

EFEITO E ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS DE ÓLEO ESSENCIAL NO TEGUMENTO DE *FASCIOLA HEPATICA*.

ALEXIA BRAUNER DE MELLO¹; BRUNA BACCEGA²; FILIPE OBELAR MARTINS³; MARJORIE GIACOMETI⁴; NARA AMÉLIA FARIAS⁵; CAMILA BELMONTE OLIVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – alexiabraunermello@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – obelar05@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marjorie.giacometi@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – naraameliafarias@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758), é um parasito do fígado e ductos biliares de diferentes espécies de animais, sendo mais comum em bovinos e ovinos e ocasionalmente no ser humano (TRIVILIN *et al.* 2013; GUIMARÃES, 2016). O parasito é conhecido principalmente pelo seu impacto na produtividade de ruminantes (MAS-COMA *et al.* 2018). Sua importância veterinária ocorre principalmente por causar consideráveis perdas econômicas, devido ao quadro sistêmico que ocasiona no geral menor rendimento de carcaça e condenação de fígados no abate (JACOBS *et al.* 2015).

No Brasil, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste, verifica-se a alta prevalência dessa parasitose, associada às condições climáticas. A prevalência estimada no RS é de 20%, com uma redução de até 6% no peso de carcaça, valor significativo em perdas econômicas (MOLENTO; PRITSCH, 2018).

O controle da fasciolose é realizado com antihelmínticos (KELLEY *et al.* 2016). No entanto, diversos episódios de ineficácia terapêutica são relatados em todo o mundo, devido ao uso indiscriminado destes fármacos, resultando no desenvolvimento de resistência parasitária (FAIRWEATHER, 2011; KEELEY *et al.* 2016). Visto isso, a prospecção por compostos naturais em substituição aos tratamentos sintéticos, justificam a busca da fitoterapia como alternativa para controle de diversas helmintoses (ALMEIDA *et al.* 2012).

Diante desta problemática, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos *in vitro* do óleo essencial (OE) de *Cuminum cyminum* (Cominho) através das alterações histológicas tegumentares em adultos de *Fasciola hepatica*.

2. METODOLOGIA

A coleta e recuperação dos espécimes de *F. hepatica* foi realizada a partir de fígados infectados, detectados no exame *post mortem* e cedidos por frigorífico localizado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul (Brasil).

Posteriormente, foi realizada a testagem *in vitro* do OE nos espécimes adultos que foram selecionados de acordo com sua integridade e após 24 horas foi analisada as alterações ocasionadas pelo OE e respectivos controles. O OE foi testado em duas diferentes concentrações (0,06 e 0,03 mg/mL). Como controle foi utilizado meio RPMI (controle negativo) e Nitroxinil (controle positivo).

Apos a incubação com o OE, os espécimes foram observados a cada 3 horas durante 24 horas e analisados de acordo com sua motilidade, sendo considerados

ausência movimento (morto) e apresentando movimento (vivo) (KIUCHI *et al.* 1987).

Por fim, os exemplares foram fixados por imersão em solução formalina 10% por 24 horas. Posteriormente foram realizados cortes transversais (3-4 µm), embebidas em parafina, coradas com hematoxilina-eosina (HE) e observadas em microscópio óptico para análise das alterações histológicas em tegumento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do experimento apenas a maior concentração foi capaz de inativar 100% dos espécimes adultos. Nas análises histológicas, foram observadas nas concentrações testadas alterações tegumentares quando comparadas ao controle negativo. Os espécimes do controle negativo apresentaram o sincício do tegumento com aspecto íntegro e homogêneo, com os espinhos em grande parte externalizados (Fig. 1 – I). Já os espécimes tratados com o fármaco Nitroxinil apresentaram vacuolização na camada interna do sincício do tegumento (seta) e ao redor dos espinhos, que se encontravam em grande maioria internalizados ou destruídos. Além disso, a camada muscular apresentava a formação de vesículas (Fig. 1 – II).

Por fim, os grupos tratados com OE de *Cuminum cyminum* apresentaram vacuolização considerável próxima a lâmina basal do sincício tegumental, formando grandes vesículas. Além disso, ao redor dos espinhos haviam microvesículas (Fig. 1 – III). Os espinhos, estavam em maioria íntegros, mas aparentemente não se externalizavam, provavelmente devido ao acúmulo de líquidos ao seu redor (seta e cabeça da seta) (Fig. 1 – IV).

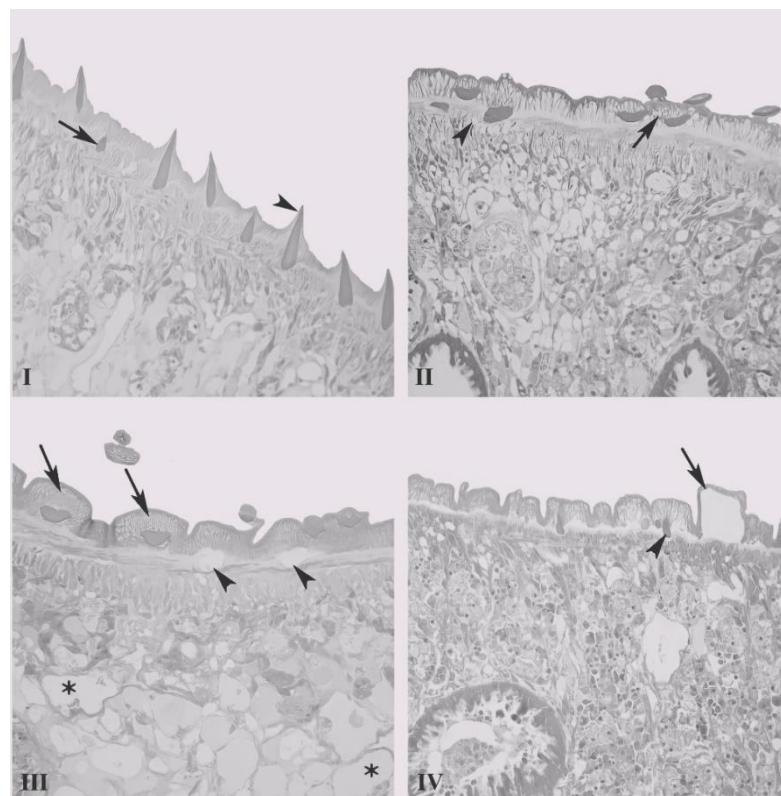


Figura 1. Histopatologia *Fasciola hepatica*. (I) Controle Negativo – Espinhos externalizados (cabeça de seta). Espinhos internalizados (seta) (II) Nitroxinil – Espinhos

(seta). Vesículas (cabeça de seta) (III) *C. cyminum* 0,03 mg/mL – Vesículas (cabeça da seta). Espinhos internalizados e rodeados vesículas (seta) (IV) *C. cyminum* 0,06 mg/mL – Espinho internalizado rodeado por vesículas (cabeça da seta). Grande vesícula (seta). 200X.

Em nosso estudo, os espécimes tratados com OE de cominho, apresentaram áreas do tegumento alteradas e irregulares, este fato pode ter contribuído para a morte do trematoda, pois ao redor dos espinhos havia grande quantidade de vesículas, dificultando sua externalização e impedindo a fixação do trematódeo no seu hospedeiro, essa característica impossibilita o seguimento de seu ciclo biológico (RIBEIRO *et al.* 2017).

As capacidades fitoterápicas do OE de cominho supostamente estão relacionadas ao seu composto majoritário, o cumaldeído (VIEIRA *et al.*, 2019). Como descrito no estudo realizado por Goel *et al.*, (2020), no qual o cumaldeído induziu dano físico mediado por estresse oxidativo, seguido pela morte do nematódeo *Haemonchus contortus*. O mecanismo de ação do OE abordado no presente estudo não é totalmente conhecido, todavia, inúmeros estudos demonstram a eficácia antiparasitária do composto (DE CASTRO *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2020). O OE de cominho já apresenta dados na literatura sobre a eficácia *in vitro* em *F. hepatica*, no entanto apenas foi realizado testes ovicidas do trematódeo (DA SILVA *et al.*, 2020).

O OE de *C. cyminum* possui atividade biológica com ação antibacteriana, antifúngica, efeitos larvicidas e antihelmínticos já relatados (SINGH *et al.* 2017). Visto isso, compostos naturais derivados do cominho mostram-se promissores para tratamento da fasciolose, em substituição ou possível associação aos fármacos já existentes, visto que, a combinação de substâncias pode ser favorável conectando diferentes produtos com mecanismos de ação distintos e assim evitando a resistência parasitária (LANUSSE *et al.* 2018).

4. CONCLUSÕES

O OE de cominho na maior concentração causa alterações tegumentares em *Fasciola hepatica*, sendo necessário mais estudos para comprovar que este fato pode contribuir para a morte deste parasito.

A escassez e especificidade de princípios ativos para o tratamento da fasciolose além da resistência parasitária torna essencial a busca por novas alternativas de tratamento desta importante enfermidade em animais de produção e zoonose negligenciada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, B.R.; SANTILIANO, F.C.; ALVES, D.P. Avanços farmacológicos no tratamento da fasciolose em rebanho bovino. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 18, p. 1-17, 2012.
- BEESELEY, N.J. *et al.* *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. **Int. J. Parasitol.**, v. 47, p.11-20, 2017.
- BORAY, J. C.; DE BONO, D. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Resistance of parasites to antiparasitic drugs: Round Table Conference, **ICOPA VII. Paris: Merck & Co. Inc.**, 1990. p. 51-60.

- DA SILVA, M.A.M.P. *et al.* Ovicidal *in vitro* activity of the fixed oil of *Helianthus annuus* L. and the essential oil of *Cuminum cyminum* L. against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Exp. Parasitol.**, v.218, p.107984, 2020.
- DE CASTRO, L.M. *et al.* Atividade *in vitro* do óleo essencial de *C. cyminum* contra *Haemonchus contortus* de ovinos. **Braz. J. Dev.**, v.7, p.79-91, 2021.
- FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy. **Vet. Parasitol.**, v.180. p.133-143, 2011.
- GOEL, V.; SINGLA, L.D.; CHOUDHURY, D., 2020. Cuminaldehyde induces oxidative stress-mediated physical damage and death of *Haemonchus contortus*. **Bio-med. Pharmacother.**, v. 130, 2020.
- GUIMARÃES, Marcos Pezzi. *Fasciola hepatica*. In: NEVES, D.P., MELO, A.L., LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Org). **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu: 2004. pp. 223-226.
- JACOBS, D. Platyhelminthes. In: JACOBS, D.; FOX, M.; GIBBONS, L.; HERMOSILLA, C. (Org). **Principles of Veterinary Parasitology**, Oxford, p.117-146, 2015.
- KELLEY, J.M. *et al.* Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. **Trends in Parasitology**, v.32, p.458- 469, 2016.
- KIUCHI, F. *et al.* Studies on crude drugs and Vective on visceral larva Migrants. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. **Chem. Pharm. Bull.**, v.35, p. 2880–2886, 1987.
- LANUSSE, C. *et al.* Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends Parasitol.** v.34, p.664-682, 2018.
- MAS-COMA, S.; BARGUES, M.D.; VALERO, M.A. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. **Parasitology**, v.145, p.1665–1699, 2018.
- MOLENTO, M.B.; PRITSCH, I.C. *Fasciola hepatica* em bovinos no Brasil: uma doença negligenciada. **AGROIN**, 2018.
- RIBEIRO, V.M.A. *et al.* Dynamics of haemocytes from *Pseudosuccinea columella* circulating infected by *Fasciola hepatica*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.**, v.26, p.411-418, 2017.
- SINGH, R.P.; GANGADHARAPPA, H.V.; MRUTHUNJAYA, K. *Cuminum cyminum* – A popular spice: An updated review. **Pharmacogn. J.**, v. 9, n. 3, 2017.
- TRIVILIN, L.O. *et al.* Imunofenotipagem da resposta inflamatória em fígados de bovinos cronicamente e naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. 1, p. 41-47, 2013.
- VIEIRA, J.N. *et al.* Composição química de óleos essenciais da família apiaceae, citotoxicidade e sua atividade antifúngica *in vitro* contra espécies de *Candida* da cavidade oral. **Braz J Biol.**, v.79, p.432-437, 2018.