

Ginger oil (*Zingiber officinale*) in the fight against larvae of *Contraecum* sp. that cause human zoonoses

Gilberto Cezar Pavanelli*
Islayla Paloma Nunes Simas**
José Eduardo Gonçalves***
Ana Luiza de Brito Portela Castro**

534

Abstract

Anisakid nematode helminths have great importance in public health, with several reports of human infections caused by larvae of these parasites in several countries of the world. These parasites are common in freshwater and marine fish, with man as an accidental host. Contamination occurs when humans feed on raw fish in the form of sushi, sashimi, and ceviche, which are infected by the larval stages of these nematodes. In Brazilian rivers there are records of these larvae in *Astyanax altiparanae* (lambaris) and *Geophagus brasiliensis* (pearl cichlid), which are species widely distributed in the Neotropical region, especially in Brazil. These diseases are little-known by Brazilian health professionals because their frequency is still low, mainly due to the population's low fish consumption and the difficulties medical professionals have in diagnosing them. The present study aimed to evaluate the larvicidal action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) on larvae of *Contraecum* sp. removed from the visceral cavity of pearl cichlid and lambaris collected from the lake at Ingá Park, Maringá, PR, in the year 2016. Two hundred and thirty-four fish specimens were necropsied, and their larvae were tested to verify the larvicidal effect of ginger. Of these fish, 123 were parasitized, equivalent to 52.5%, of which 181 larvae were collected, all from the coelomic cavity. Ginger essential oil proved to be a promising larvicide, promoting larval death *in vitro*. This larvicidal action was observed at different times and concentrations, showing the efficacy of ginger oil in combating this zoonosis. It is suggested that new natural products be tested for this purpose, as the number of people who consume raw fish in Brazil continues to increase.

Keywords: Zoonoses. Fish. Ginger. Larvicide. Anisakiasis.

INTRODUCTION

Zoonoses are pathologies of great interest in public health, being manifested mainly in tropical and subtropical countries with low socioeconomic population development. Many of these are considered emerging and/or neglected diseases, and do not arouse the attention of renowned pharmaceutical laboratories to develop research aimed at controlling them. Along with zoonoses that are already well-known among health professionals, there has been the manifestation of a set of infirmities in Brazil about which little is known; these are transmitted to humans by the ingestion of improperly-cooked fish. Among these diseases are anisakiasis which are manifested when humans consume

contaminated raw fish present in sushi, sashimi, and ceviche, or even when small fish are eaten alive¹. In Brazil, these diseases are poorly-understood by health professionals because their frequency is still low, due to low fish consumption by the population and the difficulties in diagnosis among medical professionals, since most do not have up-to-date information on the subject. It is difficult for clinical laboratories to diagnose these diseases through fecal examination, since the great majority of the eggs that are found are unidentified by laboratory technicians¹.

Anisakiasis have as their etiological agent the juvenile forms (larvae) of parasites of the family Anisakidae, especially represented

DOI: 10.15343/0104-7809.20184202534547

*Maringá University Center (UniCesumar), Post-graduate Program in Promotion of Health at the Cesumar Institute of Science, Technology, and Innovation, Maringá, PR, Brazil.

**State University of Maringá (UEM), Post-graduate Program in Environmental Biotechnology, Maringá, PR, Brazil.

***Maringá University Center (UniCesumar), Post-graduate Program in Clean Technology and Cesumar Institute of Science, Technology, and Innovation, Maringá, PR, Brazil.

E-mail: pavanelli@nupelia.uem.br

by species of nematodes from the genus *Contracaecum*, *Pseudoterranova*, and *Anisakis*.

Contracaecum sp. larvae can be found in freshwater or saltwater fish, having a heteroxene-type cycle, with storks and seals as permanent hosts sheltering adult parasites. Various types of crustaceans, mollusks, gastropods, coelenterates, and ctenophores harbor L2 larvae and are the first intermediate hosts of these parasites. Different species of fish, such as lambaris, acarás, and catfish, are secondary intermediate hosts, in which the nematodes inhabit the coelomic cavity where they can reach larval stage L3². Humans act as accidental hosts, ingesting these infectious larvae when consuming raw fish.

Symptoms caused by these parasites in the human digestive system include gastrointestinal pain, diarrhea, nausea, vomiting, nasal congestion, cough with yellowish excretion, muscle pain, and fever. Allergic reactions may also occur and may cause anaphylactic shock in immunosuppressed patients, and in more severe cases surgery is recommended to extract the pathogens.

Often, gastric anisakiasis is diagnosed as peptic ulcer, stomach tumor, or polyps, and intestinal anisakiasis can be mistaken for appendicitis or peritonitis. Clinical diagnosis is usually done by endoscopic, radiological, or ultrasound examination. Interpretation of the tests can be difficult because the serum of patients infected with the pathology is closely related to other nematodes such as *Ascaris* and *Toxocara*, among others³.

Unlike in Europe and Asia, where these diseases are frequent, the first scientific articles on this subject describing prophylactic and therapeutic measures to combat these diseases are only now beginning to be published in Brazil. Previously, researchers were only concerned with describing aspects of the parasites' taxonomy and identifying if the fish were zoonotic⁴.

The World Health Organization (WHO) recommends the use of phytotherapeutics by the Brazilian population, especially among the poorest and those who cannot afford industrialized medicines. In fact, phytotherapy is a low-cost alternative therapy with no significant side effects and positive effects on

patients' health⁵. One of the sections which comprises the Brazilian Policy on Medicinal and Phytotherapeutic Plants addresses public policies on health, the environment, and economic and social development being implemented to improve the quality of life of the population. The state of Paraná has contributed to the dissemination of phytotherapy by encouraging the cultivation of medicinal plants in the metropolitan region of Curitiba. Many species are cultivated by European immigrants within cooperative family farming systems as an alternative source of income during the winter. The gross revenue of products reached 12 million reais in 2013. The cultivation of medicinal plants, aromatic plants, and condiments has invaded regions of innovative cultivation due to the demand of industries in Paraná that practically supply 90% of the national consumption⁶.

Ginger, *Zingiber officinale* [Willd.] Roscoe, is a herbaceous, perennial, and rhizomatous plant of the family Zingiberaceae, popularly known in Brazil as gengivre, gengibre, magaratáia, mangaratá, mangarataia, mangaratiá. The plant is native to Southeast Asia and is traditionally used in Asian cuisine and appreciated throughout the world. Its rhizome is sold fresh, dried, sliced, crystallized, powdered, or as essential oil⁷. Due to its various pharmacological qualities, ginger is employed in folk medicine against inflammation, arthritis, and gastrointestinal disorders. Ginger has been evaluated to have anti-inflammatory, anti-hemetic and anti-nausea, anti-mutagenic, anti-ulcer, hypoglycemic, anti-bacterial, and other biological properties⁸.

Studies investigating the use of plants, especially lemon grass (*Cymbopogon winterianus*) and teatree (*Melaleuca alternifolia*), for the control of parasitic nematodes have been described in the literature⁹. Deeper knowledge of the antiparasitic potential of plants should be encouraged and improved for additional control of zoonoses-related parasites¹⁰.

The lack of knowledge with respect to various aspects of the epidemiology of zoonoses transmitted by the consumption of improperly-processed fish in Brazil has impeded that necessary prophylactic and therapeutic actions be taken by sanitary agents. With this in view,

the hypothesis formulated in this research aims to prove that the essential oil of ginger (*Zingiber officinale*) has larvicidal action *in vitro* in L3 larvae of *Contracaecum* parasites of the fish *Astyanax altiparanae* (lambari) and *Geophagus brasilienses* (acará), and agents of anisakiasis in humans. Ginger was selected since it is commonly used as a condiment in the consumption of sushi or sashimi, besides being a natural product and easy to cultivate¹¹.

MATERIAL AND METHODS

Collection of the larvae of the parasites

For the collection of larvae, 234 specimens of fish were necropsied, of which 70 were *Astyanax altiparanae* and 164 were *Geophagus brasilienses*, collected with nets of different mesh openings, in the lake of Ingá Park, Maringá, PR, in the year 2016. After collection, these fish were conditioned in aerated thermal boxes and transported to the Ichthyoparasitology laboratory of State University of Maringá. One hour before the fish were sacrificed for larval collection, a solution of colchicine (0.05%), 1 ml per 100 grams of animal weight was applied intraperitoneally. Each animal was then bathed in anesthetic solution prepared with 5 ml of anesthetic (eugenol) diluted in 100 ml of ethanol. Subsequently, 1 ml of this solution was added to every 1 liter of water. Thereafter, the fish were subjected to tricaine methanesulfonate anesthesia (MS-222) at the concentration prescribed by Normative Resolution (NR) 12 of 2013 - ICMBio, CONCEA.

The animals were only manipulated after not responding to physical stimuli, indicating death by anesthetic overdose. After the parasites were removed, the fish were fixed in commercial alcohol and deposited in the Ichthyology Collection of the State University of Maringá - UEM / NUPELIA as witnesses. The parasites were collected and processed according to the methodology described by Eiras et al.¹² (2010). The larvae were kept in Petri dish, with physiological solution (0.9% NaCl). Taxonomic identification of the parasites was performed according to Moravec¹³ (1998).

Processing of plant material

The rhizomes of *Zingiber officinale* were obtained from Ceasa Maringá, Maringá, PR, and washed in running water to remove soil particles. In addition, 500 g of rhizome were ground in 500 ml of water in a food blender. The material was hydrodistilled for two hours and the oil was pipetted, filtered over Na₂SO₄ and stored at -10 °C.

In vitro assay

Ten L3 larvae of *Contracaecum* sp. were placed in Petri dishes with different concentrations of oil for each treatment, objectifying the observation of larvicidal activities. Six plates were used: five for treatments with ginger essential oil at different concentrations (400, 200, 100, 50, and 25 µg/ml) and one for control with water. The test for larvicidal activity was performed by immersing the larvae in each plate. The exposure time of the larvae to the treatments was 12 h, 24 h, and 32 h, at a temperature between 27 and 30 °C.

The analysis was performed in duplicate. Data from larval counts were analyzed by regression statistics with a dependent binary variable by the Probit model (Isotonized Probit Estimator), which is used to estimate high lethal doses, with the estimation of the median dose. This method is most appropriate for data sets where the variable is a *yes-and-no*, *dead/not dead* unit and by the ANOVA test¹⁴.

RESULTS

Of the 234 fish examined, 123 were parasitized, accounting for 52.5%. In total, 181 larvae were collected, all of which were found in the visceral cavity of the fish (Figure 1).

Larvae of *Contracaecum* sp. extracted from *A. altiparanae* and *G. brasiliensis* were exposed to different concentrations of essential oil of *Zingiber officinale* and monitored after 12 h, 24 h and 32 h (Table 1).

The essential oil content of the *Zingiber officinale* rhizomes was 0.21% for a 2 h hydrodistillation. The difference found in the essential oil content was due to the duration of the extraction process¹⁵. GC/MS analysis of the chemical composition showed 58 compounds

identified in the essential oil, and high citral (~11% Neral/Geraniol) was detected in the essential oil of the rhizomes.

Figure 2 shows the results of the statistical

analysis of essential oil to combat larvae of *Contracaecum* sp. at concentrations tested, with a lethal concentration of 295 µg/ml for Cl_{95} .

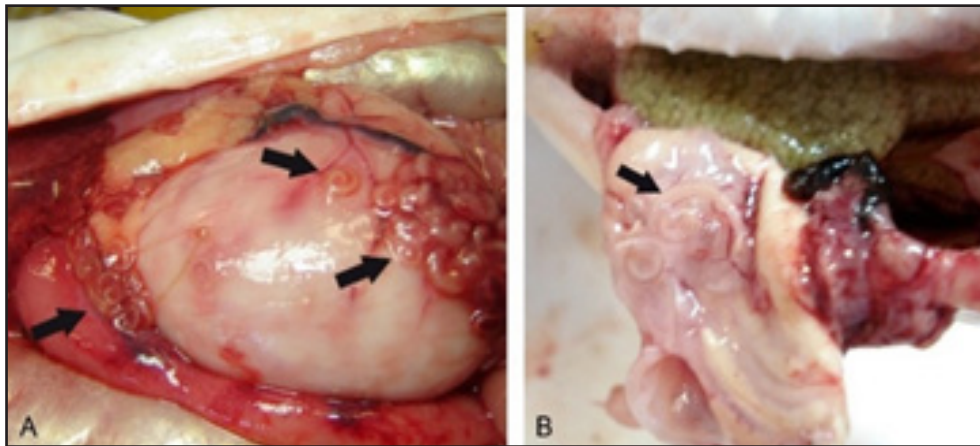


Figure 1 – Larvae of *Contracaecum* sp. encysted in the coelomic cavity of fish collected in March 2016 in Maringá, PR, Brazil. *Astyanax altiparanae* (A) and *Geophagus brasiliensis* (B).

Table 1 – Larvicidal activity of ginger essential oil tested in March 2016 in fish collected in Maringá, PR, Brazil.

Time (h)	Concentration of oil (µg/ml) and Number of dead larvae					
	Control	25	50	100	200	400
12	0	0	0	0	3	5
24	0	1	1	2	10	10
32	0	1	2	3	10	10

*(water + 100 µl DMSO)

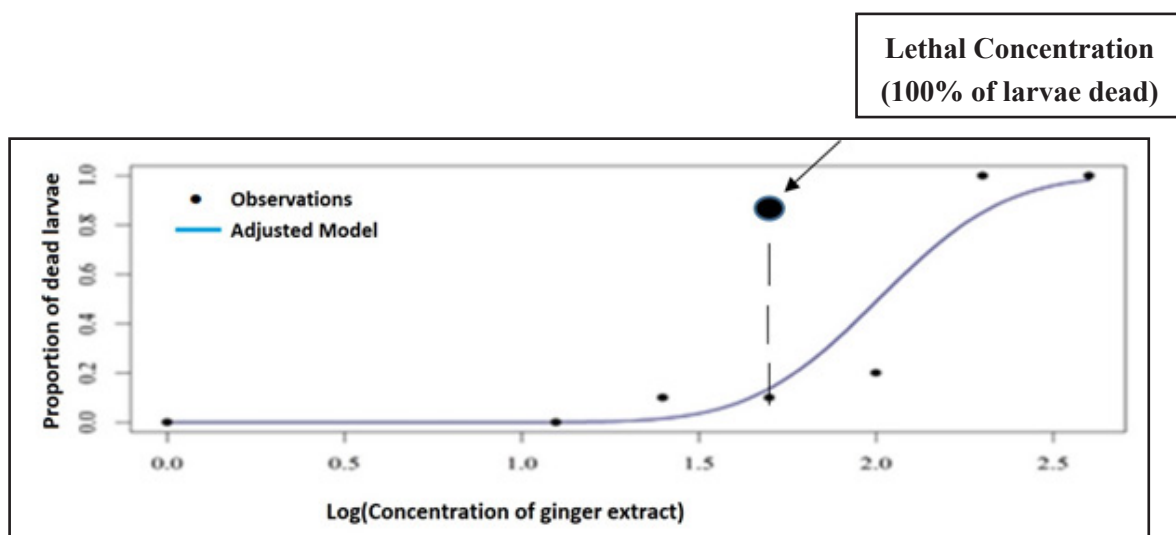


Figure 2 – Proportion of dead L3 *Contracaecum* sp. after 32 h period of exposure at different concentrations of ginger oil in Maringá, PR, Brazil, in March 2016.

DISCUSSION

After exposing the larvae of *Contraecum* sp., as described in Table 1, it was possible to verify a positive effect of the ginger essential oil on the larvae after 12 hours of exposure, since all the larvae were found dead. The oil activity between 24 and 32 hours gave similar results of mortality and revealed its efficiency, demonstrated by the number of dead larvae (DL). After 32 h, the number of dead larvae decreased in treatments with low concentrations (25 µg/ml, 50 µg/ml and 100 µg/ml).

The cultivation of ginger, *Zingiber officinale*, was brought to the coastal region of the State of Paraná by Japanese families about 25 years ago, being today the largest producer of ginger in Brazil (rhizomes *in natura*). About 95% of cultivation is in the coastal region, in the municipalities of Paranaguá, Morretes, Guaraqueçaba, Antonina, and Guaratuba¹⁰.

The ratio of essential oil of the rhizomes used in this work was 0.21% for 2 h of hydrodistillation, being lower than that reported in the literature (between 0.56 and 0.92%) with a hydrodistillation period of 7 h. The rhizomes marketed in Maringá, PR, presented similar composition to that reported by Machado et al.¹⁶ (2003), resembling the ginger produced in Paranaguá in its characteristics.

A high level of citral in the essential oil of the rhizomes indicates that it is a product of high economic value and important for the aroma and fragrance industries. Increased concentration of neral is associated with reduction of geranial and geranyl acetate due to the transformation of geranyl acetate into geranial and, in turn, the conversion of geranial to neral¹⁶.

Concentrations of 400 µg/ml and 200 µg/ml essential oil caused larval mortality to reach 100% more rapidly after 24h. In addition, the concentration of 100 µg/ml was shown to be most effective after 32 h, whereas other concentrations (50 µg/ml and 25 µg/ml) were shown to be less effective for controlling the larvae of *Contraecum* sp. (Table 1).

Similar experiments to this research were developed by Justino et al.⁹ (2009) testing the

larvicidal activity of *Cymbopogon winterianus* (citronella) to combat these same larvae, but the plant showed low activity, and was not recommended as a larvicide.

The anti-helminthic activity of the compounds isolated from *Zingiber officinale* was also tested by Lin et al.¹⁷ (2010) in *Anisakis simplex* larvae. The isolated compounds gingerol and shogaol showed the same effect between 80 and 100% at the concentration of 200 µg/ml in a period ranging from 24 to 72 hours.

According to Hierro et al.¹⁸ (2004), the gingerols act on the parasites, damaging the cellular integument and the digestive tract. The compounds not only cause the death of the parasites but reduce the efficacy of the larvae and their pathogenic effects¹¹. In addition, gingerol also has antitumor, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities¹⁷. Gómez-Rincón et al.¹¹ (2014) revealed the efficacy of gingerol and shogaol after 48h at a concentration of 7-10 µg/ml, with total mortality rate. Similar results were reported by Navarro et al.¹⁹ (2008), with activity against *Anisakis simplex* L3 larvae by monoterpene derived from essential oils (α-pinene, β-pinene, ocimene, mircene, geranyl acetate, and cineol). The test *in vitro* showed that α-pinene, ocimene, and cineol had high larvicidal activity at the concentration of 125 µg/ml after 48 h.

Another similar result was described by Hierro et al.¹⁸ (2004) in which different natural monoterpenes (geraniol, citronellol, citral, carvacrol, cuminaldehyde, and eugenol) were studied *in vitro* against *Anisakis simplex*. The final concentrations were 12.50, 6.25, and 3.12 µg/mL for each product tested. Except for eugenol, all products tested were active at the highest concentration (12.50 µg/mL). Geraniol had its highest lethal effect between 8 and 24 h at 12.50 µg/ml concentration and was only slightly effective at 3.12 µg/ml.

The ginger essential oil that was used in the current study features important compounds like zingiberene, neral, farnesene, sesquiphellandrene, phellandrene, and carveol. These compounds represent the monoterpene and sesquiterpene classes which have effective larvicidal activities. However, these ginger essential oil compounds may have different mechanisms for each organism.

Regarding the results, through statistical analysis of the essential oil of ginger against *Contracaecum* sp. it was evaluated that the concentrations tested were efficient in the lethal concentration of 295 µg/ml for Cl_{95} . Higher concentrations of essential oil were used in the research to evaluate the effect of the compound as a whole, since Thee essential oil and its larvicidal activity were being tested. Figure 1 demonstrates larval activity for 32 h incubation at the concentrations tested.

Regarding the efficiency of the essential oil, there was a significant difference between the

average values in larvae of *Contracaecum* sp. according to the ANOVA test; the value of $F = 7.436364$ ($p < 0.05$). Therefore, from the analyses carried out, it can be concluded that concentration and time of exposure were both important in the larvicidal action of ginger oil on the studied larvae. The data revealed a high toxicity index of *Zingiber officinale* in zoonotic parasites tested in the current trial. The result is relevant because it records the first time essential oil extracted from the rhizomes of *Zingiber officinale* was tested for larvicidal activity in parasites of the genus *Contracaecum*.

CONCLUSION

The use of ginger oil (*Zingiber officinale*) to combat larvae of the parasite *Contracaecum* sp. collected from *Astianax altiparanae* and *Geophagus brasiliensis* fish proved to be effective, causing larval death 12 hours after exposure to the product. Given the increasing

consumption of raw fish by humans, it is important to research other products of plant origin with the objective of using them in the prevention and treatment of parasitic diseases transmitted by sushi, sashimi, and ceviche to humans.

REFERENCES

1. Pavanelli GC, Eiras JC, Yamaguchi MU, Takemoto RC, organizadores. Zoonoses Humanas transmissíveis por peixes no Brasil. Maringá (PR): Unicesumar; 2015.
2. Barros LA, Oliveira RL, Moraes Filho J, Justino CHS, Mateus LAF. Análise do parasitismo por *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp. em cacharas, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) (Pisces: Pimelodidae) provenientes do rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 2009;16(2):58-61.
3. Audicana L, Audicana MT, Fernández de Corres L, Kennedy MW. Cooking and freezing may not protect against allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. Vet. Rec. 1997;140(9): 235.
4. Guerin et al. Intestinal perforation caused by larval *Eustrongylides* – Maryland. Center for Disease Control, Morbidity and Mortality Weekly Report. 1982;31:383-9.
5. Silva CGR, Silva JLL, Andrade M. Fitoterapia como terapêutica alternativa e promoção da saúde. Informe-se em promoção da saúde. 2007; 3(2):15-7.
6. Corrêa Júnior C, Scheffer M. C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. Hortic. Bras. 2014;32(3):376.
7. Negrelle RRB, Elpo ERS, Rücker NGA. Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná. Hortic. Bras. 2005;23(4)1022-28.
8. Dabague ICM, Deschamps C, Mógor AF, Scheer AP, Côcco L. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. Rev. bras. plantas med. 2011;13(1):79-84.
9. Justino S.; S, Medeiro, LD, Vanzeler, MLA, Barros LA. Avaliação da resistência de larvas de *Contracaecum* sp.(nematoda: Anisakidae) a ação da citronela, *Cymbopogon* sp., in natura, administrada como tratamento da anisakiose em coelhos infectados experimentalmente. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 2009;16(1):8-12.
10. Paraná (Estado), Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná - SEAB. Departamento de Economia Rural - DERAL. Área, produção e valor bruto da produção de gengibre no Estado do Paraná, Safra 01/02. Curitiba: SEAB; 2003.
11. Gómez-Rincón C, Langa E, Murillo P, Valero MS, Barbosa C, López V. Activity of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oil against L3 Larvae of *Anisakis simplex*. Bio Med Res Int. 2014:6.
12. Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil. Maringá: Clichetec; 2010.
13. Moravec F. Nematodes of Freshwater Fishes of the Neotropical Region. České Budejovice: California Academy of Sciences; 1998. 464 p.
14. Souza EM, Chaves LM, Muniz JA. Avaliação dos métodos: Probit, Probit Isotonizado e Up and Down em dados de sensibilidade. In: Anais do 19º Sinape - Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, [publicação online] 2010; São Pedro, SP. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística; 2010. [Acesso em 28 maio 2018]. Disponível em <http://www.ime.unicamp.br/sinape/19sinape/node/738>.

15. Maia NB, Bovi AO, Duarte FR. Obtenção e análise do óleo essencial do gengibre: efeito de secagem e processamento. *Bragantia*. 1991;50(1):83-92.
16. Machado GC, et al. Composição química de amostras de gengibre (*Zingiber officinale*) de cultivo convencional e orgânico. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2003; Maringá. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2003.
17. Lin RJ, Chen CY, Lee JD, Lu CM, Chung LY, Yen CM. Larvicidal Constituents of *Zingiber officinale* (Ginger) against *Anisakis simplex*. *Plant. Med.* 2010;76(16):1852-8.
18. Hierro I, Valero A, Pérez P, González P, Cabo MM, Montilla MP, et al. Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine*. 2004;11(1):77-82.
19. Navarro MC, Noguera MA, Romero MC, Montilla MP, González de Selgas JM, Valero A. *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpene derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Exp. Parasitol.* 2008;120(4):295-9.

Óleo de gengibre (*Zingiber officinale*) no combate a larvas de *Contracaecum* sp. causadoras de zoonoses humanas

Gilberto Cezar Pavanelli*
Islayla Paloma Nunes Simas**
José Eduardo Gonçalves***
Ana Luiza de Brito Portela Castro**

Resumo

Os helmintos nematoides anisaquídeos possuem grande importância em saúde pública, havendo vários relatos de infecções humanas causadas pelas larvas desses parasitos em vários países do mundo. Esses parasitos são comuns em peixes de água doce e marinhos, tendo o homem como hospedeiro acidental. A contaminação ocorre quando os seres humanos se alimentam de peixes crus na forma de sushi, sashimi e ceviche, infectados pelos estados larvais desses nematoides. Nos rios brasileiros há registros dessas larvas em *Astyanax altiparanae* (lambaris) e *Geophagus brasiliensis* (acará ou papa-terra), que são espécies amplamente distribuídas na região Neotropical, em especial no Brasil. Essas doenças são pouco conhecidas pelos profissionais da saúde brasileiros, pois sua frequência ainda é pequena, devido ao baixo consumo de peixes pela população e às dificuldades no diagnóstico pela classe médica. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação larvicida do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) em larvas de *Contracaecum* sp. retiradas da cavidade visceral de acarás e lambaris, coletados no lago do Parque do Ingá, Maringá, PR no ano de 2016. Nesse sentido, 234 espécimes de peixes foram necropsiados e suas larvas testadas para verificar o efeito larvicida do gengibre. Destes peixes, 123 estavam parasitados, equivalendo a 52,5%, dos quais coletou-se 181 larvas, todas na cavidade celomática. Essas substâncias mostraram-se promissoras larvicidas, promovendo a morte das larvas no teste *in vitro* do óleo essencial do gengibre. Essa ação larvicida foi observada em tempos e concentrações diferentes, mostrando a eficácia do óleo de gengibre no combate a essa zoonose. Sugere-se que novos produtos naturais sejam testados com esse objetivo, pois é crescente o aumento no número de pessoas que passaram a se alimentar de peixes crus no Brasil.

Palavras-chave: Zoonoses. Peixes. Gengibre. Larvicida. Anisaquíase.

INTRODUÇÃO

As zoonoses são patologias de grande interesse em saúde pública, se manifestando principalmente em países tropicais e subtropicais, aliadas a baixo desenvolvimento socioeconômico populacional. Muitas dessas doenças são consideradas emergentes e/ou negligenciadas, não despertando o interesse de laboratórios farmacêuticos de renome para desenvolverem pesquisas visando seu controle. Associadas a essas zoonoses já devidamente conhecidas pelos profissionais da saúde, mais recentemente verificou-se, no Brasil, a manifestação de um conjunto de enfermidades ainda pouco conhecidas e que são transmitidas ao homem pela ingestão de peixes não cozidos adequadamente. Entre essas doenças, destacam-se as anisaquíases,

que se manifestam quando os seres humanos se alimentam de peixes crus contaminados e preparados na forma de sushi, sashimi e ceviche, ou até mesmo se pequenos peixes forem ingeridos vivos¹. No Brasil, essas doenças são pouco conhecidas pelos profissionais da saúde, pois sua frequência ainda é baixa, devido ao baixo consumo de peixes pela população e às dificuldades no diagnóstico pela classe médica, pois a maioria não possui informações atualizadas sobre o assunto. Os próprios laboratórios de análises clínicas têm dificuldades em efetuar o diagnóstico dessas doenças, via exame de fezes, pois a grande maioria dos ovos que são encontrados são desconhecidos pelos técnicos laboratoriais¹.

As anisaquíases possuem como agentes

DOI: 10.15343/0104-7809.20184202534547

* Centro Universitário de Maringá (UniCesumar), Programa de Pós-graduação em Promoção da Saúde e Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação, Maringá - PR, Brasil.

** Universidade Estadual de Maringá (UEM), Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental, Maringá - PR, Brasil.

*** Centro Universitário de Maringá (UniCesumar), Programa de Pós-graduação em Tecnologia Limpas e Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação, Maringá - PR, Brasil.

E-mail: pavanelli@nupelia.uem.br

etiológicos as formas juvenis (larvais) de parasitas da família Anisakidae, representados em especial pelas espécies de nematoides dos gêneros *Contracaecum*, *Pseudoterranova* e *Anisakis*.

As espécies de larvas de *Contracaecum* podem ser encontradas em peixes de água doce ou salgada, com ciclo do tipo heteroxeno, tendo as cegonhas e focas como hospedeiros definitivos, abrigando os parasitas adultos. Vários tipos de crustáceos, moluscos, gastrópodes, celenterados e ctenóforos abrigam as larvas L2 e são os primeiros hospedeiros intermediários desses parasitas. Peixes de diferentes espécies, como os lambaris, acarás e bagres, são hospedeiros intermediários secundários nos quais os nematoides habitam a cavidade celomática, onde podem atingir a fase larval L3². Os seres humanos atuam como hospedeiros acidentais, ingerindo essas larvas infectantes quando se alimentam de peixes crus.

Os sintomas causados por esses parasitas no sistema digestório humano incluem dor gastrointestinal, diarreia, náuseas, vômitos, congestão nasal, tosse com excreção amarelada, dor nos músculos e febre. Reações alérgicas também podem ocorrer, podendo provocar choques anafiláticos em pacientes imunodeprimidos, sendo que nos casos mais graves a cirurgia é recomendada para extração dos patógenos. Muitas vezes a anisaquíase gástrica é diagnosticada como úlcera péptica, tumor de estômago ou presença de pólipos no estômago e a anisaquíse intestinal pode ser confundida com apendicite ou peritonite. O diagnóstico clínico é geralmente feito através da realização de endoscopia, ou radiológica ou exame de ultrassom. A interpretação dos testes pode ser difícil porque o soro de pacientes infectados com a patologia estão intimamente relacionadas a outros nematoides como *Ascaris* e *Toxocara*, entre outros³.

Diferentemente do que ocorre na Europa e Ásia, onde essas doenças são frequentes, no Brasil agora é que estão sendo publicados os primeiros artigos científicos sobre esse tema, onde se descreve medidas profiláticas e terapêuticas para combater essas enfermidades. Anteriormente os pesquisadores se preocupavam apenas em descrever os aspectos

taxionômicos dos parasitas e identificar se os peixes eram zoonóticos⁴.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o uso de fitoterápicos pelas populações brasileiras, especialmente as mais pobres e com baixo poder de compra de medicamentos industrializados. De fato, a fitoterapia é uma terapia alternativa de baixo custo, sem efeitos colaterais importantes e com reflexos positivos na saúde dos pacientes⁵. A Política Brasileira de Plantas Medicinais e Fitoterápicas compreende uma seção onde se implementam políticas públicas em saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social para melhorar a qualidade de vida da população. O estado do Paraná tem contribuído para a disseminação da fitoterapia por meio do incentivo ao cultivo de plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba. Muitas espécies são cultivadas por imigrantes europeus dentro de sistemas agrícolas familiares cooperativos como uma alternativa para a obtenção de renda durante o inverno. A receita bruta de produtos chegou a 12 milhões de reais em 2013. O cultivo de plantas medicinais, aromáticas e de condimentos tem invadido regiões de cultura inovadoras devido às demandas de indústrias paranaenses que praticamente atendem a 90% do consumo nacional⁶.

O gengibre, *Zingiber officinale* [Willd.] Roscoe, é uma planta herbácea, perene e rizomatosa da família Zingiberaceae, popularmente conhecida no Brasil como gengivre, gengibre, magaratáia, mangaratá, mangarataia, mangaratiá. A planta é natural do sudeste da Ásia e é tradicionalmente usada na culinária asiática e apreciada em todo o mundo. Seu rizoma é vendido fresco, seco, fatiado ou como conserva, cristalizado, como um pó ou óleo essencial⁷. Devido às suas diversas qualidades farmacológicas, o gengibre é empregado na medicina popular contra inflamações, artrite e distúrbios gastrointestinais. As atividades biológicas de gengibre têm sido avaliadas como anti-inflamatórias, anti-hemáticas e anti-náuseas, anti-mutagênicas, anti-úlceras, hipoglicemiantes, anti-bacterianas e outras⁸.

Estudos utilizando o uso de plantas têm sido descritos na literatura para o controle de

nematoides parasitas, destacando-se o capim-limão (*Cymbopogon winterianus*) e o tea tree (*Melaleuca alternifolia*)⁹. O conhecimento aprofundado do potencial antiparasitário das plantas deve ser incentivado e aprimorado para o controle adicional de parasitas relacionados a zoonoses¹⁰.

O desconhecimento dos vários aspectos da epidemiologia das zoonoses transmitidas pelo consumo de peixes indevidamente processado no Brasil tem dificultado as necessárias ações profiláticas e terapêuticas a serem utilizadas pelos agentes sanitários. Nesse sentido, a hipótese formulada nessa pesquisa objetiva comprovar que o óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*), possui ação larvicida *in vitro* em larvas L3 de *Contracaecum* parasitas dos peixes *Astyanax altiparanae* (lambari) e *Geophagus brasilienses* (acará), e agentes das anisakiases nos seres humanos. O gengibre foi selecionado devido ao fato de que geralmente é empregado como condimento no consumo do sushi ou sashimi, além de ser um produto natural e de fácil cultivo¹¹.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das larvas dos parasitas

Para a coleta das larvas, foram necropsiados 234 espécimes de peixes, sendo 70 de *Astyanax altiparanae* e 164 de *Geophagus brasilienses*, coletados com redes de diferentes aberturas de malha, no lago do Parque do Ingá, Maringá, PR, no ano de 2016. Após coletados, estes peixes foram acondicionados em caixas térmicas arejadas e transportados ao laboratório de Ictioparasitologia da Universidade Estadual de Maringá. Uma hora antes dos peixes serem sacrificados para a coleta das larvas, aplicouse, por via intraperitoneal uma solução de colchicina (0,05%), 1 ml para cada 100 gramas de peso do animal. A seguir, cada animal foi banhado em solução anestésica preparada com 5 ml de anestésico (eugenol) diluído em 100 ml de etanol. Posteriormente 1 ml desta solução foi adicionado a cada 1 litro de água. A partir desse momento os peixes foram submetidos a anestesia com sulfonato metano de triclaína (MS -222) na concentração conforme prescrito

pela Resolução Normativa (RN) 12 de 2013 – ICMBio, CONCEA.

O animal só foi manipulado depois de não responder a estímulos físicos, indicando a morte por overdose de anestésico. Após a retirada dos parasitos, os peixes foram fixados em álcool comercial e depositados na Coleção Ictiológica da Universidade Estadual de Maringá - UEM / NUPELIA como testemunhas.

Os parasitos foram coletados e processados conforme a metodologia descrita por Eiras et al.¹² (2010). As larvas encontradas foram mantidas em placa de Petri, com solução fisiológica (0,9 % NaCl). A identificação taxonômica dos parasitos foi realizada segundo Moravec¹³ (1998).

Processamento do material vegetal

Os rizomas de *Zingiber officinale* foram obtidos da Ceasa Maringá, Maringá, PR, sendo lavados em água corrente para a retirada das partículas do solo. Além disso, 500 g de rizoma foram moídas em 500 ml de água, em um misturador de alimentos. O material foi hidrodestilado por duas horas e o óleo foi removido com uma pipeta, filtrado em Na₂SO₄ e armazenado a -10°C.

Ensaio *in vitro*

Dez larvas L3 de *Contracaecum* sp. foram colocados em placas de Petri com diferentes concentrações de óleo para cada tratamento, objetivando a observação das atividades larvicidas. Foram utilizadas seis placas, sendo cinco para tratamentos com óleo essencial de gengibre nas concentrações (µg / ml: 400, 200, 100, 50, 25) e uma para controle, com água. Além disso, o teste para a atividade larvicida foi realizado por imersão das larvas em cada placa. O tempo de exposição das larvas aos tratamentos foi de 12h, 24h e 32h, a uma temperatura entre 27° e 30° C.

As análises foram realizadas em duplicata. Os dados de contagem das larvas foram analisados por estatística de regressão com variável binária dependente pelo modelo de Probit (Estimador probit isotonzado), que é usado para a estimação das doses letais altas, com a estimação da dose mediana. Esse

método é o mais apropriado para conjuntos de dados em que a variável é uma unidade *sim-e-não*, *morta-viva* e pelo teste ANOVA¹⁴.

As análises foram realizadas em duplicata. Os dados de contagem das larvas foram analisados por estatística de regressão com variável binária dependente pelo modelo de

Probit (Estimador probit isotonzado), que é usado para a estimação das doses letais altas e com a estimação da dose mediana.

Esse método é o mais apropriado para conjuntos de dados em que a variável é uma unidade *sim-e-não*, *morta-viva* e pelo teste ANOVA¹⁴.

RESULTADOS

Dos 234 peixes examinados, 123 estavam parasitados, representando 52,5%. No total foram coletadas 181 larvas, sendo que todas foram encontradas na cavidade visceral dos peixes (Figura 1). As larvas de *Contracaecum* sp extraídas de *A. altiparanae* e *G. brasiliensis* foram expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Zingiber officinale* e monitoradas após 12h, 24h e 32h (Tabela 1).

A taxa de óleo essencial dos rizomas de *Zingiber officinale* foi de 0,21% para uma

hidrodestilação de 2 h. A diferença encontrada na taxa do óleo essencial ocorreu devido ao tempo para o processo de extração¹⁵. Análises por CG/EM da composição química mostraram 58 compostos identificados no óleo essencial e alta taxa de citral (~ 11% - Neral / Geranial) foi detectada no óleo essencial dos rizomas.

A Figura 2 mostra os resultados da análise estatística do óleo essencial no combate as larvas de *Contracaecum* sp, em concentrações testadas com uma concentração letal.

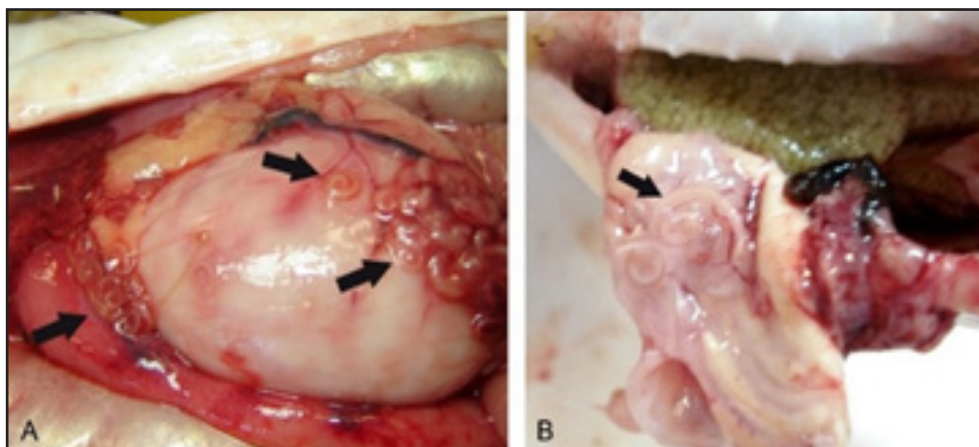


Figura 1 – Larvas de *Contracaecum* sp. encistadas na cavidade celomática de peixes coletados em março de 2016 em Maringá, PR, Brasil. *Astyanax altiparanae* (A) e *Geophagus brasiliensis* (B).

Tabela 1 – Atividade larvicida do óleo essencial de gengibre testado em março de 2016 em peixes coletados em Maringá, PR, Brasil.

Tempo (h)	Concentração do óleo (µg/ml) e Número de larvas mortas					
	Control	25	50	100	200	400
12	0	0	0	0	3	5
24	0	1	1	2	10	10
32	0	1	2	3	10	10

*(water+100 µl DMSO)

Tempo (h) Concentração de óleo (µg / ml) e Número de larvas mortas

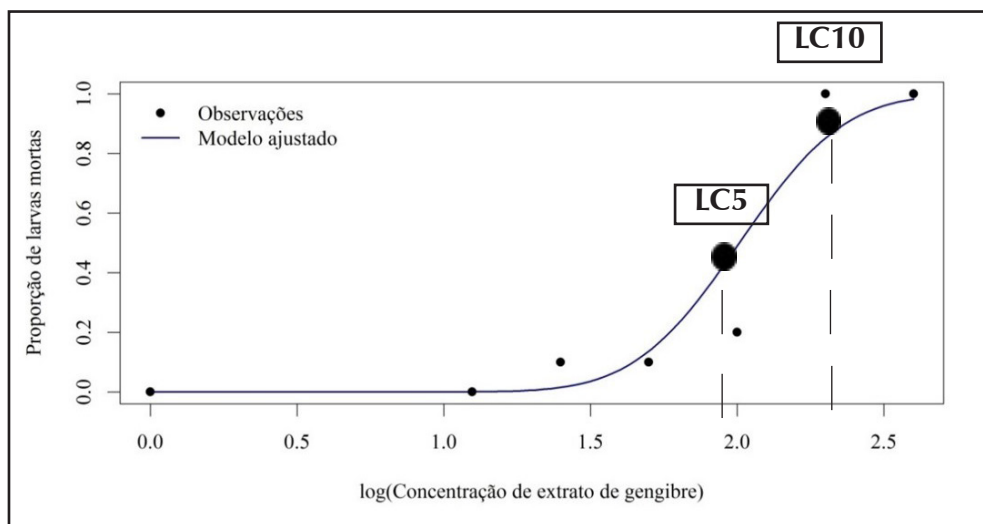


Figura 2 – Figura 2 - Proporção de L3 de *Contraecum* sp. por tempo de exposição de 12 até 32h, em diferentes concentrações de óleo de gengibre em Maringá, PR, Brasil, em março de 2016.

DISCUSSÃO

Após a exposição das larvas de *Contraecum* sp., conforme descrito na Tabela 1, foi possível verificar um efeito positivo do óleo essencial de gengibre sobre as larvas, após 12 horas de exposição, já que todas as larvas foram encontradas mortas. A atividade de óleo entre 24 e 32 horas proporcionou resultados semelhantes de mortalidade e revelou sua eficiência demonstrada pelo número de larvas mortas (DL). Após 32h, o número de larvas mortas diminuiu nos tratamentos com baixas concentrações (25 µg / ml, 50 µg / ml e 100 µg / ml).

O cultivo de gengibre, *Zingiber officinale* foi trazido para a região litorânea do Estado do Paraná por famílias japonesas há cerca de 25 anos, sendo hoje o maior produtor de gengibre do Brasil (rizomas *in natura*). Cerca de 95% do cultivo se concentra na região costeira, nos municípios de Paranaguá, Morretes, Guaraqueçaba, Antonina e Guaratuba¹⁰.

A taxa de óleo essencial dos rizomas utilizado neste trabalho foi de 0,21% para 2 h de hidrodestilação, sendo menor que a referida na literatura, entre 0,56 e 0,92%, com um período de hidrodestilação de 7 h. Os rizomas comercializados em Maringá, PR apresentaram

composição semelhante à relatada por Machado et al.¹⁶ (2003), cuja característica se assemelha ao gengibre produzido em Paranaguá.

Uma alta taxa de citral no óleo essencial dos rizomas indica ser um produto de alto valor econômico e importantes para as indústrias de aroma e fragrância. O aumento na concentração geral está associado à diminuição de geranial e do acetato de geranila devido à transformação do acetato de geranila em geranial e por sua vez a conversão de geranial em neral¹⁶.

Concentrações de óleo essencial 400 µg / ml e 200 µg / ml afetaram mais rapidamente a mortalidade das larvas a 100% após 24h. Além disso, a concentração de 100 µg / ml teve o melhor efeito após 32h, enquanto, nas outras concentrações (50 µg / ml e 25 µg / ml), a eficácia foi baixa para controle das larvas de *Contraecum* sp. (Tabela 1).

Experimentos semelhantes ao realizado nessa pesquisa foi desenvolvido por Justino et al.⁹ (2009), testando a atividade larvicida de *Cymbopogon winterianus* (citronela) no combate a essas mesmas larvas, porém houve baixa atividade da planta, não sendo recomendada como larvicida.

A atividade anti-helmintica dos compostos isolados de *Zingiber officinale* também foi testada por Lin et al.¹⁷ (2010) em larvas de *Anisakis simplex*. Os compostos isolados gingerol e shogaol demonstraram o mesmo efeito entre 80 e 100% na concentração de 200 µg / ml em um período que variou de 24 a 72h.

Segundo Hierro et al.¹⁸ (2004), os gingeróis atuam sobre os parasitas, danificando o tegumento celular e o trato digestivo. Os compostos não causam apenas a morte dos parasitas, mas reduzem a eficácia das larvas e seus efeitos patogênicos¹¹. Além disso, o gingerol também apresenta atividades antitumoral, anti-inflamatória e anti-oxidação¹⁷. Gómez-Rincón et al.¹¹ (2014) revelaram a eficácia do gingerol e shogaol após 48h, na concentração de 7 - 10 µg // ml, com taxa de mortalidade total. Resultados semelhantes foram relatados por Navarro et al.¹⁹ (2008), com atividade contra larvas L3 de *Anisakis simplex* pelo monoterpene derivado de óleos essenciais (a - pineno, B - pineno, ocimeno, mircene, acetato de geraniol e cineol). O teste *in vitro* revelou que a-pinene, ocimeno e cineol tiveram grande atividade larvicida na concentração de 125 µg / ml após 48 h.

Outro resultado semelhante foi descrito por Hierro et al.¹⁸ (2004) em que diferentes monoterpenos naturais (geraniol, citronelol, citral, carvacrol, cuminaldeído e eugenol) foram estudados *in vitro* contra *Anisakis simplex*. As concentrações finais foram de 12,50, 6,25 e 3,12 µg / mL para cada produto testado. Com exceção do eugenol, todos os produtos testados estavam ativos na concentração mais alta (12,50 µg / mL). Geraniol teve seu maior efeito letal entre 8 e 24 h a 12,50 µg / ml de

CONCLUSÃO

O uso do óleo de gengibre (*Zingiber officinale*) para combater as larvas do parasita *Contracaecum* sp. coletado dos peixes *Astyanax altiparanae* e *Geophagus brasiliensis* mostrou-se eficaz, causando a morte das larvas 12 horas após a exposição ao produto. Com a crescente utilização de

concentração e apenas ligeiramente eficiente a 3,12 µg / ml.

O óleo essencial de gengibre que foi usado no estudo atual, apresenta compostos importantes como zingibereno, neral, farneseno, sesquiphellandrene, phellandrene e carveol. Esses compostos representam as classes monoterpene e sesquiterpene com atividades larvicidas eficazes. No entanto, estes compostos do óleo essencial de gengibre podem ter mecanismos diferentes para cada organismo.

Quanto aos resultados a análise estatística do óleo essencial de gengibre contra *Contracaecum* sp, avaliou-se que as concentrações testadas foram eficientes na concentração letal de 295 µg // ml para CI95. Maiores concentrações de óleo essencial foram empregadas na pesquisa para avaliar o efeito do composto em sua totalidade, desde que a OE e sua atividade larvicida foram testadas. A figura 1 demonstra a atividade larval durante 32 h de incubação nas concentrações testadas.

Com relação à eficiência do óleo essencial, houve diferença significativa entre os valores médios em larvas de *Contracaecum* sp. segundo o teste ANOVA, sendo o valor de F = 7, 436364; p < 0,05). Portanto, a partir das análises realizadas pode-se concluir que tanto as concentrações quanto o tempo de exposição foram importantes na ação larvicida do óleo de gengibre sobre as larvas em estudo.

Os dados revelaram haver alto índice de toxicidade de *Zingiber officinale* em parasitas zoonóticos testados no ensaio atual. O resultado é relevante, pois registra pela primeira vez um teste de atividade larvicida do óleo essencial extraído dos rizomas de *Zingiber officinale* em parasitas do gênero *Contracaecum*.

peixes crus sendo utilizados na alimentação humana, é importante que outros produtos de origem vegetal sejam pesquisados com o objetivo de serem utilizados na prevenção e tratamento de doenças parasitárias transmitidas por sushi, sashimi e ceviche para o homem.

REFERÊNCIAS

1. Pavanelli GC, Eiras JC, Yamaguchi MU, Takemoto RC, organizadores. Zoonoses Humanas transmissíveis por peixes no Brasil. Maringá (PR): Unicesumar; 2015.
2. Barros LA, Oliveira RL, Moraes Filho J, Justino CHS, Mateus LAF. Análise do parasitismo por *Contracaecum* sp. e *Eustrongylides* sp. em cacharas, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) (Pisces: Pimelodidae) provenientes do rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 2009;16(2):58-61.
3. Audicana L, Audicana MT, Fernández de Corres L, Kennedy MW. Cooking and freezing may not protect against allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. Vet. Rec. 1997;140(9): 235.
4. Guerin et al. Intestinal perforation caused by larval *Eustrongylides* – Maryland. Center for Disease Control, Morbidity and Mortality Weekly Report. 1982;31:383-9.
5. Silva CGR, Silva JLL, Andrade M. Fitoterapia como terapêutica alternativa e promoção da saúde. Informe-se em promoção da saúde. 2007; 3(2):15-7.
6. Corrêa Júnior C, Scheffer M. C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. Hortic. Bras. 2014;32(3):376.
7. Negrelle RRB, Elpo ERS, Rücker NGA. Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná. Hortic. Bras. 2005;23(4):1022-28.
8. Dabague ICM, Deschamps C, Mógor AF, Scheer AP, Côcco L. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. Rev. bras. plantas med. 2011;13(1):79-84.
9. Justino S.; S, Medeiro, LD, Vanzeler, MLA, Barros LA. Avaliação da resistência de larvas de *Contracaecum* sp.(nematoda: Anisakidae) a ação da citronela, *Cymbopogon* sp., in natura, administrada como tratamento da anisakiose em coelhos infectados experimentalmente. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 2009;16(1):8-12.
10. Paraná (Estado), Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná - SEAB. Departamento de Economia Rural - DERAL. Área, produção e valor bruto da produção de gengibre no Estado do Paraná, Safra 01/02. Curitiba: SEAB; 2003.
11. Gómez-Rincón C, Langa E, Murillo P, Valero MS, Barbosa C, López V. Activity of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oil against L3 Larvae of *Anisakis simplex*. Bio Med Res Int. 2014:6.
12. Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil. Maringá: Clichetec; 2010.
13. Moravec F. Nematodes of Freshwater Fishes of the Neotropical Region. České Budejovice: California Academy of Sciences; 1998. 464 p.
14. Souza EM, Chaves LM, Muniz JA. Avaliação dos métodos: Probit, Probit Isotonizado e Up and Down em dados de sensibilidade. In: Anais do 19º Sinape - Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, [publicação online] 2010; São Pedro, SP. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística; 2010. [Acesso em 28 maio 2018]. Disponível em <http://www.ime.unicamp.br/sinape/19sinape/node/738>.
15. Maia NB, Bovi AO, Duarte FR. Obtenção e análise do óleo essencial do gengibre: efeito de secagem e processamento. Bragantia. 1991;50(1):83-92.
16. Machado GC, et al. Composição química de amostras de gengibre (*Zingiber officinale*) de cultivo convencional e orgânico. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2003; Maringá. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2003.
17. Lin RJ, Chen CY, Lee JD, Lu CM, Chung LY, Yen CM. Larvicidal Constituents of *Zingiber officinale* (Ginger) against *Anisakis simplex*. Plant. Med. 2010;76(16):1852-8.
18. Hierro I, Valero A, Pérez P, González P, Cabo MM, Montilla MP, et al. Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. Phytomedicine. 2004;11(1):77-82.
19. Navarro MC, Noguera MA, Romero MC, Montilla MP, González de Selgas JM, Valero A. *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpene derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. Exp. Parasitol. 2008;120(4):295-9.