



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

ALEXIA BRAUNER DE MELLO¹; YAN WAHAST ISLABÃO²; MARJORIE GIACOMETI³; FILIPE OBELAR MARTINS⁴; NARA AMÉLIA DA ROSA FARIAS⁵; CAMILA BELMONTE OLIVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – alexibraunermello@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – yanwahast06@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marjorie.giacometi@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – obelar05@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – naraameliafarias@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica é um trematódeo causador da fasciolose, zoonose negligenciada e de distribuição mundial (MAS-COMA *et al.*, 2018). Este helminto parasita o fígado e ductos biliares de ruminantes, equinos, roedores e outros animais, acometendo principalmente bovinos. Estima-se que mais de 300 milhões de bovinos estejam expostos ao parasita (MOLENTO; PRITSCH, 2018), causando grandes perdas econômicas, afetando a pecuária, como também a saúde pública (MEHMOOD *et al.* 2017). O ser humano é um hospedeiro acidental (DA MOTTA *et al.*, 2023). As perdas econômicas estão associadas com a perda dos fígados durante abate, bem como pela condição sistêmica que resulta em quadro de perda de peso, diminuição da produção de leite, baixa fertilidade e menor rendimento de carne e lã, além das altas taxas de mortalidade (FANKE *et al.*, 2017). O controle da fasciolose é realizado com uso de anti-helmínticos dos grupos dos benzimidazóis, macrolactonas, imidazotiazóis e salicilanilidas (BORGES, 2003). Dentre os mais utilizados estão o albendazol (AL), triclabendazol e o nitroxinil (NIT), no entanto, a resistência anti-helmíntica é relatada frente ao uso destes antiparasitários em vários países (NOVA *et al.*, 2014; ROMERO *et al.*, 2019). Os compostos vegetais e seus princípios ativos apresentam grande potencial no controle de diversos parasitos, aumentando assim o interesse e a busca por novas alternativas de controle (ROCHA *et al.* 2019). Neste contexto, o objetivo do deste estudo foi avaliar a eficácia *in vitro* do óleo essencial (OE) de *Pelargonium graveolens* (gerânio) em ovos e adultos de *F. hepatica*, bem como alterações histopatológicas no tegumento.

2. METODOLOGIA

Os espécimes de *F. hepatica* foram coletados e recuperados a partir de fígados infectados, detectados no exame *post mortem* em frigoríficos localizados no município de Pelotas, RS (Brasil). Os parasitos foram coletados diretamente das vias biliares com auxílio de bisturi e pinça. Previamente os adultos foram recuperados e mantidos em meio de cultura RPMI Medium 1640 (Gibco®) (JEYATHILAKAN *et al.* 2010). Posteriormente, foi realizado o teste *in vitro* do OE frente os ovos recuperados e nos espécimes adultos, os quais foram selecionados de acordo com sua integridade. O teste ovicida foi realizado com base nas metodologias descritas por Arafa *et al.* (2015) e Fairweather (2012). Para este, os ovos foram alocados em placas de seis poços, juntamente com os controles ou OE de acordo com sua concentração. As placas foram acondicionadas a ± 28 °C e 80% de umidade em câmaras climáticas por 14 dias, até a contagem dos ovos eclodidos. Foram realizadas oito concentrações, para expressar os resultados em mg/mL foi utilizada a densidade do OE (0,9 g/dm), ao final obtivemos concentrações variando entre 4,5-0,03 mg/mL. Para o teste adulticida, os espécimes foram observados a cada 3 horas por 24 horas e após o experimento, foram analisadas as alterações

ocasionadas pelo OE e respectivos controles. O OE para adultos foi testado em duas concentrações (0,06 e 0,03 mg/mL). Como controle foi utilizado meio RPMI (negativo), NIT e AL (positivos), assim como para ovos. Após incubação com o OE, os espécimes foram analisados nos tempos de acordo com sua motilidade, sendo considerados ausência movimento (morto) e com movimento (vivo) (KIUCHI *et al.* 1987). Por fim, foram realizados cortes transversais, embebidas em parafina, coradas com hematoxilina-eosina (HE) e observadas em microscópio óptico com aumento de 200 x para análise das alterações histológicas em tegumento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O OE de *P. graveolens* (PEG) frente sua atividade ovicida apresentou 100% de eficácia nas concentrações testadas, com alteração no desenvolvimento, ou seja, não embrionados, sem a formação de miracídios. Na atividade adulticida, os espécimes do grupo controle (RPMI) na análise microscópica, apresentaram boa motilidade, movimentando todas as partes do corpo até o tempo final (24h). Frente a histopatologia, apresentaram o sincício do tegumento homogêneo, com espinhos íntegros e em grande maioria exteriorizados (Fig. 1. I e II), sem qualquer sinal de lesão ou característica atípica.

Diversos estudos mostram o potencial fitoterápido do OE de *P. graveolens*, como o estudo de Hamidpour *et al.*, (2017), onde mostraram o perfil terapêutico promissor de PEG para o desenvolvimento de agentes antibacterianos, antifúngicos e antioxidantes para fins fitoterápicos. Quanto à atividade ovicida e adulticida do composto para *F. hepatica*, não existem estudos que avaliem o efeito *in vitro*, dificultando a comparação dos resultados obtidos.

O OE de PEG nas duas concentrações testadas (0,06 e 0,03 mg/mL), no período de 15h promoveu a morte dos helmintos. A World Association for the Advanced of Veterinary Parasitology recomenda que o antiparasitário deve ter atividade superior a 90%, em nosso estudo foi observado eficácia de 100%, demonstrando grande potencial fasciolicida (WOOD *et al.* 1995).

Os OEs destacam-se por serem provenientes do metabolismo secundário das plantas e por serem caracterizados majoritariamente por derivados terpenóides, sendo os monoterpenos os principais compostos responsáveis pelas atividades biológicas desses OEs (SAPRA *et al.*, 2008). Os monoterpenos se destacam por suas características fitoterápicas, apresentando efeitos antifúngicos, antioxidantes e anti-helmínticos (GOMES *et al.*, 2020).

O principal composto do óleo testado, o citrionelol, consiste em um monoterpeno oxigenado, é encontrado naturalmente nos óleos essenciais de muitas plantas aromáticas. No entanto, seu mecanismo de ação é inexplorado (HIERRO *et al.* 2004). O uso do OE de *P. graveolens* em adultos de fasciola causou a dissolução do revestimento epitelial dos ceco e testículos, restando apenas a lâmina basal (Fig 1. III e IV) sugerindo que o mecanismo de ação está relacionado ao epitélio do trematódeo. Hierro *et al.* (2004) relatam o efeito do citrionelol e do geraniol, principais compostos presentes em PEG, relacionando-o a lise da parede intestinal e projeção de diferentes estruturas histológicas voltadas para longe do parasito, produzindo protuberâncias cuticulares em *Anisakis simplex*, nematóide parasito de peixes, efeitos cutâneos semelhantes aos causados em *F. hepatica*.

Além disso, adultos de *F. hepatica* tratados com PEG apresentaram vacuolização do sincício tegumental, formando vacúolos ao redor dos espinhos, que estavam aumentados e intensamente internalizados. A presença de bolhas nos espinhos possivelmente impediu sua exteriorização, fator importante para sua patologia, pois seu tegumento é coberto por espinhos, que auxiliam na fixação do helminto nas vias biliares. Impedir a externalização destes, impede a fixação no

hospedeiro e conseqüentemente a sobrevivência deste helminto (MCCONVILLE *et al.*, 2006, VIDAL *et al.*, 2019).

Os controles positivos utilizando os medicamentos AL e NIT inativaram todas as amostras em 18 horas e 6 horas, respectivamente. Quanto a análise histológica o grupo tratado com AL apresentou acúmulo de líquido na região da lâmina basal e camada muscular, característica distinta dos outros grupos, e vacuolização discreta no sincício tegumentar (Fig. 1. V e VI). Do ceco e testículos restou apenas a lâmina basal. Os espinhos estavam praticamente intactos e internalizados. Os animais tratados com NIT apresentaram vacuolização na camada interna do sincício tegumentar imediatamente acima da lâmina basal e ao redor dos espinhos e também na musculatura superficial e profunda (Fig. 1. VII e VIII).

A resistência de isolados deste trematoda ao AL, evidencia a necessidade de novos fármacos para o tratamento desta enfermidade. Em nosso estudo, o AL levou um maior para inativar os espécimes quando comparado ao óleo (SANABRIA *et al.* 2013). O controle adulticida com NIT inativou os trematódeos em 6h, esse resultado pode ser atribuído ao composto causar alterações na superfície tegumentar do trematódeo, como visto nos estudos de McKinstry *et al.*, (2003), que demonstraram alterações e/ou rupturas do tegumento, causando sua morte. Campello *et al.* (2020) relataram que ovelhas morreram dentro de 24h após a administração do NIT, visto que este medicamento é tóxico quando utilizado em doses elevadas e em condições ambientais adversas, como altas temperaturas (BRITO *et al.*, 2021).

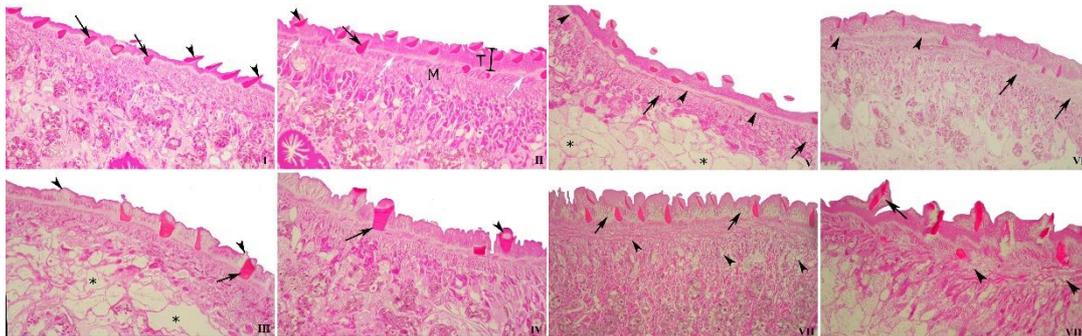


Figura 1. Histopatologia *Fasciola hepatica*. Controle negativo (I e II) HE. 200 X. *P. graveolens* 0,03 mg/mL (III) HE. 200 X. *P. graveolens* 0,06 mg/mL (IV) HE. 200 X. Albendazol (V e VI) HE. 200 X. Nitroxinil (VII e VIII) HE. 200 X.

4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Pelargonium graveolens* foi efetivo nos testes *in vitro* para *Fasciola hepatica*, eficaz em ovos e adultos. 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 parasitária que acomete animais de produção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAFA, W.M. *et al.* 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, p.152-158, 2015.
- BORGES, C.C.L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa. **Parasitol. Latinoamericana**, v. 58, n. 3-4, p. 142-147, 2003.
- BRITO, J.R.C. *et al.* Spontaneous and experimental poisoning by nitroxinil at 34% in goats. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 41, 2021.
- CAMPELLO, S. *et al.* Surto de intoxicação por nitroxinil em ovinos. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 8, n. 2, 2020.

- DA MOTTA, S.P. *et al.* Fasciolose humana: contribuições realizadas na América do Sul entre os anos 2011 e 2021. **Brazil. J. of Develop**, v. 9, n.5, 18592-18602, 2023.
- FAIRWEATHER, I. *et al.* Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. **Vet. Parasitol.** 183, 249-259, 2012.
- FANKE, J. *et al.* Economic assessment of *Ostertagia ostertagi* and *Fasciola hepatica* infections in dairy cattle herds in Germany using Paracalc®. **Vet. Parasitol.** 240, 39–48, 2017.
- GOMES, P.B. *et al.* Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1-2, p. 50- 60, 2006.
- HAMIDPOUR, R. *et al.* *Pelargonium graveolens* (Rose Geranium) –a novel therapeutic agent for antibacterial, antioxidant, antifungal and diabetics. **Archives in Cancer Research**, v. 5, n. 01, p. 1-5, 2017.
- HIERRO, I. *et al.* Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* L3 larvae. **Phytomedicine**, v. 11, n. 1, p. 77-82, 2004.
- JEYATHILAKAN, N. *et al.* Anthelmintic activity of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Azadirachta indica* on *Fasciola gigantica*. **Vet. e An. Sci.**, v. 6, n. 4, p. 204-209, 2010.
- KIUCHI, F. *et al.* Studies on crude drugs and Vective on visceral larva Migrans. I. Identification of larvicidal. **Chem. Pharm. Bull**, v.35, p. 2880–2886, 1987.
- MAS-COMA, S. *et al.* Fascioliasis. In: Digenetic Trematodes: Advances in Experimental Medicine and Biology, p. 71-103, 2019.
- MCKINSTRY, B. *et al.* *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment *in vivo* and *in vitro* with nitroxinil. **Parasitol. Res.**, v. 91, p. 251-263, 2003.
- MCCONVILLE, M. *et al.* Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to *in vitro* treatment. **Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 195-208, 2006.
- MEHMOOD, K. *et al.* A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. **Micro. Pathogenesis**, v. 109, p. 253–262, 2017.
- MOLENTO, M.B.; PRITSCH, I.C. *Fasciola hepatica* em bovinos no Brasil: uma doença negligenciada. AGROIN, 2018.
- NOVA, L.E.V. *et al.* Nematode resistance to anthelmintics nitroxinil 34% and ivermectin 1% in sheep in São João do Ivaí, Paraná. **Rev. Bras. de Hig. e Sanidade Animal.**, v. 8, p. 159-171, 2014.
- ROMERO, J. *et al.* Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of Triclabendazole and Nitroxynil in cattle of the central valley of Chile. **Rev. Bras. de Par. Vet.**, v. 28, p. 164-167, 2019.
- ROCHA, C. *et al.* Advances in the development of technologies using essential oils for control of parasites of small ruminants. **GEINTEC**. v. 9, p. 5067-5075, 2019.
- SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A.K. Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. **AAPS J.**, v. 10, 2008.
- SANABRIA, R. *et al.* Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. **Vet. Parasitol.**, v. 193, n. 1-3, p. 105-110, 2013.
- VIDAL, M.L. *et al.* Eficácia de extratos vegetais de *Punica granatum* L. no controle *in vitro* de ovos e adultos de *Fasciola hepatica*. **Enciclopedia Biosfera**, v. 16, n. 29, 2019.
- WOOD, I.B. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics. **Vet. Parasitol.**, v. 58, n. 3, p. 181-213, 1995.