

ATIVIDADE *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS LIVRES E NANOESTRUTURADOS SOBRE OVOS DE *Fasciola hepatica*

BRUNA BACCEGA¹; ALEXIA BRAUNER DE MELLO²; ALISSON CARLOS ASSUNÇÃO SILVA³; ALINE FERREIRA OURIQUE⁴; MARCOS MARREIRO VILLELA⁵; CAMILA BELMONTE OLIVEIRA⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alexiabraunermello@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – allison.silva@ifac.edu.br

⁴ Universidade Franciscana Federal de Pelotas – alineourique@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – marcosmvillela@bol.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – camilabelmontevet@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758), é um trematódeo que parasita o fígado e ductos biliares de ruminantes, equinos, coelhos, suínos, roedores e ocasionalmente humanos (UENO et al., 1975). É considerado um dos helmintos de ruminantes domésticos mais importante, acarretando perdas na produtividade de rebanhos, devido à interferência no desenvolvimento de animais, baixa fertilidade, queda na produção de leite, carne, lã, condenação de fígados em abatedouros e gastos no controle da parasitose (QUEIROZ et al., 2002).

Os medicamentos fasciolicidas são importantes para o controle desta parasitose, os quais devem ser de fácil aplicação, baixo custo, atóxicos, que não deixem resíduos e sejam altamente eficazes no combate às formas adultas e imaturas do parasito. Além disso, adquirir animais com certificação de sanidade é de extrema importância em regiões endêmicas (CUNHA et al., 2007). As más práticas de utilização destes fármacos podem resultar no desenvolvimento de resistências e como tal torna-se necessário implementar algumas regras de utilização bem como desenvolver outros métodos de controle, como as vacinas (FAIRWEATHER & BORAY, 1999).

Os benzimidazóis são os compostos anti-helmínticos de amplo espectro usados na medicina veterinária e em humanos para o controle de infecções causadas por nematódeos, cestódeos e trematódeos (MCKELLAR et. al. 1990). Plantas medicinais ou seus compostos bioativos tem sido frequente utilizados no controle de doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitos no homem, bem como na medicina veterinária (SOARES & TAVARES 2013; PANDEY, 2014).

As buscas de novas alternativas de tratamentos em substituição dos tratamentos nocivos para este trematódeo têm justificado o alto índice de pesquisas que buscam plantas medicinais para o controle de nematóides gastrintestinais (RATES, 2001).

A nanotecnologia vem sendo estudada para a utilização de nanofármacos, como as nanoemulsões, que são formulações com tamanho em escala nanométrica, ou seja, entre 20 a 200 nm. Assim, são caracterizadas principalmente por exibirem uma excelente estabilidade em suspensão, devido a sua reduzida dimensão (SOLANS et al. 2005, ANTON et al. 2008). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade *in vitro* de óleos essenciais livres e suas respectivas nanoestruturas em ovos de *F. hepatica*.

2. METODOLOGIA

As coletas de ovos de *F. hepatica* foram realizadas com fígados positivos no exame *post mortem* de dois frigoríficos do município de Pelotas, Rio Grande do Sul. Os trematódeos coletados foram armazenados em frascos de vidro contendo solução salina aquecida (aproximadamente 30°C) para lançar ovos. Os ovos foram lavados três vezes com água destilada e filtrada por um conjunto de quatro peneiras (100, 170, 200 e 250) tamanho. Logo depois disso, foram armazenados em recipientes de vidro, devidamente identificados, contendo água destilada estéril e mantidos refrigerados até a preparação do ensaio de eclosão de ovos (UENO & GONÇALVES, 1998).

Os óleos e nanoemulsões utilizados na pesquisa foram cedidos pelo Laboratório de Nanotecnologia da Universidade Franciscana (UNF) de Santa Maria, RS. A avaliação da atividade *in vitro* da eficácia dos óleos essenciais livres de *Ocimum basilicum* (Manjericão), *Cymbopogon citratus* (Capim-limão) e *Eucaliptus* spp. e suas nanoemulsões sobre ovos foi realizada, sob a concentração de 0,5, 1 e 1,5%.

A partir disso, os ovos foram depositados em placas de seis poços com base em metodologias (ROBLES-PÉREZ et al., 2014; ARAFA et al., 2015), juntamente com os óleos essenciais livres e nanoestruturados conforme sua concentração. O teste foi realizado em triplicata de cada concentração testada. O controle positivo, foi utilizado albendazol na concentração de 0,025 mg (dose terapêutica), para controle negativo somente ovos e para controle dos nanoestruturados utilizado nano branca.

As placas então foram embaladas em papel alumínio, para que os ovos não tivessem contato com a luz ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas a 28° C com umidade 80% em incubadora de estufa Tipo B.O.D. (Marca Eletrolab, modelo EL 101/03) em um ambiente escuro por 14 dias a uma temperatura controlada de 27°C. No décimo quarto dia de incubação as placas foram expostas à luz por 2 h, para estimular o surgimento de miracídios (ROBLES-PÉREZ et al., 2014; ARAFA et al., 2015). A contagem dos ovos eclodidos e totais foram realizadas em 14 e 21 dias, utilizando-se invertido microscópio (Marca: Olympus - CKX 41).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas placas realizadas de controle, obtivemos 60% de ovos embrionados, 20% não embrionados e 20% ovos eclodidos. Na placa de controle positivo com uso de 0,025mg de albendazol obtivemos uma taxa consideravelmente maior de ovos não embrionados (80%), apenas 20% embrionados e 0% ovos eclodidos,. Segundo FAIRWEATHER (2011) O tratamento químico é considerado apropriado quando há redução de 95% para que seja eficaz.

Os resultados revelam a eficácia do óleo essencial livre de Capim-limão contra ovos de *F. hepatica* sob todas concentrações, não apresentando diferença estatística na leitura em 14 e 21 dias. Quando analisada a eficácia do óleo de manjericão, na concentração em 0,5%, apresentou 95% de eficácia. Já quando analisado o óleo nanoestruturado obteve 98% de ovos não embrionados. Nas seguintes concentrações (1% e 1,5%) obtivemos 100% de ovos não embrionados. Os valores obtidos neste estudo corroboram com o extrato das folhas *Psidium guajava L.* (goiabeira) nas concentrações, 0,25% e 0,5% e *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão-verdeiro) nas concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5% (MARQUES, 2017). Bem como, com os óleos essenciais testados de *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho), e os componentes timol e

carvacrol em baixa concentração, de 0,1% também obtiveram resultados que corroboraram com a eficácia de óleos estruturados (VIEIRA, 2017).

Por fim, quando observada às placas referentes ao óleo livre e nanoestruturados de eucalipto, em comparação aos outros utilizados e medicamento fasciolida, não apresentou resultados satisfatórios, diferindo de CARVALHO (2017), que demonstrou que o uso do óleo essencial de eucalipto foi completamente satisfatório para *Haemonchus contortus*, no entanto com uso de maiores concentrações, sugerindo então, uma maior dosagem para levar ao possível funcionamento do óleo de eucalipto contra *F. hepatica*, assim como MACEDO (2009) que obteve resultados satisfatórios com o uso a partir de 21,75 mg/ml de óleo de eucalipto.

4. CONCLUSÕES

Com base nos achados deste estudo, conclui-se que os óleos essenciais livres e nanoestruturados apresentaram efeito sobre ovos de *Fasciola hepatica*, sendo que os óleos essenciais de capim-limão e manjericão apresentaram melhores resultados em todas as concentrações testadas, sendo a concentração de 0,5% considerada a melhor independente do tratamento. No entanto, o óleo livre e o nanoestruturado de eucalipto não houve eficácia comprovada contra ovos de *F. hepatica* no experimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAFA, W.M., SHOKEIR, K.M., KHATEIB, A.M. Comparing an in vivo egg reduction test and in vitro egg hatching assay for different anthelmintics against *Fasciola* species, in cattle. **Vet. Parasitol.** v.214, n.1-2, p.152–158, 2015.

ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates. **A review. Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p.185–199, 2008.

CARVALHO, C.O.; GIGLIOTTI, R.; GIGLIOTTI, C.; OLIVEIRA, M.C.S.; Esteves, S.N.; CHAGAS, A.C. Efeito anti-helmíntico in vitro de óleos essenciais de eucalipto sobre vermes adultos de *Haemonchus contortus*. In: **SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE**, 2., 2007, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T.; MATTOS, M.J.T. Prevalência de *Fasciola hepatica* em ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Parasitol Latinoam**, v. 62, n. 3, p. 188-191, 2007.

FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.133-143, 2011.

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.S. Ovicidal and larvicultural activity in vitro of *Eucalyptus globulus* essential oils on *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.62-66, 2009.

MARQUES, L.T. **Composição química de extratos vegetais e sua eficácia no controle *in vitro* de ovos de *Fasciola hepatica*.** 2017. Dissertação (Ciências veterinárias) – Ciências Veterinárias, Univeridade Federal do Espírito Santo.

MCKELLAR, Q.A.; SCOTT, E.W. The benzimidazole anthelmintic agents--a review. **J. Vet. Pharmacol Ther.** v.13, n.3, p. 223-247, 1990.

PANDEY, G. Some medicinal plants to treat fish ectoparasitic infections. **International Journal of Pharmaceutical and Research Sciences.** v. 2, n. 2, p. 532–534, 2014.

QUEIROZ, V. S.; LUZ, E.; LEITE, L. C.; CÍRIO, S. M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae: estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). **Acta Biologia e Parasitologia.**, v. 31, n. 1–4, p. 99–111, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

ROBLES-PÉREZ, D.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J.M.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. **Vet. Parasitol.** v.203, n.1, p.217–221, 2014.

SOARES, B.V.; TAVARES, M.D. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n.1, p. 109–123, 2013.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N. Nano-emulsions. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepática no Brasil: Análise Retrospectiva e Prospectiva. **Caderno Técnico Científico da Escola de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 9-70, 1999.

UENO, H.; ARANDIA, R. C.; MORALES, G.; MEDINA, G. Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the Altiplano region of Bolivia. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v. 15, n. 2, p. 61-67, 1975.

VIEIRA, F.P.R. **Efeitos *in vitro* e caracterização química dos óleos essenciais de *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e seus componenentes majoritários sobre *Fasciola hepatica*.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo.