

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE CONCENTRAÇÕES DE ALBENDAZOL SOBRE OVOS DE *Fasciola hepatica*

Ana Clara Boechat Nunes, Letícia Gomes Maciel, Mariana Belizario de Oliveira,
Walter Cesar Celeri Bigui, Vagner Tebaldi de Queiroz, Isabella Vilhena Freire
Martins, Adilson Vidal Costa

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto
Universitário, s/n, caixa postal 16, Guararema – 29500-00 – Alegre – ES, Brasil,
acbn274@gmail.com, leticia.maciell@edu.ufes.br, belizmary@hotmail.com, walter.bigui@edu.ufes.br,
vagnertq@gmail.com, ivfmartins@gmail.com, avcosta@hotmail.com.

Resumo

O trematoda *Fasciola hepatica*, agente etiológico da fasciolose, ocasiona o acometimento de lesões no fígado e ductos biliares de ruminantes, comprometendo sua capacidade produtiva, além de ser uma zoonose. O controle da doença é complexo e envolve o uso de fármacos endoparasiticidas como o albendazole. O objetivo do estudo foi utilizar o teste de eclobilidade de ovos (TEO), para mensurar a sensibilidade dos ovos de *Fasciola hepatica* ao albendazol em diferentes concentrações, assim buscando a menor concentração eficaz a ser utilizada em testes *in vitro*. Os ovos foram diluídos em concentração de 100 ovos por mililitro e distribuídos em placas de cultura do tipo ELISA. O controle negativo foi feito com água e grupos tratados com diferentes concentrações de albendazol. As placas foram colocadas em BOD por 14 dias e em seguida expostas a luz incandescente para observação. Os resultados obtidos indicaram que o composto se mostrou eficaz em todas as concentrações e não houve formação de miracídios, demonstrando que o albendazol foi eficiente nas concentrações estudadas, sendo a de 10 ppm a menor concentração eficaz.

Palavras-chave: Verminose. Fármaco. Resistência. Zoonose. Bovinos.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde (Medicina Veterinária)

Introdução

Fasciola hepatica é um parasito da classe Trematoda com formato foliáceo, pertencente ao filo Platyhelminthes, responsável por ocasionar lesões no fígado e nos ductos biliares principalmente de ruminantes (OLIVEIRA e RESENDE, 2017). A doença é considerada uma zoonose emergente ou reemergente em várias partes do mundo (CARNEIRO, 2014). O acometimento dos animais resulta em importantes consequências econômicas e produtivas, como a diminuição do ganho de massa, interferência na fertilidade e na produção de leite, além de ocasionar o descarte de vísceras na linha de abate. (CHARLIER *et.al.*, 2013)

O ciclo do parasito se inicia com a eliminação dos ovos nas fezes do hospedeiro definitivo que, quando eclodidos, dão origem aos miracídios que infectam o hospedeiro intermediário, o molusco *Pseudosuccinea columella*. Neste haverá o desenvolvimento dos estágios de esporocisto, rédia e cercária que posteriormente sairá do caramujo, encistando-se na pastagem e transformando-se em metacercária, forma infectante para os hospedeiros definitivos. Ao infectar o animal, o parasito passará para as formas jovens e adultas, parasitando o fígado e os ductos biliares (OLIVEIRA e RESENDE, 2017).

O controle da enfermidade é complexo e envolve o uso de fármacos tanto para o controle dos hospedeiros intermediários quanto para o uso de substâncias que inviabilizam os ovos, haja vista que o parasito pode produzir de três a sete mil ovos ao dia (BECK, 1993).

O grupo dos compostos benzimidazóis são anti-helmínticos de ação ampla na veterinária, agindo sobre nematódeos, cestódeos e trematódeos (ALVAREZ *et.al.*, 2009). O princípio ativo mais utilizado dessa classe para o tratamento de fasciolose é o triclabendazol, visto que possui eficácia em todas as formas evolutivas do ciclo biológico do parasito (LEÃO *et.al.*, 2012). Entretanto, com a sua ampla utilização, já há relatos de resistência ao triclabendazol *in vivo* e *in vitro*, apontadas desde 1980

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

(ALVAREZ *et al.*, 2012). Dessa forma, o albendazol surge como uma opção, pois possui efeito endoparasiticida em trematódeos.

Para avaliação da eficácia do albendazol em ovos de *F. hepatica*, é necessário a utilização de técnicas para detectar a resistência ao composto. Uma das técnicas utilizadas é o Teste de Eclotibilidade de Ovos (TEO), no qual os ovos são incubados em diferentes concentrações do fármaco e posteriormente é feita a contagem dos ovos com opérculo aberto, servindo como ferramenta para identificar resistência ao albendazol (MARTINS e MARTINS, 2019). Ceballos *et al.* (2019) através do TEO, demonstraram que a concentração de 0,5 μM é uma dose discriminante para predizer a resistência em ovos de *F. hepatica*, quando os testes são realizados em até oito semanas da coleta dos ovos.

Portanto, o estudo utilizou a metodologia do TEO para identificar e quantificar a sensibilidade de ovos de *Fasciola hepatica* ao albendazol nas concentrações de 10, 15 e 20 ppm, com a finalidade de avaliar a eficácia da menor concentração possível de ser utilizada em estudos *in vitro*.

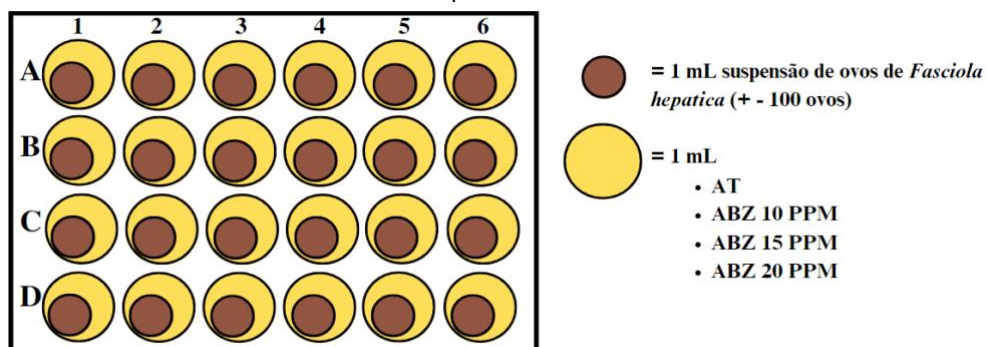
Metodologia

Os testes foram realizados no mês de março de 2023, no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET CCAE UFES), localizado no município de Alegre, Espírito Santo.

Os ovos utilizados no experimento foram oriundos de animais positivos para fasciolose em um abatedouro da região. O presente estudo foi aprovado no CEUA-Alegre-UFES com o número 004/2022. As diluições do fármaco escolhido foram preparadas pelo Grupo de Estudos Aplicados em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS) da Universidade Federal do Espírito Santo.

Para a realização do Teste de Eclotibilidade de Ovos (TEO), inicialmente os ovos foram diluídos em água de torneira, a fim de obter-se uma concentração de 100 ovos por mililitro. Essa suspensão de ovos foi homogeneizada e distribuída em uma placa de cultura do tipo ELISA de 24 poços, sendo colocado 1 mL do líquido com ovos. O teste foi realizado em seis repetições para cada grupo: controle negativo com água de torneira (AT), grupos tratados com 1 mL de diferentes concentrações do albendazol (10, 15 e 20 ppm) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema de distribuição dos grupos do teste experimental com albendazol em ovos de *Fasciola hepatica*.



LEGENDA: AT - Água de torneira; ABZ - Albendazole;

Fonte: o autor.

Em seguida, a placa foi coberta com um filme de parafina plástica com papel para evitar a evaporação da água e possíveis contaminações, e posteriormente, colocada na incubadora de demanda química de oxigênio (BOD) (Eletrolab® modelo E111/44), a uma temperatura de 25°C durante 14 dias. No décimo quarto dia, as placas foram expostas a luz incandescente de 100 W durante três horas, sendo observadas no intervalo de uma hora para a observação da eclosão dos miracídeos, por meio de um microscópio estereoscópico (BEL®), no aumento de duas vezes (FAIRWEATHER, 2012).

Para a determinação da eficácia foram realizados cálculos utilizando a seguinte fórmula:

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

$$\% \text{ eficácia} = \frac{\text{média do grupo AT} - \text{média do grupo tratado}}{\text{média do grupo AT}} \times 100$$

Resultados

Os resultados referentes às leituras das placas estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Número médio de miracídios de *Fasciola hepatica* por poço expostos ao albendazol em diferentes concentrações durante 3 h, após 14 dias de embrionamento.

GRUPOS	HORA 0	HORA 1	HORA 2	HORA 3
Controle com água de torneira	0	27	54	89
Albendazole 10 ppm	0	0	0	0
Albendazole 15 ppm	0	0	0	0
Albendazole 20 ppm	0	0	0	0

Fonte: o autor.

Na avaliação da eficácia das concentrações testadas do fármaco, observou-se que as concentrações foram 100% eficientes, uma vez que houve a completa inibição na formação de miracídios. Com o controle negativo não ocorreu a inibição da eclosão, sendo observada formação de embrionamento e miracídios nos ovos, inclusive, ovos operculados e miracídios livres (Figura 2).

Figura 2: Ovos de *Fasciola hepatica* nos grupos controle e tratamento com albendazole nas concentrações de 10, 15 e 20 ppm, após 14 dias de embrionamento. Ovo embrionado encontrado no grupo controle (A). Ovo com opérculo aberto encontrado no grupo controle (B). Miracídio encontrado no grupo controle (C).



Fonte: o autor.

Discussão

Poucos são os estudos que avaliam a eficácia *in vitro* do albendazol sobre ovos de *Fasciola hepatica*, porém, este fármaco é utilizado em diversos estudos como controle positivo com diferentes compostos (CASSANI *et al.*, 2021). O albendazol possui atividade ovicida, tendo a capacidade de penetrar nos ovos de helmintos e se acumular, impedindo a divisão celular inicial e a formação do embrião (RINALDI *et al.*, 2009).

Na literatura são relatados diversos estudos que utilizam o albendazol como controle, portanto, no presente experimento buscou-se testar concentrações baixas do fármaco, com a intenção de avaliar a menor concentração para uso em testes *in vitro*. Cassani *et al.* (2021), por exemplo, utilizaram o albendazol 0,5% (equivalente à 7000 ppm) como controle positivo na avaliação do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e seu constituinte majoritário, carvacrol, no controle *in vitro* dos ovos de *Fasciola hepatica*. Os autores observaram que com essa concentração, ocorreu o impedimento do

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

desenvolvimento embrionário, não havendo assim nenhuma liberação dos miracídios. Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida *et al.* (2021) ao utilizarem também o albendazol (controle positivo) 0,5% (7000 ppm) no estudo com o óleo essencial de *Thymus vulgaris* e seu constituinte majoritário, timol. Porém, as concentrações testadas pelos autores citados são muito maiores que as testadas no experimento. Alvarez *et al.* (2009) compararam a atividade ovicida do albendazole e do triclabendazole nas concentrações de 5, 1, 0,5, 0,1 e 0,05 nmol/mL (1,33; 0,26; 0,13; 0,03 e 0,01 ppm), e os autores concluíram que somente na concentração de 1,33 ppm, o fármaco demonstrou uma atividade satisfatória ($3.7 \pm 4.2\%$) na inibição do desenvolvimento dos ovos. Dessa forma, é sugestivo que novos testes possam ser feitos afim de se testar concentrações menores que as testadas por Alvares *et al.* (2009).

Ceballos *et al.* (2019), demonstraram que a concentração de 0,5 μ M (0,13 ppm) é uma dose discriminante para prever a resistência em ovos, podendo apresentar diferentes porcentagens de eclosão dos ovos, de acordo com o tipo isolado da *Fasciola hepatica*. Fairweather (2020) relata que uma eficácia de 71 a 90% pode ser considerada suficiente para drogas como o albendazol. Assim, tanto os resultados obtidos no presente estudo quanto aqueles relatados na literatura estão dentro da faixa aceitável. Entretanto, ainda é necessário determinar a concentração mínima de albendazol que apresenta eficácia da eclodibilidade dos ovos.

É preciso destacar que a susceptibilidade à atividade ovicida do albendazol pode variar conforme a localização de origem dos ovos, assim como observado por Canevari *et al.* (2014) em seus estudos, nos quais encontrou atividade ovicida em alguns isolados ($< 13,4\%$) e susceptibilidade e outras ($> 70,3\%$). Isso deve-se ao fato de que os animais passam por diferentes tratamentos em diferentes propriedades, criando assim, níveis diferentes de resistência aos fármacos. Arruda (2022) testou a resistência de ovos oriundos de diferentes regiões do estado de Santa Catarina frente ao albendazol e concluiu que isolados potencialmente resistentes a anti-helmínticos estão sendo detectados no estado, principalmente em regiões onde não há um controle correto no tratamento dos animais.

Conclusão

O estudo demonstrou que o albendazol, em todas as concentrações estudadas, foi eficiente para o controle de ovos *Fasciola hepatica*, sendo a concentração de 10 ppm a menor concentração eficiente. Verificou-se também a necessidade de se padronizar uma unidade para fins de comparação com outros estudos, visto que os trabalhos apresentados na discussão mostram unidades diferentes para uso do fármaco.

Referências

ALMEIDA, A. M. F. de. Efeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e timol na inibição miracidial de ovos de *Fasciola hepatica*. **Anais do XXV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**. Universidade do Vale do Paraíba. 2021.

ALVAREZ, L. *et al.* Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 211-216, 2009.

ARRUDA, P. M. **Avaliação da atividade ovicida de diferentes fármacos em ovos de *Fasciola hepatica* coletados de bovinos naturalmente infectados no planalto serrano em Santa Catarina, Brasil**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2022.

BECK, A. A. H. Fasciolose. **A Hora Veterinária**, v. 75, p. 65-70, 1993.

CARNEIRO, M. B. **Métodos de diagnóstico em *Fasciola hepatica***. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Veterinária, 2014.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CASSANI, L. S. *et al.* Eficácia do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e carvacrol no controle *in vitro* de ovos de *Fasciola hepatica*. **Anais do XXV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**. Universidade do Vale do Paraíba. 2021.

CEBALLOS, L. *et al.* The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, v. 271, n. 1, p. 7-13, 2019.

CHARLIER, J. *et al.* Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 326–335, 2013.

FAIRWEATHER, I. *et al.* Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 249-259, 2012.

FAIRWEATHER, I. *et al.* Drug resistance in liver flukes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, n. 1, p. 39-59, 2020.

LEÃO, A. G.C. de *et al.* Eficácia do albendazole, sulfóxido de albendazole e do clorsulon no controle da fasciolose em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. Supl. 1, p. 11-14, 2012.

MARTINS, M. S. S; MARTINS, I. V. F. Padronização do teste de eclodibilidade de ovos: Diagnóstico *in vitro* da resistência ao albendazol em nematoides gastrointestinais. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 21, n. 2, p. 125-130, 2019.

MARQUES, L. T. **Composição Química de Extratos Vegetais e Sua Eficácia no Controle in vitro de Ovos de *Fasciola hepatica***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

OLIVEIRA, D. M. RESENDE, P. O. *Fasciola hepatica*: ecologia e trajetória histórico-geográfica pelo Brasil. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 2, 2017.

RINALDI, G. *et al.* RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.167, n 1, p.118-126, 2009.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e com o apoio técnico da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e auxílio do Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS) para a fabricação das concentrações do albendazol. Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).