOUSA, A.A.S.; COELHO, M.C.O.C. et al. Dioctofimose em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, n.3, 2011.

STAINKI, D.R.; PEDROZO, J.C.S.R.; GASPAR, L.F.J. et al. Urethral obstruction by *Dioctophyma renale* in puppy. *Comparative Clinical Pathology*, v.20, p.535-537, 2011.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; JENNINGS, A.M. *Parasitologia Veterinária*. 2^a ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 1998. 285p.

6 Artigo 3

**Potencial de inibição de embrionamento de ovos de *Diectophyma renale*
com extratos vegetais da família Lamiaceae**

Soliane Carra Perera, Cristine Cioato da Silva, Rogério Antonio Freitag,
Maria Elisabeth Aires Berne, Maria Antonieta Machado Pereira da Silva,
Ivandra Ignês de Santi, Raulene Rodrigues Lobo, Marlete Brum Cleff

Formatado conforme as normas da revista Parasite para a qual será submetido

**Potencial de inibição de embrionamento de ovos de *Diectophyma renale*
com extratos vegetais da família Lamiaceae**

Autor correspondente: Soliane Carra Perera – soliane.cp@hotmail.com

Cristine Cioato da Silva – criscioato@hotmail.com

Rogério Antonio Freitag – rafreitag@gmail.com

Maria Elisabeth Aires Berne – bernemae@gmail.com

Maria Antonieta Machado Pereira da Silva – machadoantonieta@hotmail.com

Ivandra Ignês Santi de Santi – ivandra.santi@yahoo.com.br

Raulene Rodrigues Lobo – raulenelobo@gmail.com

Marlete Brum Cleff – marletecleff@gmail.com

RESUMO

Diectophyma renale é conhecido como o “verme gigante do rim” e acomete carnívoros domésticos e selvagens, inclusive o homem. Objetivou-se avaliar a atividade *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* sobre ovos de *Diectophyma renale* provenientes de canino, e também avaliar a atividade tóxica dos óleos em ovos embrionados de codorna. Os extratos hidroalcoólicos e os óleos essenciais foram obtidos a partir de metodologias descritas, sendo utilizadas folhas secas de cada espécie vegetal, e, além disso, foram identificados os compostos químicos dos óleos essenciais. Os ovos de *D. renale* foram recuperados a partir de urina de um canino naturalmente infectado. Os extratos foram utilizados nas concentrações de 0,31% a 10%, os óleos de orégano e manjerona nas concentrações 0,09% a 3%, e o óleo de alecrim nas concentrações de 0,18% a 6%. Utilizaram-se os antihelmínticos ivermectina e tiabendazol como controles positivos, e água destilada estéril como controle negativo. As placas foram incubadas a 28°C e 80% de umidade relativa durante quatro semanas. A contagem dos ovos embrionados foi realizada semanalmente com auxílio de microscópio de luz invertida. O teste de toxicidade embrionária foi desenvolvido em ovos de codorna nas concentrações de 1,5% a 12%, sendo estes avaliados quanto a mortalidade embrionária por sete dias. A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi feita por cromatografia gasosa, sendo que o principal composto do *O. vulgare* e do *O. majorana* foi o 4-terpineol (20,9% e 34,09%, respectivamente), e do *R. officinalis* foi o cineol (47,91%). Os extratos hidroalcoólicos apresentaram pouca efetividade (em torno de 70% na concentração de 10%), enquanto que os óleos essenciais apresentaram eficácia de 100% nas concentrações iguais e superiores a 0,37%, sendo que os óleos do gênero *Origanum* demonstraram maior potencial antihelmíntico contra o nematóide *D. renale*. Concluiu-se que os óleos essenciais e os extratos hidroalcoólicos das três plantas avaliadas demonstraram efeito na inibição da eclodibilidade dos ovos de *D. renale*.

Palavras-chave: óleos essenciais; extratos hidroalcoólicos; *Origanum vulgare*; *Origanum majorana*; *Rosmarinus officinalis*.

INTRODUÇÃO

Diectophyma renale pertence à classe Nematoda e à superfamília Dioctophymatoidea, sendo conhecido como “verme gigante do rim”. O nematódeo parasita com maior frequência os carnívoros domésticos e selvagens, além de ser de grande importância em saúde pública devido ao seu potencial zoonótico [2, 32, 44].

Os ovos de *D. renale* são eliminados pela urina dos hospedeiros e se desenvolvem em meio aquático até a formação da larva de primeiro estágio (L1). Após, o ovo com a L1 é ingerido pelo hospedeiro intermediário, o anelídeo oligoqueta aquático, onde ocorre o desenvolvimento da larva até o estágio infectante aos hospedeiros definitivos. Estes se infectam ao ingerirem o anelídeo a partir da água de beber ou de um hospedeiro paratênico, como peixes e anfíbios, infectado [29, 44].

Diante da importância dessa enfermidade, deve-se estar atento à prevalência da doença, principalmente em cidades com elevado potencial hídrico e com grande número de cães errantes. Regiões alagadiças predis põem o acesso de hospedeiros intermediário e paratênicos de *D. renale* [35], enquanto que cães errantes apresentam hábitos alimentares pouco seletivos [22], predispondo a ocorrência da doença.

Os animais com *D. renale* costumam ser assintomáticos mesmo quando um dos rins tem seu parênquima totalmente destruído pelo parasito, sendo o rim direito o mais acometido [3, 44]. O diagnóstico da dioctofimose pode ser realizado por exame de urina, ultrassom abdominal e tomografia computadorizada, ou ainda por achado em cirurgias e necropsias [13, 22, 24, 31, 36].

Como tratamento, o mais indicado é a remoção cirúrgica dos parasitos, assim como a nefrectomia ou nefrotomia do rim parasitado, dependendo da gravidade da lesão renal [7, 22]. O uso de antihelmínticos não tem demonstrado bons resultados [7], pois a destruição do parênquima renal faz com que o rim perca sua função, além da dificuldade de eliminação do parasito devido ao seu tamanho [15, 34, 44]. Portanto, o ideal seria o controle da parasitose evitando a ingestão de peixes e anfíbios crus ou mal cozidos [44], ou ainda interferir diretamente no ciclo do nematóide, impedindo o desenvolvimento dos ovos no ambiente a fim de inviabilizá-los.

O uso de plantas para fins medicinais é uma prática milenar [10], sendo que as representantes da família Lamiaceae estão entre as mais utilizadas pela população empiricamente [30, 49]. Nesta família, destacam-se *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum majorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim), plantas muito estudadas pelo fato de seus extratos apresentarem atividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária [1, 6, 14, 17, 21, 28]. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o ação *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* em ovos de *D. renale* a fim de determinar o potencial de inibição de embrionamento dos ovos desse helminto, além de verificar o potencial tóxico embrionário dos extratos testados, e identificar os compostos químicos e majoritários dos óleos essenciais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos óleos essenciais, extratos hidroalcoólicos e ovos de *D. renale*

As folhas secas de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* foram obtidas a partir de distribuidor comercial (Luar Sul®), contendo laudo de certificação botânica e de qualidade. Os óleos essenciais foram extraídos de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV [39], utilizando-se 100 g de folhas secas de cada planta submetidas à extração por arraste à vapor em aparelho do tipo Clevenger durante 4 horas. Após a extração, o óleo obtido foi seco com

sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração. Para o uso nos testes os óleos essenciais foram solubilizados em água destilada estéril e acrescentado tween 80 a 0,5% como emulsificante.

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos, foi necessária a preparação da tintura de cada planta de acordo com o protocolo adaptado de Schiedeck et al., 2008 [42]. Primeiramente, em um vidro estéril e protegido da luz, misturou-se 50 g de folhas secas das plantas com 500 mL álcool de cereais a 70° GL. Essa solução foi agitada por 1 minuto diariamente durante sete dias. Após, foi filtrada com gaze em frasco âmbar, sendo o volume inicial reconstituído com álcool de cereais a 70° GL, formando assim a tintura. Para obtenção dos extratos hidroalcoólicos, utilizou-se rotaevaporador a vácuo a 40°C para retirada do solvente de 10 mL da tintura de cada planta e, posteriormente, o volume inicial foi restituído com água destilada estéril, sendo formado o extrato hidroalcoólico a 10% de cada planta.

Análise cromatográfica dos óleos essenciais

Após extraídos, os óleos essenciais das três plantas foram analisados em equipamento de cromatografia gasosa com detector de massas (Shimadzu GC/MS-QP 2010SE) e auto injetor (AOC-20i), contendo uma coluna de sílica DB-5 (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). A composição fitoquímica e os compostos majoritários foram identificados através da comparação entre o tempo de retenção dos padrões e das amostras.

Teste de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale*

Os ovos de *D. renale* foram obtidos a partir da urina de um paciente canino parasitado. A amostra de urina foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos [26] e o sedimento foi lavado com água destilada e centrifugado nas mesmas condições por mais três vezes até obtenção dos ovos do parasito. Após, os ovos foram mantidos em formalina a 2% sob refrigeração, sendo que uma pequena parte foi incubada em estufa B.O.D. a 28°C e 80% de umidade relativa (UR) durante 30 dias, a fim de avaliar a fertilidade dos ovos com formação da larva de primeiro estágio (L1). Depois de confirmado o potencial de embrionamento dos ovos acima de 50% por visualização em microscópio óptico (Olympus CX21), os ovos foram considerados aptos para serem utilizados no experimento.

O teste de inibição de embrionamento dos ovos foi realizado em placas de microcultivo de 24 poços, com uma média de 130 ovos em cada poço, utilizando-se seis concentrações de cada extrato testado em diluição seriada. Os tratamentos dos óleos essenciais foram determinados a partir de um experimento piloto realizado previamente nas concentrações de 3,125% a 100%, sendo que as concentrações de 3,125% e 6,25% apresentaram resultados eficazes para os óleos dos gêneros *Origanum* e *Rosmarinus*, respectivamente. Portanto, os óleos essenciais de orégano (OOR) e manjerona (OMA) foram testados nas concentrações de 0,09% a 3%, e o óleo essencial de alecrim (OAL) foi testado nas concentrações de 0,18% a 6%. O controle de tween 80 a 0,5% (CTW) foi feito separadamente e de forma proporcional ao seu uso nas concentrações dos óleos essenciais. Em relação aos extratos hidroalcoólicos de orégano (EOR), manjerona (EMA) e alecrim (EAL), foram testadas as concentrações de 0,31% a 10% para as três plantas. Para o controle negativo, utilizou-se água destilada estéril; e, como controles positivos, utilizou-se dois antihelmínticos testados separadamente e em diferentes concentrações: tiabendazol (0,025 mg/mL) e ivermectina (0,025 mg/mL, 0,050 mg/mL e 0,1 mg/mL). Após o preparo das placas de microcultivo, estas foram incubadas em estufa B.O.D. a 28°C e com 80% de UR durante quatro semanas. A contagem de ovos embrionados foi realizada com o auxílio de microscópio de luz invertida (Olympus CKX41).

Toxicidade embrionária em ovos de codorna

Após determinar os extratos e as concentrações que melhor inibiram o embrionamento dos ovos de *D. renale*, realizou-se o teste de toxicidade embrionária em ovos de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) de casca branca. Os ovos foram incubados pelo período de sete dias a 37°C com umidade controlada de 55%, sendo avaliados após cinco dias por ovoscopia e delimitada a câmara de ar para demarcação do local de administração do extrato vegetal [25].

Para a avaliação da toxicidade dos extratos vegetais, foram utilizados três ovos de codorna para cada concentração dos óleos essenciais (1,5%, 3%, 6% e 12%), e cinco ovos de codorna para cada concentração de tween 80 conforme a diluição dos óleos essenciais (3%, 6% e 12%). Para todos os tratamentos, o controle negativo foi realizado com ovos inoculados com água destilada estéril. Após esterilização com álcool 70%, a inoculação foi realizada na cavidade corioalantóide e contralateralmente ao embrião, utilizando-se 40 µL de cada extrato vegetal e dos controles. Logo após a inoculação, o orifício foi fechado e os ovos incubados por sete dias a 37°C e com umidade controlada de 55%. Durante esse período, foi realizada a ovoscopia diariamente a fim de verificar a mortalidade embrionária, fazendo a abertura dos ovos não viáveis [25, 40]. Ao final dos sete dias, foi realizada a abertura dos ovos após eutanásia dos embriões de acordo com protocolo de Leary et al., 2013 [23]. Em seguida, os embriões foram armazenados em frascos com formalina a 10% para, posteriormente, serem encaminhados para a realização de exame histopatológico. Essa etapa do experimento foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas sob o código CEEA 7044 / 2015.

Análise estatística

A avaliação dos resultados de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale* foi feita pela análise de variância ANOVA com comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando o *software* Statistix 9.0.

RESULTADOS

Análise cromatográfica dos óleos essenciais

A partir da análise por cromatografia gasosa, determinou-se a composição química dos óleos essenciais. No caso do óleo de *O. vulgare*, os componentes foram: α -thujene, α - pineno, α -terpineno, β -terpineno, γ -terpineno, β -mirceno, p-cimeno, β -felandreno, β -trans-ocimeno, hidrato de trans-sabineno, delta-2-carene, hidrato de cis-sabineno, 4-terpineol, α -terpineol, timol, éter metil timol, éter metil isotimol, acetato de linalol, carvacrol e cariofileno. No óleo de *O. majorana*, os componentes químicos encontrados foram: α -thujene, α - pineno, β -pineno, α -felandreno, β -felandreno, α -terpineno, γ -terpineno, p-cimeno, hidrato de trans-sabineno, hidrato de cis-sabineno, delta-2-carene, 4-terpineol, α -terpineol, acetato de 4-terpiniol, cariofileno, elixene e espatulenol. No óleo de *R. officinalis*, os componentes químicos caracterizados foram: α - pineno, β -pineno, canfeno, sabineno, α -terpineno, γ -terpineno, cineol, linalol, cânfora, isoborneol, 4-terpineol, α -terpineol, acetato de bornilo, cariofileno e α -humuleno.

Além da composição química geral, determinou-se também os compostos majoritários de cada óleo essencial (Figuras 1, 2 e 3). Sendo assim, no óleo de *O. vulgare* (Figura 1), o compostos majoritários foram o 4-terpineol (20,9%), o γ -terpineno (14,16%), o α -terpineno (8,63%) e o timol (8,42%); no óleo de *O. majorana*

(Figura 2), foram o 4-terpineol (34,09%), o γ -terpineno (14,28%) e o α -terpineno (9,6%); e no óleo essencial de *R. officinalis* (Figura 3), foram o cineol (47,91%), a cânfora (17,92%) e o α -pineno (11,52%).

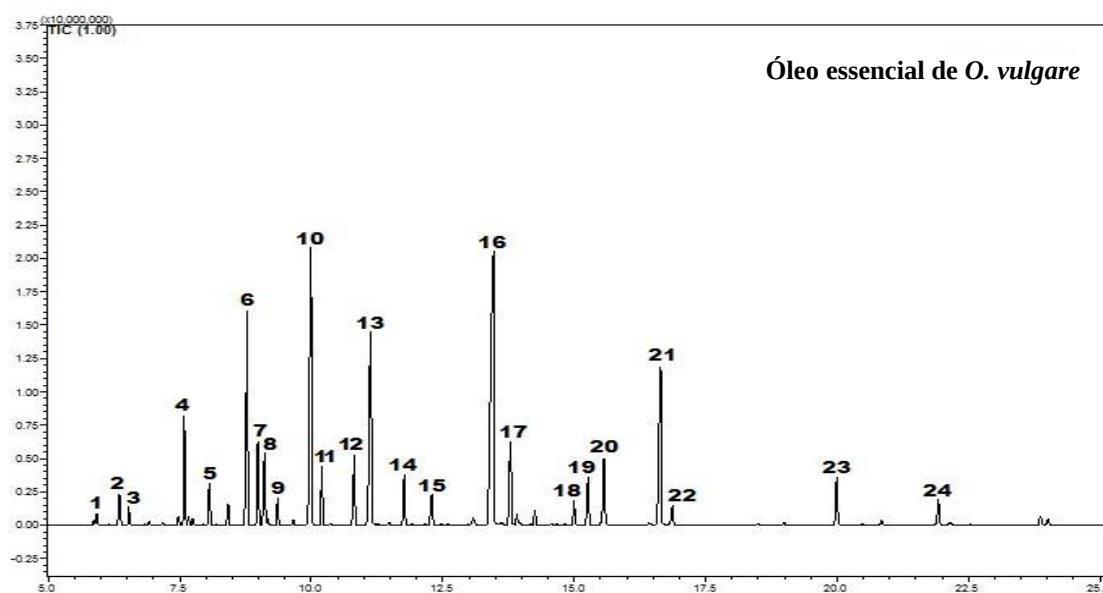


Figura 1. Demonstração do cromatograma com os picos dos compostos químicos caracterizados no óleo essencial de *O. vulgare*, sendo os majoritários correspondentes aos números 16 (4-terpineol), 10 (γ -terpineno), 6 (α -terpineno) e 21 (timol).

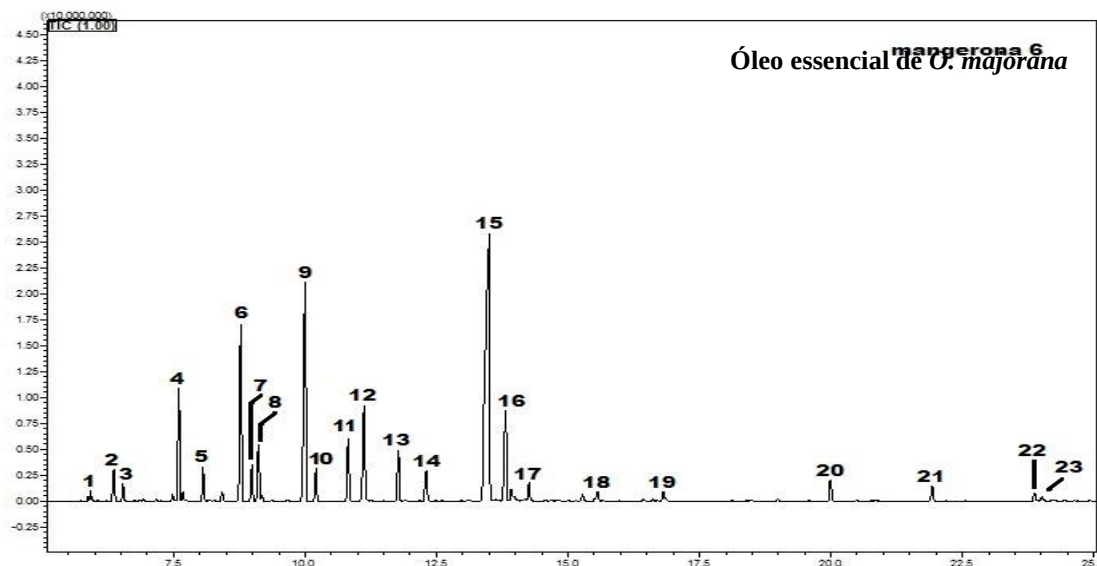


Figura 2. Demonstração do cromatograma com os picos dos compostos químicos caracterizados no óleo essencial de *O. majorana*, sendo os majoritários correspondentes aos números 15 (4-terpineol), 9 (γ -terpineno) e 6 (α -terpineno).

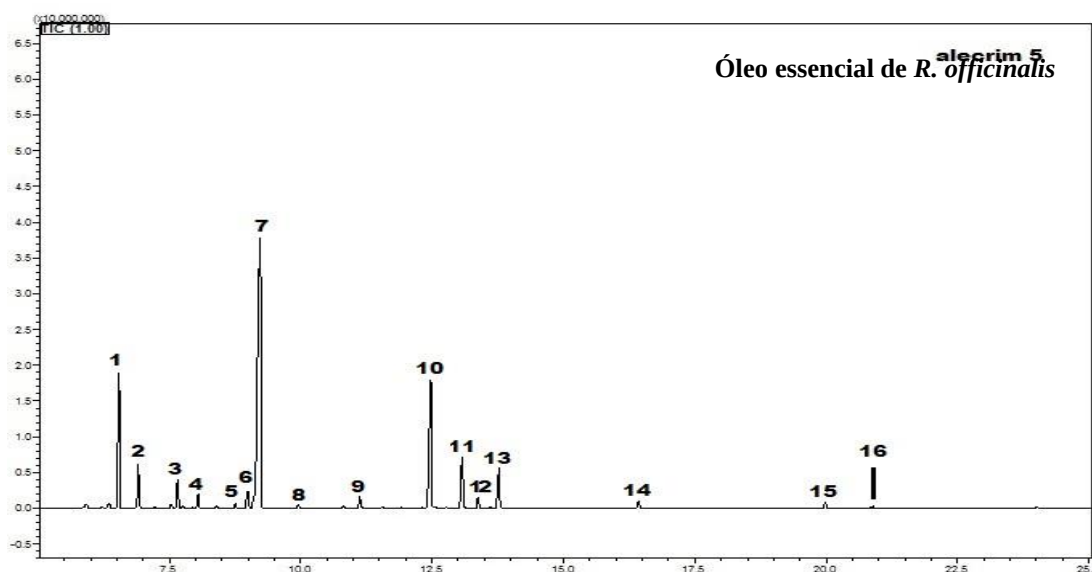


Figura 3. Demonstração do cromatograma com os compostos químicos caracterizados no óleo essencial de *R. officinalis*, sendo os majoritários correspondentes aos números 7 (cineol), 10 (cânfora) e 1 (α -pineno).

Teste de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale*

Na 1ª semana de experimento, não ocorreu embrionamento dos ovos de *D. renale* em nenhum dos tratamentos e controles, iniciando-se a partir da 2ª semana. Em todas as avaliações realizadas, observou-se o aumento progressivo no número de ovos embrionados de *D. renale* conforme o período de incubação do mesmos, exceto nos controles positivos com ivermectina (0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL) e tiabendazol (0,025 mg/mL), que se constatou 100% de inibição de embrionamento em todas as semanas de experimento. No controle negativo com água destilada estéril, a maior taxa de embrionamento obtida foi de 59,57% na 4ª semana do experimento, e, para o controle com tween 80, esta taxa variou de 49,92% e 58,92% nas diferentes concentrações, não havendo diferença estatística entre esses dois grupos.

Nos tratamentos com o óleo essencial de *O. vulgare* (OOR), notou-se que as três maiores concentrações (0,75%, 1,5% e 3%) demonstraram taxa de inibição de embrionamento de 100% dos ovos de *D. renale* em todas as semanas. Além disso, as concentrações de 0,37% e 0,18% apresentaram, respectivamente, 99,85% e 88,84% de taxa de inibição dos ovos na 4ª semana, não havendo diferença estatística entre essas cinco concentrações. Por outro lado, a concentração de 0,09% apontou taxa de inibição de 72,26% (Tabela 1).

Em relação ao óleo essencial de *O. majorana* (OMA), observou-se que houve 100% de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale* em todas as semanas, desde a concentração de 0,37% até 3%. Na 4ª semana, as concentrações de 0,18% e 0,09% apresentaram potencial inibitório de 90,69% e 71,48%, respectivamente (Tabela 1).

O óleo essencial de *R. officinalis* (OAL) expressou melhores resultados nas concentrações de 3% e 6%, correspondendo a uma taxa de inibição de embrionamento, nessa ordem, de 99,42% e 93,97% na 4ª semana. As demais concentrações, de 0,18% a 1,5%, apresentaram níveis menores de inibição, indo de 47,62% a 79% (Tabela 1).

Tabela 1. Taxas de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale* na 4ª semana, após tratamento com os óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*.

Concentração (%)	OOR	OMA	OAL
6	-	-	99,42 ^a
3	100 ^a	100 ^a	93,97 ^a
1,5	100 ^a	100 ^a	79,00 ^{bd}
0,75	100 ^a	100 ^a	67,21 ^{cde}
0,37	99,85 ^a	100 ^a	64,07 ^{ce}
0,18	88,84 ^{ab}	90,69 ^{ab}	47,62 ^e
0,09	72,26 ^{cd}	71,48 ^{cd}	-

*OOR: Óleo essencial de Orégano; OMA: Óleo essencial de Manjerona; OAL: Óleo essencial de Alecrim;

**Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

Com relação ao extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* (EOR), a maior taxa de inibição de embrionamento obtida foi de 72,64% na concentração de 10% na 4ª semana, enquanto que observaram-se taxas de inibição que variaram de 57,42% a 65,29% nas demais concentrações. No geral, os resultados do EOR não apresentaram diferença estatística entre si, exceto em relação às concentrações de 1,25% e 10% (Tabela 2). Além disso, observou-se diferença estatística no percentual de embrionamento em relação ao controle negativo, em todas as suas concentrações.

No extrato hidroalcoólico de *O. majorana* (EMA), não foi possível realizar a contagem de ovos embrionados na concentração de 10% devido às dificuldades apresentadas durante a leitura, sendo considerada a concentração de 5% a mais elevada nesse extrato. Na 4ª semana, não houve diferença estatística das taxas de inibição de embrionamento entre os tratamentos do EMA, uma vez que o potencial inibitório variou de 55,69% a 60,16%, sendo a concentração de 5% a mais eficaz (Tabela 2).

Com relação ao extrato hidroalcoólico de *R. officinalis*, na 4ª semana, o maior potencial inibitório (74,67%) foi observado na concentração de 2,5%. Apesar disso, todas as concentrações, exceto a de 0,31%, não apresentaram diferença estatística entre si e em relação ao controle negativo, sendo suas taxas de inibição de embrionamento variando de 66,46% a 74,67% (Tabela 2).

Tabela 2. Taxas de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale* na 4ª semana, após tratamento com os extratos hidroalcoólicos de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*.

Concentração (%)	EOR	EMA	EAL
10	72,64 ^{ab}	-	71,07 ^{abdf}
5	63,25 ^{abce}	60,16 ^{bce}	66,46 ^{abdfg}
2,5	65,29 ^{abce}	58,74 ^{cde}	74,67 ^a
1,25	57,42 ^{eg}	55,69 ^{eg}	72,41 ^{ab}
0,62	61,10 ^{bce}	59,68 ^{bce}	67,40 ^{abdg}
0,31	65,10 ^{abce}	59,26 ^{cefg}	52,92 ^e

*EOR: Extrato Hidroalcoólico de Orégano; EMA: Extrato Hidroalcoólico de Manjerona; EAL: Extrato Hidroalcoólico de Alecrim;

**Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

Toxicidade embrionária em ovos de codorna

Os ensaios de toxicidade embrionária foram realizados com os óleos essenciais de orégano, manjerona e alecrim, nas concentrações de 1,5% a 12%, pois estes apresentaram bons resultados na inibição de eclodibilidade dos ovos de *D. renale*, e são considerados mais tóxicos por serem mais concentrados. Também testou-se a toxicidade embrionária com o tween 80 a fim de determinar se esse emulsificante apresentou algum grau de toxicidade, uma vez que ele é necessário na diluição dos óleos essenciais.

A viabilidade embrionária foi avaliada a partir das 24 horas em todos os tratamentos [40], sendo que foram descartados os ovos em que ocorreram as mortes nas primeiras 24 horas após a inoculação dos tratamentos, como foi o caso da concentração de 12% do óleo de orégano. Após esse período, a taxa de viabilidade embrionária nos ovos de codorna resultou em 100% em todos os tratamentos com os óleos essenciais, exceto na concentração de 3% para o óleo de manjerona (0% viabilidade) (Tabela 3). Nos tratamentos com o tween 80, houve diferentes taxas de viabilidade dos ovos de codorna, sendo elas de 80% nas concentrações de 3% e 6%, e de 40% na concentração de 12%.

Tabela 3. Taxa de viabilidade embrionária em ovos de codorna no 7º dia, após inoculação com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*.

Concentração (%)	OOR	OMA	OAL
12	-	100	100
6	100	100	100
3	100	0	100
1,5	100	100	100

*OOR: Óleo essencial de Orégano; OMA: Óleo essencial de Manjerona; OAL: Óleo essencial de Alecrim.

DISCUSSÃO

O uso de extratos vegetais no controle de parasitos, na medicina veterinária, vem sendo bem pesquisado nos últimos anos, tanto com helmintos de importância para animais de companhia como para animais de produção [4, 14, 33, 43, 45, 47]. Entretanto, pesquisas relacionados ao helminto *D. renale* não foram encontradas na literatura, salientando a importância desse trabalho, uma vez que este nematódeo é um importante agente causador da dioctofimose, uma parasitose de caráter zoonótico [2]. Entre as diversas lesões causadas por *D. renale* aos animais e às pessoas infectadas, a principal delas é a destruição do parênquima renal [44].

Nos resultados obtidos, observou-se que os controles positivos com antihelmínticos inibiram o embrionamento dos ovos de *D. renale* em todas as concentrações testadas. Também foi possível observar que os ovos do nematódeo apresentaram boa viabilidade tanto no controle negativo quanto no controle com tween 80. Isso demonstra que o uso desse emulsificador nas diluições dos óleos essenciais não influenciou no desenvolvimento larvar no interior dos ovos de *D. renale*.

Na comparação da ação entre os óleos essenciais avaliados nos mesmos tempos de exposição, observou-se que o OOR e a OMA apresentaram melhores potenciais inibitórios quando comparados ao OAL. Na concentração de 0,37%, as taxas de inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale* foram de 99,85% e 100% para os OOR e OMA, respectivamente. No caso do OAL, as concentrações de 3% e 6% apresentaram melhor eficácia com potenciais inibitórios, nessa ordem, de 93,97% e 99,42%.

Todas as concentrações dos extratos hidroalcoólicos demonstraram interferir na taxa de embrionamento dos ovos de *D. renale*, entretanto com taxas de inibição menores que aquelas obtidas com os óleos essenciais, sendo que os melhores percentuais de inibição ficaram em torno de 70% para os extratos. De um modo geral, o EAL demonstrou maior ação inibitória no embrionamento dos ovos de *D. renale* que os demais extratos, seguido do EOR e, por último, o EMA, ao contrário do que foi observado no grupo dos óleos essenciais.

De acordo a *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), o nível de eficácia de um antiparasitário é classificado conforme o seu potencial antihelmíntico, sendo considerado como efetivo (acima de 90%), moderadamente efetivo (entre 80% e 90%), pouco efetivo (entre 60% e 80%) e não efetivo (abaixo de 60%) [38]. Portanto, de acordo com esta classificação, os óleos essenciais de orégano (OOR) e manjerona (OMA) demonstraram ser efetivos nas concentrações a partir de 0,37% e 0,18%, respectivamente, enquanto o óleo de alecrim (OAL) foi efetivo a partir de 3%. Com relação aos extratos hidroalcoólicos (EOR, EMA e EAL), todos foram classificados com pouca ou sem efetividade na inibição de embrionamento dos ovos de *D. renale*. Os resultados observados em ovos de *D. renale* estão de acordo com o observado por Azambuja, 2015 [4], que verificou maior potencial inibitório dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana* quando comparados ao óleo de *R. officinalis* em ovos de *Ancylostoma* spp. No estudo citado, observou-se 100% de inibição de eclodibilidade dos ovos para os óleos de orégano e manjerona nas concentrações de 0,62% a 2,5%, e para óleo de alecrim na concentração de 2,5%.

Em estudo avaliando o potencial dos extratos, Dias de Castro et al., 2013 [14] pesquisaram ação de *O. vulgare* na inibição da eclodibilidade em ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*. Os autores avaliaram tintura, extrato hidroalcoólico e extrato aquoso em concentrações de 0,62 mg/mL a 80 mg/mL. Os resultados evidenciaram que a tintura e o extrato

hidroalcoólico apresentaram eficácia de 100% e 95,6% de inibição da eclodibilidade dos ovos dos parasitos nas concentrações acima de 10 mg/mL.

O potencial dos óleos essenciais também foi demonstrado em ectoparasitos, a fim de averiguar o efeito carrapaticida dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Allium sativum* (alho) e *Lippia graveolens* (orégano mexicano) sob larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. As concentrações testadas de cada óleo foram de 1,25% a 20%, sendo que os três óleos foram eficazes contra as larvas de carrapato. O orégano mexicano e o alho apresentaram taxas de mortalidade de 90% a 100% em todas as concentrações estudadas, enquanto que o alecrim expressou 88,98% e 100% de mortalidade das larvas do carrapato nas concentrações de 10% e 20%, respectivamente [47].

Outras plantas da família Lamiaceae vem demonstrando efeito antihelmíntico em nematóides gastrintestinais de bovinos, como no caso da *Mentha villosa*. A partir da concentração de 40%, o hidrolato de *M. villosa* obteve ação ovicida com eficácia de mais de 90% sobre ovos de parasitos do gênero *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus* [33]. Além da Lamiaceae, outras famílias de plantas são conhecidas empiricamente por apresentarem propriedades antiparasitárias. O óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham (alecrim pimenta), pertencente à família Verbenaceae, foi testado em ovos de *Haemonchus contortus* nas concentrações de 0,31 a 5 mg/mL, sendo que o potencial ovicida foi de 100% nas concentrações de 1,25 a 5 mg/mL [45]. O alecrim pimenta também foi testado na forma de extrato hidroalcoólico seco em larvas infectantes de nematódeos de caprinos, sendo eles do gênero *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*. Entre as dez concentrações avaliadas, a mais elevada (500 mg/mL) demonstrou o melhor resultado com 95,89% de ação larvicida sobre nematódeos [43]. O óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (eucalipto-comum) foi avaliado sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento de larvas de *Haemonchus contortus*, e apresentou efeito inibitório dose-dependente, sendo a eficácia máxima obtida sobre ovos foi de 99,3% na concentração de 21,75 mg/mL [27].

Estudos tem sido feitos a fim de avaliar o efeito antiparasitário em helmintos de ruminantes a partir de óleos essenciais de plantas como alfavaca (*Ocimum gratissimum*), alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e canelinha (*Croton zehntneri*), e também dos compostos eugenol, 1-8-cineol e anetol. Esses estudos demonstraram eficácia em torno de 90% na inibição da eclosão dos ovos, sendo maior o potencial nos óleos do que nos compostos isolados [8, 37, 45], o que indica uma possível ação sinérgica entre os compostos químicos quando presentes nos óleos essenciais.

A atividade antihelmíntica está diretamente relacionada com a composição dos extratos, sendo que, após a avaliação dos compostos dos óleos essenciais utilizados, observou-se que os três óleos apresentaram alguns componentes químicos semelhantes entre si, caracterizados pelo α -pineno, α -terpineno, γ -terpineno, 4-terpineol, α -terpineol e cariofileno. Porém, os compostos majoritários se diferiram entre os gêneros *Origanum* e *Rosmarinus*. No caso do óleo essencial de *O. vulgare*, os principais componentes identificados foram o 4-terpineol, o γ -terpineno, o α -terpineno e o timol. No óleo essencial de *O. majorana*, foram encontrados os mesmos componentes que no óleo de orégano, exceto pelo timol, enquanto que o óleo essencial de *R. officinalis* apresentou componentes majoritários diferentes dos demais, sendo estes o cineol, a cânfora e o α -pineno.

Diversas pesquisas tem sido realizadas com os óleos essenciais de orégano, manjerona e alecrim, sendo que, em sua maioria, os componentes majoritários identificados são semelhantes aos observados nesse trabalho, como é o caso do estudo realizado por Bomfim et al., 2015 [6], que identificou em quantidades semelhantes os mesmos compostos majoritários no óleo de alecrim, sendo estes o 1,8-cineol (52,2%), a cânfora (15,2%) e o α -

pineno (12,4%). Outro caso é o estudo desenvolvido por Azambuja [4], que detectou os mesmos compostos majoritários nos óleos essenciais de orégano, manjerona e alecrim, com exceção do α -terpineno que não foi descrito como majoritário no óleo de orégano. Além disso, a autora também observou efetiva atividade antihelmíntica frente a ovos de *Ancylostoma* spp., assim como observado nos ovos de *D. renale* nesse trabalho, caracterizando esses compostos como os principais agentes antiparasitários dos óleos. Em outro trabalho, foram detectados, como compostos majoritários, o carvacrol e o timol no óleo de orégano, e o terpineol no óleo de manjerona [28]. Os mesmos componentes foram identificados como majoritários nos óleos testados nos ovos de *D. renale*, exceto pelo carvacrol que foi identificado em uma baixa quantia no óleo de orégano, o que pode ser justificado pelo fato das plantas apresentarem origens diferentes.

Mesmo que uma planta exerça importante efeito medicinal, o seu uso também pode apresentar risco de intoxicação pelos seus compostos [9]. Por isso, é necessário conhecer o potencial tóxico de determinada planta para que seja estabelecido o uso seguro, sem prejudicar a saúde humana e animal [46]. Visando estabelecer o nível de toxicidade, estudos *in vitro* e *in vivo* tem sido realizados a fim de determinar se a concentração efetiva de uma planta medicinal pode também causar efeitos maléficos ao organismo [18, 20].

Sabe-se que os gêneros *Origanum* e *Rosmarinus* apresentam diversos compostos químicos ativos, contudo, dados em literatura científica comprovando a segurança quanto ao uso destas plantas são escassos [11, 20, 41]. Alguns trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando células de diferentes origens, vem demonstrando o potencial citotóxico de óleos e extratos, o que é útil na orientação para a sequência de investigações *in vivo*. Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *R. officinalis* apresentam importante citotoxicidade, sendo que somente em concentrações muito baixas, próximas a 0,052 e 0,023 $\mu\text{g/mL}$ nos óleos de alecrim e orégano, respectivamente, não foi observada toxicidade em células renais de bovino, canino, felino e de coelho [5]. Em relação ao óleo de *R. officinalis*, a concentração máxima não tóxica em células VERO observada foi de 3,2 $\mu\text{g/mL}$ [16]. Gonçalves et al., 2010 [19] avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de compostos voláteis isolados de óleos essenciais em linhagens celulares de fígado, células epiteliais, linfócitos e em fibroblastos, demonstrando que o 4-terpineol, α -terpineol, terpinoleno, α -pineno e 1,8 cineol foram os responsáveis pela citotoxicidade.

Entretanto não existem pesquisas avaliando a toxicidade dos óleos essenciais em modelos embrionários de ovos de codorna, sendo esta outra importante metodologia de triagem, uma vez que os óleos essenciais apresentaram melhor eficácia sobre os ovos de *D. renale*. O teste de toxicidade embrionária em ovos de codorna de casca branca (*Coturnix coturnix japonica*) é uma forma alternativa de modelo biológico ao uso de animais de laboratório, a fim de avaliar o potencial tóxico de um produto [25, 48]. Ovos de galinha (*Gallus domesticus*) já vem sendo utilizados para avaliação de toxicidade de produtos [40], porém ovos de codorna apresentam algumas vantagens, como menor custo de produção, menor tempo de incubação e necessidade de menor espaço físico [25].

Os testes *in vitro* são úteis para observar a ação do fármaco em contato direto com os ovos de parasito, sendo que a adição de uma substância aos ovos permite avaliar seu efeito sobre as mitoses [12]. Além de verificar a ação antihelmíntica, o uso destes testes na triagem de extratos vegetais apresentam como vantagens a facilidade de execução, o baixo custo e a rapidez, permitindo a seleção dos extratos mais promissores. Além disso, diminuem gastos, evitam perda de tempo e o uso indiscriminado de animais de experimentação [45].

Esse trabalho tem aspecto importante por evidenciar a possibilidade do uso de extratos da família Lamiaceae no controle de *D. renale*, parasito que apresenta grande importância para veterinária e em saúde pública, por causar uma zoonose ainda pouco estudada. Portanto, foi possível concluir que os extratos vegetais de *O.*

vulgare, *O. majorana* e *R. officinalis* são boas alternativas para a inibição do embrionamento de ovos de *D. renale*, destacando-se os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana*, por apresentarem melhor ação e baixa toxicidade embrionária. Os extratos hidroalcoólicos devem ser melhor estudados, a fim de que se determine uma concentração efetiva com potencial inibitório e baixa toxicidade.

REFERÊNCIAS

1. Abdel-Massih, R.M.; Abraham, A. Extracts os *Rosmarinus officinalis*, *Rheum rhaponticum*, and *Origanum majorana* exhibit significant anti-staphylococcal activity. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, n.3, p.819-828, 2014.
2. Alves, G.C.; Silva, D.T.; Neves, M.F. *Diectophyma renale*: o parasita gigante do rim. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.8, 2007.
3. Amaral, L.C.D.; Polizer, K.A.; Sant'ana, T.M. *Diectophyma renale*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, 2008.
4. Azambuja, Rosaria Helena Machado. **Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae sobre ovos de *Ancylostoma* spp.** 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
5. Blank, Daiane Einhardt. **Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae.** 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
6. Bomfim, N.S.; Nakassugi, L.P.; Oliveira, J.F.P.; Kohiyama, C.Y.; Mossini, S.A.G.; Grespan, R.; Nerilo, S.B.; Mallmann, C.A.; Filho, B.A.A.; Machinski Jr, M. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v.166, p.330-336, 2015.
7. Brun, M.V.; Beck, C.A.C.; Mariano, M.B.; Antunes, R.; Pigatto, J.A.T. Nefrectomia laparoscópica em cão parasitado por *Diectophyma renale* – relato de caso. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Uruguaiana, v.5, n.1, p.145-152, 2002.
8. Camurça-Vasconcelos, A.L.F.; Bevilaqua, C.M.L.; Morais, S.M.; Maciel, M.V.; Costa, C.T.C.; Macedo, I.T.F.; Oliveira, L.M.B.; Braga, R.R.; Silva, R.A.; Vieira, L.S. Antihelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.288-294, 2007.

9. Carneiro, F.M.; Silva, M.J.P.; Borges, L.L.; Albernaz, L.C.; Costa, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v.3, n.2, p.44-75, 2014.
10. Caroccia, G.H.G.; Rodolpho, J.A.; Oliveira, S.R.P.; Camillo, L.; Magalhães, L.G.; Anibal, F.F. Atividade dos compostos curcumina e albendazol contra o nematódeo *Toxocara canis* *in vitro*. **Revista Saúde**, v.7, n.1-2, p.11-16, 2013.
11. Cleff, M.B.; Meinerz, A.R.; Sallis, E.S.; Antunes, T.A.; Mattei, A.; Rodrigues, M.R.; Meireles, M.C.A.; Mello, J.R.B. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleos essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, n.27, v.5, p.704-709, 2008.
12. Coles, G.C.; Borgsteede, F.H.; Geerts, S.; Klei, T.R.; Taylor, M.A.; Waller, P.J. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of antihelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, n.1-2, p.35-44, 1992.
13. Cottar, B.H.; Dittrich, G.; Ferreira, A.A.; Carvalho, A.C.P.; Albernaz, V.G.P.; Luz, M.T.; Tasqueti, U.I. Achados ultrassonográficos de cães parasitados por *Diocotophyma renale* – estudo retrospectivo. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, p.8-11, 2012.
14. Dias de Castro, L.L.; Madrid, I. Aguiar, C.L.G.; Castro, L.M.; Cleff, M.B.; Berne, M.E.A.; Leite, F.P.L. *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of castle. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.4, p.508-513, 2013.
15. Eicke, B.; Zanetti, K.; Reginaldo, A.S.; Silva, J.; Silva, D.K.M.; Santos, G.A.; Lopes, B.A.; Braz, P.H. *Diocotophyma renale* in a patient living in Mato Grosso do Sul. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.4, p.282-285, 2014.
16. Erdogan, I.O.; Ozcelik, B.; Kartal, M.; Kan, Y. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil componentes. **Turkish Journal of Biology**, v.36, p.239-246, 2012.
17. Freire, J.M.; Cardoso, M.G.; Batista, L.R.; Andrade, M.A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.2, p.209-214, 2011.
18. Gavanji, S.; Mohammadi, E.; Larki, B.; Bakhtari, A. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of some herbal essential oils in comparison with common antibiotics in bioassay condition. **Integrative Medicine Research**, v.3, p.142-152, 2014.

19. Gonçalves, M.J.; CRUZ, M.T.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M.C.; SALGUEIRO, L. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygus* subsp. *Sylvestris*. **Industrial Crops and Products**, v.32, p.70-75, 2010.
20. Hollenbach, C.B.; Bing, R.S.; Stedile, R.; Mello, F.P.S.; Schuch, T.L.; Rodrigues, M.R.A.; Mello, F.B.M.; Mello, J.R.B. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p. 1-7, 2015.
21. Jordán, M.J.; Lax, V.; Rota, M.C.; Loran, S.; Sotomayor, J.A. Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the *in vitro* antioxidante and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.9603-9608, 2012.
22. Kommers, G.D.; Ilha, M.R.S.; Barros, C.S.L. Dioctofimose em cães: 16 casos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.517-522, 1999.
23. Leary, Steven; Underwood, Wendy; Anthony, Raymond; Cartner, Samuel; Corey, Douglas; Grandin, Temple; Greenacre, Cheryl; Gwaltney-Brant, Sharon; McCrackin, Mary Ann; Meyer, Robert; Miller, David; Shearer, Jan; Yanong, Roy. **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 edition**. Versão 2013.0.1. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2013. 102p.
24. Li, G.; Liu, C.; Li, F.; Zhou, M.; Liu, X.; Niu, Y. Fatal bilateral dioctophymatosis. **Journal of Parasitology**, v.96, n.6, p.1152-1154, 2010.
25. Lobo, Raulene Rodrigues. **Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos embrionados de codorna como modelo biológico**. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
26. Lopes, Sônia Terezinha dos Anjos; Biondo, Alexander Welker; Santos, Andrea Pires. **Manual de patologia clínica veterinária**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 107p.
27. Macedo, I.T.F.; Bevilaqua, C.M.L.; Oliveira, L.M.B.; Camurça-Vasconcelos, A.L.F.; Vieira, L.S.; Oliveira, F.R.; Queiroz-Junior, E.M.; Portela, B.G.; Barros, R.S.; Chagas, A.C.D. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.3, p.62-66, 2009.
28. Marques, L.M.V.; Funck, G.D.; Kroning, I.S.; Silva, W.P.; Fiorentini, A.M.; Ribeiro, G.A. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, v.77, p.444-450, 2015.

29. Measures, L.N.; Anderson, R.C. Centrarchid fish as paratenic hosts of the giant kidney worm, *Diectophyma renale* (Goeze, 1782), in Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v.21, n.1, p.11-19, 1985.
30. Messias, M.C.T.B.; Menegatto, M.F.; Prado, A.C.C.; Santos, B.R.; Guimarães, M.F.M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.17, n.1, p.76-104, 2015.
31. Milech, V.; Perera, S.C.; Ramos, S.; Pedrozo, J.C.S.R.; Braga, F.V.A. Achado acidental de dioctofimose durante procedimento cirúrgico em um canino – relato de caso. **21º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2012.
32. Monteiro, S.G.; Sallis, E.S.V.; Stainki, D.R. Infecção natural por trinta e quatro helmintos da espécie *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) em um cão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.9, n.1, p.95-99, 2002.
33. Nascimento, E.M.; Furlong, J.; Pimenta, D.S.; Prata, M.C.A. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.3, p.817-824, 2009.
34. Pedrassani, Daniela. **Aspectos morfológicos, imunológicos e epidemiológicos do *Diectophyma renale* em cães no distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina**. 2009. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.
35. Pereira, B.J.; Girardelli, G.L.; Trivilin, L.O.; Lima, V.R.; Nunes, L.C.; Martins, I.V.F. Ocorrência de dioctofimose em cães do município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, Brasil, no período de maio a dezembro de 2014. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.3, p.123-125, 2006.
36. Perera, S.C.; Capella, G.A.; Pinto, N.B.; Ananã, D.C.; Rappeti, J.; Cleff, M.B. Investigação de *Diectophyma renale* em amostras de urina em cães e gatos na cidade de Pelotas. **XVII Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2015.
37. Pessoa, L.M.; Morais, S.M.; Bevilaqua, C.M.L.; Luciano, J.H.S. Antihelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.59-63, 2002.
38. Powers, K.G.; Wood, I.B.; Eckert, J.; Gibson, T.; Smith, H.J. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P) guidelines for evaluating the efficacy of antihelmintics in ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.10, n.4, p.265-284, 1982.

39. Rocha, João Gilvan. **Farmacopéia Brasileira**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 392p.
40. Sadighara, P.; Amoli, J.S.; Helan, J.A.; Aliesfahani, T.; Farkhondeh, T. The developmental toxicity of cottonseed extraction on chicken embryo. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.3, p.560-563, 2011.
41. Santin, Rosema. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
42. Schiedeck, G.; Bevilaqua, G.A.P.; Nachtigal, G.F.; Bauer, M.V.L. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. **Comunicado Técnico, 190 – EMBRAPA**. 1ª ed. Pelotas, 2008, 4p.
43. Souza, W.M.A.; Ramos, R.A.; Silva, J.C.B.; Alves, L.C.; Coelho, M.C.O.C.C.; Maia, M.B.S. Atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Lippia sidoides* Cham sobre larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais (família Trichostrongylidae) de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.119-122, 2011.
44. Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Dunn, A.M.; Jennings, F.W. **Parasitologia veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998. 273p.
45. Vasconcelos, Ana Lourdes Camurça Fernandes. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.
46. Veiga Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
47. Velazquez, M.M.; Cruz, R.R.; Herrera, G.C.; Fernandez, J.M.F.; Alvarez, A.H.; Cervantes, E.L. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.48, n.4, p.822-827, 2011.
48. Yamawaki, R.A.; Milbradt, E.L.; Coppola, M.P.; Rodrigues, J.C.Z.; Andreatti Filho, R.L.; Padovani, C.R.; Okamoto, A.S. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella* Enteritidis after hatch. **Poultry Science**, v.92, p.1560-1563, 2013.
49. Zambon, V.; Agostini, K. Saber popular sobre plantas: um levantamento etnobotânico em áreas rurais de Piracicaba/SP. **Revista Ciência, Tecnologia e Ambiente**, v.1, n.1, p.8-14, 2015.

7 Considerações finais

A partir da análise laboratorial de urina de cães e gatos, observou-se que a casuística de diotofimose na cidade de Pelotas é elevada, correspondendo a 18,6% de amostras com ovos de *D. renale*. A espécie mais acometida foi a canina, sendo que somente um gato foi diagnosticado com a doença. Também foi possível concluir que o exame de urina é um método eficaz de diagnóstico da doença, sobretudo quando há presença de *D. renale* nos rins do animal acometido.

Ovos de *D. renale* podem ser encontrados no solo, mesmo este não sendo o local apropriado para o seu desenvolvimento. Na região central de Pelotas, próximo ao Ambulatório Ceval, o solo está contaminado com ovos de *D. renale*, sinalizando a ocorrência da parasitose nos animais e a importância desse nematódeo na cidade, principalmente em saúde pública, uma vez que a diotofimose representa importante potencial zoonótico.

D. renale pode parasitar diversas regiões anatômicas, incluindo locais raros, como o rim esquerdo. Além disso, o parasito pode ser eliminado pela urina, porém as lesões causadas nos rins devido à destruição do parênquima renal são irreversíveis. Sendo assim, é importante realizar regularmente o acompanhamento clínico do paciente.

Os extratos vegetais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* apresentaram ação antihelmíntica frente aos ovos de *D. renale* com diferentes taxas de inibição de embrionamento. Entre os extratos testados, os óleos essenciais demonstraram maior potencial inibitório que os extratos hidroalcoólicos.

Em relação aos óleos essenciais, os do gênero *Origanum* apresentaram maior eficácia nas concentrações de 0,37% a 3%, destacando-se *O. majorana*. Do mesmo modo, o óleo de *R. officinalis* também apresentou resultados com boa eficácia, sendo as concentrações de 3% e 6% as mais efetivas.

Além disso, os extratos hidroalcoólicos apresentaram ação pouco efetiva frente aos ovos de *D. renale*, sendo as maiores taxas de inibição de embrionamento obtidas nas concentrações de 10% para *O. vulgare*, 5% para *O. majorana*, e 2,5% para *R. officinalis*, destacando este último como o extrato hidroalcoólico de maior efetividade frente aos ovos de *D. renale*.

Nos testes de toxicidade embrionária em ovos de codorna, observou-se que os óleos essenciais apresentaram boa viabilidade, correspondendo a 100% na maioria

das concentrações dos óleos essenciais. Em contrapartida, o controle com tween 80 apresentou 80% como maior viabilidade embrionária nas concentrações de 3% e 6%, sendo estas as menores testadas com o emulsificante.

Na análise cromatográfica dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*, observou-se a presença de diversos compostos químicos nos três óleos analisados, sendo os majoritários o 4-terpineol, o γ -terpineno e o α -terpineno para o gênero *Origanum*, e o cineol, a cânfora e o α -pineno para o gênero *Rosmarinus*.

Referências

- ABDEL-MASSIH, R.M.; ABRAHAM, A. Extracts os *Rosmarinus officinalis*, *Rheum rhaponticum*, and *Origanum majorana* exhibit significant anti-staphylococcal activity. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, n.3, p.819-828, 2014.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia**, v.27, n.6, p.276-285, 2002.
- ALVES, G.C.; SILVA, D.T.; NEVES, M.F. *Diocetophyma renale*: o parasita gigante do rim. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.8, 2007.
- AMARAL, L.C.D.; POLIZER, K.A.; SANT'ANA, T.M. *Diocetophyma renale*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, 2008.
- ANJOS, F.S.; NIEDERLE, P.A.; CALDAS, N.V. Pluriatividade e pesca artesanal: o caso da Colônia Z-3 em Pelotas, RS. **Sociedade em debate**, Pelotas, v.10, n.3, p.9-42, 2004.
- AZAMBUJA, Rosaria Helena Machado. **Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae sobre ovos de *Ancylostoma* spp.** 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- BARNABE, A.S.; FERRAZ, R.B.N.; CARVALHO, V.L.; MENEZES, R.G.; SILVA, L.F.C.; KATAGIRI, S. Prevalência de parasitas intestinais em cães domiciliados na zona oeste da região metropolitana de São Paulo. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, Santos, v.12, n.27, p.28-31, 2015.
- BATISTA, L.C.S.O.; COELHO, C.N.; SILVA, A.F.; CID, Y.P.; MAGALHÃES, V.S.; CHAVES, D.S.A.; COUMENDOUROS, K. *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae): atividade *in vitro* frente a ectoparasitos de importância veterinária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, n.35, p.119-125, 2013.
- BLANK, Daiane Einhardt. **Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae.** 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- BOMFIM, N.S.; NAKASSUGI, L.P.; OLIVEIRA, J.F.P.; KOHIYAMA, C.Y.; MOSSINI, S.A.G.; GRESPAN, R.; NERILO, S.B.; MALLMANN, C.A.; FILHO, B.A.A.; MACHINSKI JR, M. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v.166, p.330-336, 2015.

BRUN, M.V.; BECK, C.A.C.; MARIANO, M.B.; ANTUNES, R.; PIGATTO, J.A.T. Nefrectomia laparoscópica em cão parasitado por *Diectophyma renale* – relato de caso. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Uruguaiana, v.5, n.1, p.145-152, 2002.

CANSI, E.R.; BONORINO, R.; MUSTAFA, V.S.; GUEDES, K.M.R. Multiple parasitismo in wild maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Mammalia: Canidae) em Central Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v.21, p.489-493, 2012.

CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v.3, n.2, p.44-75, 2014.

CAROCCIA, G.H.G.; RODOLPHO, J.A.; OLIVEIRA, S.R.P.; CAMILLO, L.; MAGALHÃES, L.G.; ANIBAL, F.F. Atividade dos compostos curcumina e albendazol contra o nematódeo *Toxocara canis* *in vitro*. **Revista Saúde**, v.7, n.1-2, p.11-16, 2013.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.314-319, 2008.

CAYE, P.; MILECH, V.; LIMA, C.S.; BRAGA, F.V.A.; DURANTE, F.H.; RAPPETI, J.C.S. Relato de caso sobre *Diectophyma renale* na musculatura abdominal. **Xxiv Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2015.

CLEF, M.B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.O.; XAVIER, M.O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P.S.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; SALLIS, E.S.; ANTUNES, T.A.; MATTEI, A.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleos essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, n.27, v.5, p.704-709, 2008a.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14. n.1. p.43-49, 2012.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; SCHUCH, L.F.D.; RODRIGUES, M.R.A.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Sporothrix schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.513-516, 2008b.

COLPO, C.B.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G.; STAINKI, D.R.; CAMARGO, D.G.; COLPO, E.T..B. Ocorrência de *Diectophyma renale* em cães no município de Uruguaiana - RS. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.14, n.2, p.175-180, 2007.

CORADI, P.C.; FIA, R.; RAMIREZ, O.P. Avaliação da qualidade da água superficial dos cursos de água do município de Pelotas-RS, Brasil. **Revista Ambiente e Água**, v.4, n.2, p.46-56, 2009.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.4, p.500-506, 2011.

CORRÊA, Ricardo Monteiro. **Adubação orgânica, intensidade e qualidade de luz no crescimento de plantas, características anatômicas e composição química do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)**. 2008. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

COTTAR, B.H.; DITTRICH, G.; FERREIRA, A.A.; CARVALHO, A.C.P.; ALBERNAZ, V.G.P.; LUZ, M.T.; TASQUETI, U.I. Achados ultrassonográficos de cães parasitados por *Diocotophyma renale* - estudo retrospectivo. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, p.8-11, 2012.

DANILA, A.O.; GATEA, F.; RADU, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. **Chemistry of Natural Compounds**, v.47, n.1, p.22-26, 2011.

DELAMARE, T.O.; SIMON, A.L.H.; SATO, S.E. Dinâmica de uso da terra e alterações na linha de costa lagunar: estudo em uma colônia de pescadores de Pelotas, RS, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v.15, n.2, p.237-248, 2015.

DI STASI, Luiz Claudio; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DIAS DE CASTRO, L.L.; MADRID, I. AGUIAR, C.L.G.; CASTRO, L.M.; CLEFF, M.B.; BERNE, M.E.A.; LEITE, F.P.L. *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.4, p.508-513, 2013.

DOMINGUES, Luciana Ferreira. **Avaliação da atividade carrapaticida e anti-helmíntica do abacaxi (*Ananas comosus* L.) em ruminantes**. 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

EICKE, B.; ZANETTI, K.; REGINALDO, A.S.; SILVA, J.; SILVA, D.K.M.; SANTOS, G.A.; LOPES, B.A.; BRAZ, P.H. *Diocotophyma renale* in a patient living in Mato Grosso do Sul. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.4, p.282-285, 2014.

EMBRAPA. Estação Agroclimatológica de Pelotas. Normais climatológicas mensal/anual. Embrapa Clima Temperado. Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, 2000. Disponível em: <<http://agromet.cpact.embrapa.br/estacao/normais.html>> Acesso em: 23 jan. 2016.

FERREIRA, V.L.; MEDEIROS, F.P.; JULY, J.R.; RASO, T.F. *Dioctophyma renale* in a dog: clinical diagnosis and surgical treatment. **Veterinary Parasitology**, n.168, p.151-155, 2010.

FIGUEIREDO, M.A.P.; SILVA, D.F.; MANRIQUE, W.G.; SOUSA, A.A.R. Ciclo errático de *Dioctophyma renale*: relato de dois casos. **Revista Orinoquia**, Villavicencio, v.17, n.1, p.96-101, 2013.

FONSECA, Anelise Oliveira da Silva. **Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e dermatófitos**. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

FREIRE, J.M.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; ANDRADE, M.A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.2, p.209-214, 2011.

FREIRE, Juliana Mesquita. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus***. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

FURTADO, Silvana Krychak. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GAVANJI, S.; MOHAMMADI, E.; LARKI, B.; BAKHTARI, A. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of some herbal essential oils in comparison with common antibiotics in bioassay condition. **Integrative Medicine Research**, v.3, p.142-152, 2014.

GUTERRES, Karina Affeldt. **Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: resistência a antimicrobianos e Bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

HOLLENBACH, C.B.; BING, R.S.; STEDILE, R.; MELLO, F.P.S.; SCHUCH, T.L.; RODRIGUES, M.R.A.; MELLO, F.B.M.; MELLO, J.R.B. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p. 1-7, 2015.

HOLLENBACH, Clarissa Boemler. **Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar**. 2013. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

ISHZAKI, M.N.; IMBELONIB, A.A.; MUNIZ, J.A.P.C.; SCALERCIO, S.R.R.A.; BENIGNO, R.N.M.; PEREIRA, W.L.A.; LACRETA JR, A.C.C. *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) in the abdominal cavity of a capuchin monkey (*Cebus apella*), Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.173, p.340-342, 2010.

JORGE, N.; VERONEZI, C.M.; RÉ, P.V. Antioxidant effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L) extracts in soybean oil under thermoxidation. **Journal of Food Processing and Preservation**, n.39, p.1399-1406, 2014.

KANO, F.S.; SHIMADA, M.T.; SUZUKI, S.N.; OSAKI, S.C.; MENARIM, B.C.; RUTHES, F.R.V.; LAIDANE FILHO, M.A. Ocorrência de diectofimose em dois cães no município de Guarapuava - PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.1, p.177-180, 2003.

KATAFIGIOTIS, I.; FRAGKIADIS, E.; POURNARAS, C.; NONNI, A.; STRAVODIMOS, K.G. A rare case of a 39 year old male with a parasite called *Diectophyma renale* mimicking renal câncer at the computed tomography of the right kidney. **Parasitology International**, v.62, p.459-460, 2013.

KOMMERS, G.D.; ILHA, M.R.S.; BARROS, C.S.L. Diectofimose em cães: 16 casos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.517-522, 1999.

KUFNER, Danny Elson. **Atividade antioxidante do extrato aquoso de manjerona (*Origanum majorana* L.) em linguiça frescal de frango**. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2010.

LEARY, Steven; UNDERWOOD, Wendy; ANTHONY, Raymond; CARTNER, Samuel; COREY, Douglas; GRANDIN, Temple; GREENACRE, Cheryl; GWALTNEY-BRANT, Sharon; MCCRACKIN, Mary Ann; MEYER, Robert; MILLER, David; SHEARER, Jan; YANONG, Roy. **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 edition**. Versão 2013.0.1. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2013. 102p.

LEITE, L.C.; CIRIO, S.M.; DINIZ, J.M.F.; LUZ, E.; NAVARRO-SILVA, M.A.; SILVA, A.W.C.; LEITE, S.C.; ZADOROSNEI, A.C.; MUSIAT, K.C.; VERONESI, E.M.; PEREIRA, C.C. Lesões anatomopatológicas presentes na infecção por *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) em cães domésticos (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.95-101, 2005.

LI, G.; LIU, C.; LI, F.; ZHOU, M.; LIU, X.; NIU, Y. Fatal bilateral diectophymatosis. **Journal of Parasitology**, v.96, n.6, p.1152-1154, 2010.

LOBO, Raulene Rodrigues. **Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos embrionados de codorna como modelo biológico**. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

LOPES, Sonia Terezinha dos Anjos; BIONDO, Alexander Welker; SANTOS, Andrea Pires. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3ª ed. Santa Maria, 2007. 107p.

MARQUES, L.M.V.; FUNCK, G.D.; KRONING, I.S.; SILVA, W.P.; FIORENTINI, A.M.; RIBEIRO, G.A. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, v.77, p.444-450, 2015.

MARTINO, L.; DE FEO, V.; FORMISANO, C.; MIGNOLA, E.; SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* (Link) ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). **Molecules**, v.14, 2735-2746, 2009.

MASCARENHAS, C.S.; MÜLLER, G. Third-stage larvae of the enoplid nematode *Diectophyme renale* (Goeze, 1782) in the freshwater turtle *Trachemys dorbigni* from southern Brazil. **Journal os Helminthology**, p.1-6, 2014.

MATOS, Caroline Bohnen. **Eficácia de extratos vegetais na desinfecção de superfícies contaminadas com fungos do complexo *Sporothrix***. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

MATOS, Mariana Silva Lopes Santos. **Hábitos de desparasitação em animais de companhia: inquérito a proprietários de cães e gatos, da região de Lisboa, Portugal**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

MEASURES, L.N.; ANDERSON, R.C. Centrarchid fish as paratenic hosts of the giant kidney worm, *Diectophyma renale* (Goeze, 1782), in Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v.21, n.1, p.11-19, 1985.

MEIRELLES, Alessandra. Castração de cães e gatos tem início em Pelotas. Pelotas, 2014. Disponível em: <<http://www.pelotas.rs.gov.br/noticias/detalhe.php?controle=MjAxNC0wNC0yNA==&codnoticia=36548>> Acesso em 22 jan. 2016.

MENESES, R.; OCAZONEZ, R.E.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E.E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.8, n.8, 2009.

MESSIAS, M.C.T.B.; MENEGATTO, M.F.; PRADO, A.C.C.; SANTOS, B.R.; GUIMARÃES, M.F.M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MILECH, V.; PERERA, S.C.; RAMOS, S.; PEDROZO, J.C.S.R.; BRAGA, F.V.A. Achado acidental de dioctofimose durante procedimento cirúrgico em um canino – relato de caso. **21º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2012.

MILECH, V.; RAPPETI, J.C.S.; SILVA, C.C.; BRAGA, F.A.; CAVALCANTE, G.A.; PEREIRA, L.F.; GUIM, T.N.; SALGADO, L.G.; SANCHES, A.R.; GAMBOA, D.; HILLER, J.B.; AÑAÑA, D.C. Primeiro relato de *Diectophyma renale* em gato doméstico no Rio Grande do Sul, Brasil. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Cirurgia do CBCAV e I Congresso Internacional de Cirurgia do CBCAV**, p.299, 2014.

MONTEIRO, S.G.; SALLIS, E.S.V.; STAINKI, D.R. Infecção natural por trinta e quatro helmintos da espécie *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) em um cão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.9, n.1, p.95-99, 2002.

MOREIRA, Gisele Rodrigues; MARTINS, Carla Braga; DEMINICIS, Bruno Borges. **Tópicos especiais em ciência animal III**. 1ª ed. Alegre: CAUFES, 2015. 303p.

NAKAGAWA, T.L.D.R.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; REIS, A.C.F.; YAMAMURA, M.H.; HEADLEY, S.A. Giant kidney worm (*Diectophyma renale*) infections in dogs from Northern Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.366-370, 2007.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v.120, p.308-312, 2010.

OLIVEIRA, R.; MILECH, V.; BRAGA, F.A.; GUIM, T.N.; RAPPETI, J.C.S. *Diectophyma renale* – Queixa principal X Diagnóstico final. **XXIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2015.

OLIVO, C.J.; CARVALHO, N.M.; SILVA, J.H.S.; VOGEL, F.F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; AGNOLIN, C.; MOREL, A.F.; VIAU, L.V. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.406-410, 2008.

PEDRASSANI, D.; HOPPE, E.G.L.; AVANCINI, N.; NASCIMENTO, A.A. Morphology of eggs of *Diectophyma renale* Goeze, 1782 (Nematoda: Diectophymatidae) and influences of temperature on development of first-stage larvae in the eggs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.1, p.15-19, 2009.

PEDRASSANI, D.; WENDT, H.; RENNAU, A.; PEREIRA, S.T.; WENDT, S.B.T. *Diectophyma renale* Goeze, 1782 in a cat with a supernumerary kidney. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.109-117, 2014.

PEDRASSANI, Daniela. **Aspectos morfológicos, imunológicos e epidemiológicos do *Diectophyma renale* em cães no distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina**. 2009. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

PEREIRA, B.J.; GIRARDELLI, G.L.; TRIVILIN, L.O.; LIMA, V.R.; NUNES, L.C.; MARTINS, I.V.F. Ocorrência de diectofimose em cães do município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, Brasil, no período de maio a dezembro de 2014. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.3, p.123-125, 2006.

PERERA, S.C.; CAPELLA, G.A.; PINTO, N.B.; ANANÃ, D.C.; RAPPETI, J.; CLEFF, M.B. Investigação de *Diectophyma renale* em amostras de urina em cães e gatos na cidade de Pelotas. **XVII Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2015.

PESENTI, T.C.; MASCARENHAS, C.S.; KRÜGERL, C.; SINKOC, A.L.; ALBANO, A.P.N.; COIMBRA, M.A.A.; MÜLLER, G. *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) collet-meygret, 1802 (Dioctophymatidae) in *Galictis cuja* (Molina, 1782) (Mustalidae) in Rio Grande do Sul, Brazil. **Neotropical Helminthology**, v.6, n.2, p.301-305, 2012.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, R.; VICH, S.; ÜBEREGGER, E.; CONTE, L.S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.1645-1651, 2002.

RAHAL, S.C.; MAMPRIM, M.J.; OLIVEIRA, H.J.; MESQUITA, L.R.; FARIA, L.G.; TAKAHIRA, R.K.; MATSUBARA, L.M.; AGOSTINHO, F.S. Ultrasonographic, computed tomographic, and operative findings in dogs infested with giant kidney worms (*Diectophyma renale*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.244, n.5, p.555-558, 2014.

RIBEIRO, C.T.; VEROCAI, G.G.; TAVARES, L.E. *Diectophyma renale* (Nematoda, Dioctophymatidae) infection in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v.45, n.1, p.248-250, 2009.

ROCCO, F.S.; SANAVRIA, A.; RIBEIRO, B.C.C.; SOUZA, F.S.; BRITO, M.F.; MORAES, M.C. Relato de casos: dioctofimose em cães provenientes do município de Angra dos Reis, estado do Rio de Janeiro. **Anais da XI Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, v.11, n.2, p.139-140, 2001.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas técnicas. **Materials Research**, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

RUSSO, Z.H.; RIZZARDINI, E.S.; NUÑEZ, C.S.; MONTE, F.N.N. *Diectophyma renale* en caninos (*Canis familiaris*) de Uruguay. **Neotropical Helminthology**, v.8, n.1, p.123-130, 2014.

SANTIN, Rosema. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SECCHI, P.; VALLE, S.F.; BRUN, M.V.; MOTTA, A.C.; RAUSCH, S.F.; MESSINA, S.A.; VIEIRA, M.I.B. Nefrectomia videolaparoscópica para tratamento da dioctofimose em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.1, p.85-89, 2010.

SERPA, Ana Luiza de Araújo. **Relato de caso clínico de *Dioctophyma renale* na UNESP-Botucatu**. 2008. 59 f. Trabalho de conclusão de curso (Pós-graduação em clínica médica e cirúrgica de pequenos animais) – Instituto Quallitas de Pós-Graduação, Rio de Janeiro, 2008.

SILVA, J.P.L.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PEREZ, D.V.; FRANCO, B.D.G.M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, p.136-141, 2010.

SILVA, L.M.N.; PERERA, S.C.; RAUSCH, S.F.; LIMA, C.S.; CLEFF, M.B.; RAPPETI, J. Levantamento de casos de dioctofimose diagnosticados por exame ultrassonográfico em animais de companhia. **XXIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2015.

SILVA, M.S.A.; SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; CARVALHO, A.A.T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-240, 2008.

SILVA, Mayara Gobetti Fernandes da. **Atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjerição (*Origanum basilicum* L.)**. 2011. 70 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, p.35-40, 2002.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.1202-1205, 1996.

SOUSA, A.A.R.; SOUSA, A.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; QUESSADA, A.M.; FREITAS, M.V.M.; MORAES, R.F.N. Dioctofimose em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.3, 2011.

SOUZA, W.M.A.; RAMOS, R.A.; SILVA, J.C.B.; ALVES, L.C.; COELHO, M.C.O.C.C.; MAIA, M.B.S. Atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Lippia sidoides* Cham sobre larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais (família Trichostrongylidae) de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.119-122, 2011.

STAINKI, D.R.; PEDROZO, J.C.S.R.; GASPAR, L.F.J.; ZANETTE, R.A.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. Urethral obstruction by *Dioctophyma renale* in puppy. **Comparative Clinical Pathology**, v.20, p.535-537, 2011.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998. 273p.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, A.; HÉTHELYI, E. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. **Food Research International**, v.38, p.51-57, 2005.

VASCONCELOS, Ana Lourdes Camurça Fernandes. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VEIGA, C.C.P.; AZEVEDO, F.D.; FERNANDES, J.I.; SCOTT, F.B. Ultrassonografia e dopplervelocimetria na avaliação renal de cães parasitados por *Diocotophyma renale* - relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, n.3, p.151-154, 2011.

VELAZQUEZ, M.M.; CRUZ, R.R.; HERRERA, G.C.; FERNANDEZ, J.M.F.; ALVAREZ, A.H.; CERVANTES, E.L. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.48, n.4, p.822-827, 2011.

VENKATRAJIAH, N.; KALBANDE, S.H.; RAO, G.V.N.; REDDY, V.C.; REDDY, S.H.; RAO, P.R.; BABU, K.; KEERTHI, A. Diocotophymatosis renalis in humans: first case report from India. **Journal of the Association of Physicians of India**, v.62, p.70-73, 2014.

XÓCHIHUA, J.A.M.; MEDRANO, W.V.; CORONA, J.C.L.; PABLOS, M.I.P.; CASTILLO, J.A.F. Potencial del orégano como alternativa natural para controlar *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. **Revista Latinoamericana de Recursos Naturales**, v.9, n.1, p.150-154, 2013.

YAMAWAKI, R.A.; MILBRADT, E.L.; COPPOLA, M.P.; RODRIGUES, J.C.Z.; ANDREATTI FILHO, R.L.; PADOVANI, C.R.; OKAMOTO, A.S. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella* Enteritidis after hatch. **Poultry Science**, v.92, p.1560-1563, 2013.

ZAMBON, V.; AGOSTINI, K. Saber popular sobre plantas: um levantamento etnobotânico em áreas rurais de Piracicaba/SP. **Revista Ciência, Tecnologia e Ambiente**, v.1, n.1, p.8-14, 2015.

ZARDO, K.M.; SANTOS, D.R.; BABICSAK, V.R.; BELOTTA, A.F.; OLIVEIRA, H.S.; ESTANISLAU, C.A.; MAMPRIM, M.J.; BRANDÃO, C.V.S. Aspecto ultrassonográfico da diocotofimose renal canina. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, p.57-60, 2012.

Anexos

Anexo A

Comprovante de submissão do Artigo 1 na revista Journal of Helminthology

www.editorialmanager.com/joh/default.aspx

Journal of Helminthology

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Editorial Manager

Role: Author Username: Soliane

Submissions Being Processed for Author Soliane Carra Perera

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
Action Links		Short Communication: First isolation of Diotrophyma renale eggs from environment and the presence in urine of dogs and cats in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil	22 Mar 2016	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Anexo B

Comprovante de submissão do Artigo 2 na revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

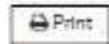
22/03/2016

ScholarOne Manuscript



Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Manuscript ID

ABMVZ-2016-9036

Title

Elimination of *Diocotophyma renale* to urine in canine with diocotophymosis in the left kidney and abdominal cavity - First report in Rio Grande do Sul

Authors

Carra Perera, Soliane
da Silva Rappeti, Josaine
Milech, Vanessa
de Arigony Braga, Fabricio
Albuquerque de Oliveira Cavalcanti, Guilherme
Nakasu, Ceres
Durante, Luana
Vives, Patricia
Brum Cleff, Mariete

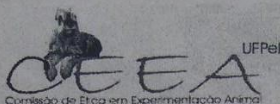
Date Submitted

22-Mar-2016

Author Dashboard

Anexo C

Autorização do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas para o desenvolvimento do Artigo 1



Pelotas, 16 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profa. Marlete Brum Cleff
Departamento de Clínicas Veterinária – Faculdade de Veterinária

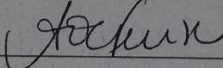
Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Eficácia de extratos vegetais sobre parasitos de animais de companhia”**, processo nº23110.004390/2015-30, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

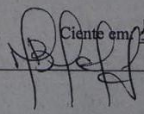
Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4390-2015).

Vigência do Projeto: 16/11/2015 a 15/12/2017
Espécie/Linhagem: Canina/SRD e Felina/SRD
Nº de animais: 200 (150 caninos e 50 felinos)
Idade: Variável
Sexo: Machos e Fêmeas
Origem: Hospital de Clínicas Veterinário – UFPEL e Ambulatório Ceval - UFPEL

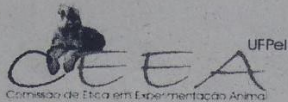


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:  Ciente em 16/11/2015

Anexo D

Autorização do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas para o desenvolvimento do Artigo 3



Pelotas, 26 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profa. Marlete Brum Cleff
Departamento de Clínicas Veterinárias – Faculdade de Veterinária

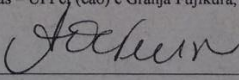
Senhora Professora:

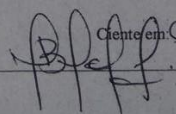
A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Testes com modelos alternativos na avaliação de toxicidade de extratos vegetais**”, processo nº23110.007044/2015-11, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 7044-2015).

Vigência do Projeto: 26/11/2015 a 06/03/2019
Espécie/Linhagem: *Canis lupus familiaris* e *Coturnix coturnix japonica*
Nº de animais: 01 canino e 325 ovos embrionados
Idade: Adulto (cão) e embriões
Sexo: Machos e fêmeas
Origem: Hospital de Clínicas Veterinárias – UFPeI (cão) e Granja Fujikura, Suzano-SP


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:  Ciente em: 04/12/2015