

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS VERMELHA PARA O TRATAMENTO *IN VITRO* DE *TOXOCARA CANIS*.

MARINA CARDOSO DE FREITAS¹; ÂNGELA SENA-LOPES²; RODRIGO BARROS PINHO³; RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES⁴; SIBELE BORSUK⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – marinacardosodfreitas@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – angelasena@ymail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodrigobpinho@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – raquelneves@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma zoonose causada por larvas de *Toxocara canis* e, menos frequentemente, por *T. cati*. O verme adulto vive no intestino delgado de hospedeiros definitivos (gatos e cães), onde produz ovos que chegam até o meio externo através das fezes. Os ovos ainda não são embrionados quando recém eliminados com as fezes no ambiente. Sobre temperatura e umidade ideais, esses ovos se tornam embrionados, que são infecciosos para ambos os hospedeiros definitivos e paratênicos (KYEI, 2015).

Os humanos podem se infectar após a ingestão dos ovos embrionados, que irão eclodir no intestino delgado, liberando as larvas que irão atravessar a parede intestinal e migrar para diferentes órgãos, incluindo o fígado e os pulmões, causando febre, hepatoesplenomegalia e disfunção respiratória, como tosse, sibilância e obstrução do fluxo de ar (GRECCO, 2015). As infecções humanas por *Toxocara* spp. são normalmente assintomáticas, dependendo de múltiplos fatores, incluindo órgãos afetados e do padrão de migração das larvas (FU, 2014).

As drogas usadas para tratar a Toxocaríase visceral têm eficácia limitada, como dietilcarbamazina e tiabendazol, com baixa tolerabilidade e a necessidade de uso prolongado (PAWLOWSKI, 2001). Além disso, a utilização destes fármacos para o tratamento de outros helmintos pode conduzir a resistência aos fármacos (GEERTS AND GRYSSELS, 2000). Assim, novas drogas para o tratamento dessa helmintose se tornam necessárias (OTHMAN, 2012).

Estudos revelaram diversas atividades biológicas da própolis, como: atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, entre outros. Foram realizados também estudos químicos, incluindo estudos sobre os óleos essenciais e voláteis de própolis (BANKOVA, 2014). Atualmente, no Brasil a própolis pode ser classificada em 13 tipos diferentes, de acordo com as suas propriedades físico-químicas e da área geográfica onde foi encontrada. Dentro dessa classificação, encontra-se a própolis vermelha, que é encontrada no nordeste do país, e vem sendo evidenciada por muitos autores por apresentar uma grande capacidade antimicrobiana e antitumoral (MACHADO, 2016).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade larvicida *in vitro* do óleo essencial de própolis vermelha brasileira (OEPV) em larvas de *Toxocara canis*.

2. METODOLOGIA

Ovos de *Toxocara* sp. foram coletados diretamente das tubas uterinas dos parasitos adultos fêmeas, obtidos após o tratamento de cães com pamoato de pirantel (15 mg / kg). Depois disso, os ovos foram incubados em formalina a 2% solução a 28°C durante 30 dias. A seguir foi realizada extração das larvas L3 conforme De Savigny (1975) sendo estas cultivadas em meio RPMI-1640 a 37°C (suplementado com HEPES 25 mM, glicose a 1%, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100µg/mL e fungizona 50µg/mL) em estufa com 5% de CO₂.

Para a avaliação da atividade larvicida, foram utilizadas placas de microcultivo de 96 poços, contendo 100 larvas por cavidade em RPMI – 1640 e acrescentados do óleo essencial de própolis vermelha brasileira (OEPV) em DMSO, nas concentrações de 600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL, 75 µg/mL, 37,5 µg/mL e 18,75 µg/mL. Foram utilizados dois controles, um deles com larvas sem tratamento como controle positivo e outro com larvas mortas por choque térmico, como controle negativo.

Em todas as cavidades da placa foi adicionado o corante Trypan blue 0,4%, como marcador de viabilidade celular, e também para avaliação da morfologia, a análise das larvas foi feita utilizando microscópio óptico, sendo consideradas vivas aquelas com ausência de coloração pelo trypan blue. O experimento foi realizado em triplicata e os dados obtidos submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Além disso, foi avaliada a atividade larvicida em termos de motilidade relativa (RM) conforme descrito por Reis et al. (2010). A mobilidade das larvas foi examinada sob um microscópio invertido e a pontuação correspondente para um movimento específico foi atribuído a cada larva. O índice de mobilidade (MI) foi calculado usando a Eq. (1) e a partir destes valores, RM é calculada usando a Eq. (2). A mortalidade das larvas foi calculada como o número de larvas que recebeu pontuação 0, dividido pelo número total de larvas em cada cavidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a concentração de 600 µg/ml apresentou 100% de atividade larvicida, não apresentando diferença significativa quando comparada ao controle positivo, ou seja, a taxa de mortalidade das larvas foi equivalente ao controle positivo (larvas mortas por choque térmico), e a concentração de 300 µg/ml por um período de 48h. No entanto atividade larvicida na concentração de 300 µg/ml apresentou diferença significativa quando comparada ao controle positivo. Ambas concentrações apresentaram diferença significativa quando comparada as demais concentrações (Figura 1).

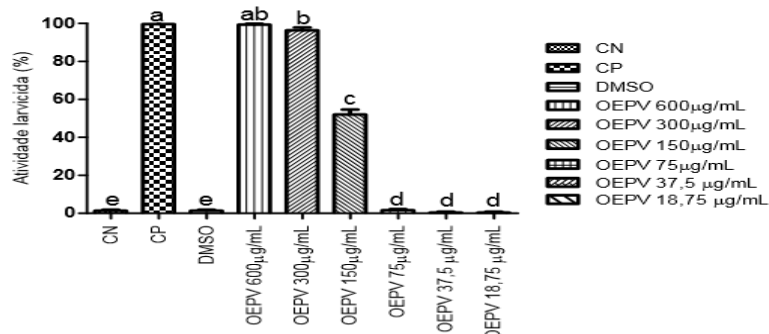


FIGURA 1: Avaliação da atividade larvívica do OEPV pelo ensaio de exclusão por Trypan blue (0,4%), após 48 h de exposição. Letras: A) indica resultado sem diferença significativa em relação ao controle negativo (larvas vivas); letra B) indicam resultado sem diferença significativa em relação ao controle positivo (larvas mortas), letra C) indica resultado significativamente diferente em relação aos controles e letra D) indica resultado com diferença significativa em relação ao OEPV 600 µM/mL, para todos $p < 0,05$.

Quanto a análise da Motilidade Relativa (RM), pode-se observar que o OEPV na concentração de 600 µg/mL e no período de exposição de 24 h, as larvas apresentaram RM de 0%, apresentando um score 1, mas não coraram com Trypan blue (0,4%), somente em 48 h houve presença de coloração pelo corante, tendo assim score 0. Os controles negativo de larvas vivas e com DMSO, apresentaram RM de 100% e score 5, com ausência de coloração por Trypan blue em todos os períodos de exposição.

O controle positivo de larvas mortas, em 24h, já apresentavam 0% de RM (score zero) com presença de coloração por Trypan blue. Também pode-se observar que o OEPV na concentração de 300 µg/mL e no período de exposição de 24 h, teve RM de 64% e score 2. Enquanto a mesma concentração em 48 h, 50% das larvas apresentavam motilidade relativa com score 1 e 50% com score 0 e presença de coloração por Trypan blue (Tabela 1).

TABELA 1. Critérios para avaliação dos efeitos do OEPV na mobilidade das larvas de *Toxocara canis*.

Estado da larva	Score (n)
Movimento rápido, usando todo corpo	5
Movimento intermediário, usando todo corpo	4
Movimento lento, usando todo corpo	3
Movimento somente com uma parte do corpo	2
Imóvel mas não morta	1
Morta	0

Índice de mobilidade (MI) = $\sum n N_n / \sum N_n$, onde N_n : número de larvas com score(1). Mobilidade Relativa (RM) = $MI_{\text{sample}} / MI_{\text{control}} \times 100$ (2).

De acordo com MACHADO et. al, 2016 os resultados obtidos são devidos ao maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, o que confirma o potencial biológico do OEPV. No entanto, a coloração das larvas ocorreu após 48h, isto se deve ao fato da morte destas não ter ocorrido por lesão de tecido, já que a forma com que o corante Trypan blue penetra mais rapidamente é por meio deste mecanismo.

4. CONCLUSÕES

Resultados sugerem, que o OEPV possui atividade larvívica *in vitro* em larvas de *T. canis*. O potencial larvívica do OEPV deve ser estudado em outros agentes infecciosos, demonstrando um alto potencial larvívica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GHAFFAR, A. **Medical Microbiology**. Carolina do Sul: The Macrobile Library, 2001.

KYEI, G. Sero-Epidemiology of *Toxocara Canis* Infection in Children Attending Four Selected Health Facilities in the Central Region of Ghana. **Ghana Medical Journal**, Cape Coast, v.49, n.2, p. 77-83, 2015.

GRECCO, M.Z. *Toxocara canis* and the allergic process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v.110, n. 6, p. 726–731, 2015.

FU, C.J. Seroepidemiology of *Toxocara Canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. **BMC Infectious Diseases**, Taipei, v. 14, p. 261, 2014.

BANKOVA, V. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, Bulgaria, v. 8, n. 28, 2014.

MACHADO, B.A.S. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLoS ONE**, Sergipe, v.11, n.1, 2016.

REIS, M. *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**. v. 126, p. 191–197, 2010.

DE SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **The Journal of Parasitology**. v. 61, p. 781–782, 1975.

OTHMAN, A.A. Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind? **Acta Trop**. v.124, p.171-8, 2012.

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **J. Helminthol**. v.5, p. 299–305, 2001.

GEERTS, S. AND GRYSEELS, B. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. **Clinical Microbiology Reviews** v.13, p. 207–222, 2000.