

## SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE OVOS DE *Fasciola hepatica* AO 1,2,3-TRIAZOL DERIVADO DO TIMOL

Letícia Gomes Maciel<sup>1</sup>, Ana Clara Boechat Nunes<sup>1</sup>, Mariana Belizario de Oliveira<sup>2</sup>, Walter Cesar Celeri Bigui<sup>2</sup>, Vagner Tebaldi de Queiroz<sup>3</sup>, Isabella Vilhena Freire Martins<sup>1</sup>, Adilson Vidal Costa<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, leticia.maciell@edu.ufes.br, ana.cb.nunes@edu.ufes.br, isabella.martins@ufes.br.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas/Departamento Química, Avenida Fernando Ferrari, 29075-910 – Vitória-ES, Brasil. belizmary@hotmail.com, walter.bigui@edu.ufes.br.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/ Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, vagner.queiroz@ufes.br avcosta@hotmail.com.

### Resumo

A fasciolose é uma zoonose emergente de extrema importância global visto que afeta principalmente animais de produção, acarretando em possíveis perdas produtivas. A doença se demonstra de difícil controle e devido a problemas de resistência aos fármacos tradicionalmente utilizados, novas alternativas de tratamento vem surgindo. Dessa forma, os triazóis podem se apresentar como uma alternativa promissora, visto que possuem um amplo espectro de atividades biológicas, sendo capaz de atuar no controle de outros parasitos, como protozoários flagelados. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de um 1,2,3-triazol derivado do timol frente à sensibilidade dos ovos de *Fasciola hepatica*. Foram selecionadas cinco concentrações do 1,2,3-triazol (20, 40, 60, 80 e 100 ppm), além do albendazole (20 ppm) como controle positivo e dois grupos para controle negativo, água destilada e DMSO. Em placas de 12 poços foi adicionado um mL de suspensão de ovos de *Fasciola hepática* e um mL da substância teste grupo. Após 14 dias de incubação em estufa foi observado uma boa eficácia nos grupos que apresentavam 80 e 100 ppm do 1,2,3-triazol.

**Palavras-chave:** Fasciolose. Controle. Triazóis.

**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde - Medicina Veterinária

### Introdução

O parasito *Fasciola hepática* é um parasito que pertence à classe Trematoda e ao filo Platyhelminthes, sendo deprimido dorso ventralmente, possuindo formato de folha e apresentando cutícula espinhosa que não contribui para sua patogenicidade (Carneiro, 2013; Freitas, 2013). Ocasionalmente causa uma enfermidade de importante relevância global visto que se trata de uma zoonose emergente e com grande impacto na pecuária, estando distribuída espacialmente em quase todos os continentes com exceção da Antártica (Carneiro, 2013; Mas-Coma *et al.*, 2009). A enfermidade acomete principalmente mamíferos herbívoros e principalmente de produção como ovinos, bovinos e bubalinos, se alojando no fígado e ductos biliares, podendo ocasionar alterações como fibrose e calcificações e consequentemente afetando a produção de leite, ganho de peso e causando na condenação desses fígados na linha de inspeção (Tessele *et al.*, 2013; Bowman, 2010).

O ciclo do parasito é complexo e envolve a presença de hospedeiro intermediário. Os ovos do trematódeo são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo, que em boas condições ambientais irão se desenvolver e eclodir a fase de miracídio que irá penetrar no hospedeiro intermediário, neste caso um molusco aquático, e neste se desenvolverá outras três fases: esporocisto, rédia e cercária, sendo a última responsável por sair do molusco e posteriormente se encistar na vegetação na forma de metacercária, forma pela qual o hospedeiro definitivo irá se infectar (Silva *et al.*, 1980; Bowman, 2014; Bolaños, Meza e Loahamin, 2021).

Diante desse contexto, o controle do parasitismo é dificultado, sendo aplicadas diversas tentativas como limitação do pastejo, drenagem do local para um controle físico, além disso há o controle pelo uso de moluscidas químicos que levam riscos ao meio ambiente. Outra alternativa é o uso de substâncias que inviabilizam o desenvolvimento e eclosão dos ovos, e para isso faz-se necessária a busca por novos componentes que ajudem no controle do ciclo (Henrioud, 2011; Beck, 1993).

Os triazóis são parte de uma classe de compostos heterocíclicos de origem estritamente sintética. Esses compostos heteroaromáticos apresentam em sua estrutura molecular dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio, podendo ser classificados de acordo com sua isomeria, sendo simétricos (1,2,4 triazóis) ou vicinas (1,2,3 triazóis) (Kashyap & Silakaril, 2018; Zhang *et al.*, 2017). A obtenção destes heterociclos pode ser realizada a partir de diferentes substratos, como o timol, um fenol natural amplamente bioativo. O método clássico para síntese de 1,2,3-triazóis envolve o emprego da reação de cicloadição 1,3 dipolar entre uma azida e um alcino terminal, na presença de íons cobre (I), classificada como um tipo de reação *click*. A versatilidade dos 1,2,3-triazóis, juntamente com suas características físico-químicas e propriedades biológicas, como atividades antifúngicas, antivirais e até leishmanicidas, tornam-nos candidatos promissores para diversas investigações na indústria farmacêutica, uma vez que podem oferecer potencial significativo para o desenvolvimento de novos fármacos para inibição do desenvolvimento e eclosão de ovos de diferentes parasitas (Sahu; Ganguly; Kaushik, 2013; Song; Deng, 2018).

Nesse sentido o presente trabalho teve por finalidade de usar avaliar a sensibilidade dos ovos de *Fasciola hepatica* ao 1,2,3-triazol derivado do timol.

## Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário pertencente à Universidade Federal do Espírito Santo, campus Alegre. A metodologia empregada para realização do experimento passou pela aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA), descrita pelo protocolo 019/2023.

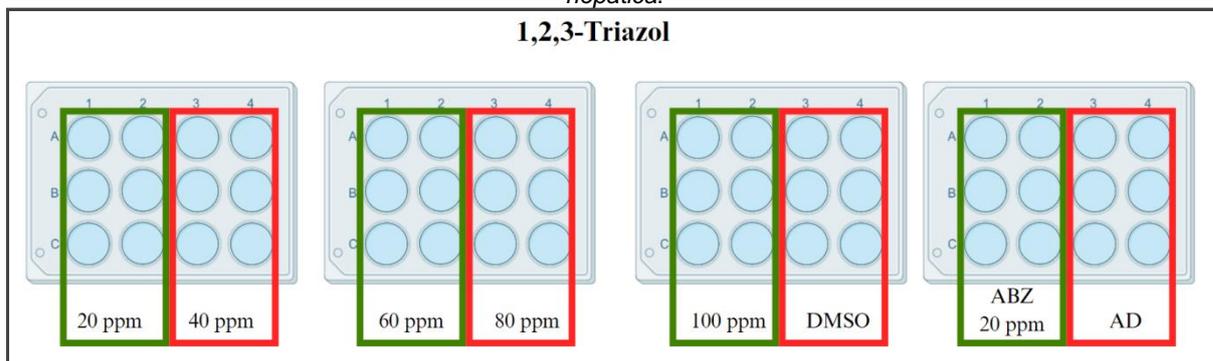
Os ovos de *F. hepatica* foram obtidos da coleta de bile de bovinos positivos para fasciolose em abatedouros da região do sul do Espírito Santo, sendo posteriormente sedimentados e lavados, onde a cada decantação foi descartado o sobrenadante, até que este estivesse translúcido. Após esses procedimentos, os ovos foram acondicionados em tubos Falcon de 50 mL envoltos em papel alumínio, para evitar a exposição luminosa, posteriormente sendo colocados geladeira com temperatura de aproximadamente 5°C.

Para a execução do Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO) primeiramente o conteúdo aquoso contendo os ovos foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta. Os ovos utilizados para o ensaio foram diluídos em uma suspensão com água destilada até uma concentração de 100 ovos por mL.

As diluições do 1,2,3-triazol e dos controles foram realizadas pelo Grupo de Estudos Aplicados em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS) da UFES.

Para o ensaio houve a formação de oito grupos experimentais dispostos em placas de 12 poços. Os grupos controles negativos foram formados respectivamente por água destilada (AD) e Dimetilsulfóxido a 0,5% (DMSO 0,5%). O controle positivo foi composto por albendazol 20 ppm (ABZ) e para o tratamento com 1,2,3-triazol foram escolhidas as respectivas concentrações de 20 (T20), 40 (T40), 60 (T60), 80 (T80) e 100 (T100) ppm do 1,2,3 -triazol. A disposição dos grupos pode ser observada na figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da distribuição de grupos no Teste de Eclodibilidade de Ovos de *Fasciola hepatica*.



Fonte: Os autores

Em cada poço da placa foram adicionados um mL do composto testado e um mL da suspensão com ovos. Para cada grupo foram realizadas seis repetições. Em seguida as placas foram cobertas com plástico Parafilm® para evitar a evaporação de água colocadas em uma estufa do tipo B.O.D a uma temperatura constante de 25°C durante 14 dias.

Após esse período as placas foram expostas a 100W de luz incandescente pelo período de 3 horas, sendo que a cada hora as placas foram recolhidas para a visualização em microscópio estereoscópico para observação da possível presença de miracídios nos poços. O cálculo da eficácia foi baseado na fórmula: % Eficácia = média do grupo controle - média do grupo tratado / média do grupo controle x 100

## Resultados

Após 14 dias de incubação na BOD e o período de exposição à luz, as placas foram avaliadas e os dados foram tabulados e foram calculadas a porcentagem de eclosão e a eficácia do tratamento, sendo observado similaridade nos resultados entre as maiores concentrações de triazol e o controle com albendazol, entretanto com a diminuição da concentração dos triazóis houve um aumento da eclodibilidade dos ovos como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1- Eficácia do Triazol em diferentes concentrações sobre ovos de *Fasciola hepatica* após 14 dias de incubação.

Grupo	% de eclosão média (n=100)	Eficácia (%)
AD	80	0,0
DMSO	79	0,0
ABZ	0	100,00
T20	34	57,0
T40	24	69,6
T60	10	87,3
T80	7	91,1
T100	0	100,00

Fonte: Os autores

Na análise da atividade ovicida dos triazóis em ovos de *F. hepatica*, foi observado que na concentração de 100 ppm houve inibição completa do desenvolvimento dos ovos, assim obtendo 100 % de eficácia, já nas concentrações de 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, houve uma porcentagem de eclosão miracidial sendo observado miracídeos livres e ovos operculados, com eficácia mínima de 57% e máxima de 91%. O controle positivo representado pela albendazol obteve 100% de eficácia, não sendo observado desenvolvimento embrionário (Figura 2).

Figura 2 - Ovos de *Fasciola hepatica* submetidos ao TEO com diferentes concentrações de 1,2,3-Triazol. (A) Ovos do grupo 100 ppm. (B) Ovo com opérculo aberto do grupo 40 ppm. (C) Miracídio livre do grupo controle DMSO. (D) Ovo do grupo controle ABZ 20 ppm.



Fonte: Os autores (2024)

## Discussão

Ainda não foram publicados trabalhos que associam efeitos ovicida dos triazóis em *F. hepatica*. Todavia, na literatura já existem estudos associando os 1,2,3-triazóis a outros parasitos do grupo dos protozoários, como na ação leishmanicida citada no ensaio de Csuk *et al.* (2017). Neste estudo, os autores realizaram a síntese de derivados contendo porção triazólica e observaram alterações na forma amastigota de *Leishmania infantum*. No estudo realizado por Belalet *et al.* (2018), também foi possível observar efetividade de 1,2,3-triazóis tanto na forma amastigota quanto na forma promastigota de *Leishmania major*, sendo observado resultados semelhantes a outros fármacos disponíveis comercialmente como a miltefosina. Além disso, derivados de isocumarinas e 3, 4-diidroisocumarinas contendo fragmento 1,2,3- triazólico também apresentaram associação positiva em testes *in vitro* em relação a atividade antimalárica, como descrito no estudo de Silva (2020).

Dentre os principais compostos utilizados para o controle da infecção por *F. hepatica* estão o grupo dos benzimidazóis, destacando-se o albendazol e o triclabendazol. No ensaio de Nunes *et al.* (2023), foi observado que o albendazol se mostrou efetivo em todas as concentrações utilizadas (10, 15 e 20 ppm), interferindo no desenvolvimento embrionário e na divisão celular, justificando sua utilização em muitos trabalhos como grupo controle (Rinaldi *et al.*, 2009). Contudo, apesar de exibir eficácia significativa contra parasitos, existem muitos casos de populações resistentes a estes

fármacos, tornando necessário a busca por estratégias alternativas e inovadoras para o controle de *F. hepatica*, como a utilização de núcleos bioativos, como os 1,2,3-triazóis. (Alvarez *et al.*, 2009).

Durante o presente estudo foi possível observar que o 1,2,3-triazol, na maior concentração (100 ppm), apresentou eficácia semelhante ao controle positivo utilizado, mesmo necessitando de uma concentração maior do que o albendazol. Ambos compostos pertencem à família dos azóis, apresentando átomos de nitrogênio, aromaticidade e riqueza de elétrons que facilita a ligação desses compostos com uma variedade ampla de enzimas e receptores biológicos. Portanto, o efeito biológico semelhante observado para o 1,2,3-triazol e o albendazol pode estar associado à capacidade de ambos em inibir a polimerização da tubulina, uma proteína essencial para a formação dos microtúbulos que agem na divisão celular (mitose) e no transporte intracelular de vesículas (Alves e Barbosa, 2018).

### Conclusão

O triazol se comporta como uma molécula de extrema importância biológica visto suas múltiplas funções e, sendo que no presente foi possível observar que a concentração de 80 ppm obteve uma eficácia considerada satisfatória e o de 100 ppm apresentou eficácia máxima com inibição do desenvolvimento e não havendo eclosão de miracidios, demonstrando e potencial ovicida do composto.

### Referências

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

ALVES, M. S. D.; BARBOSA, T. N. Resistência parasitária. In: BEZERRA, A. C. D. S.; SILVA, M. D. C. **Fitoterapia e a Ovinocaprinocultura: uma associação promissora [online]**. Mossoró: EdUFERSA, 2018, pp. 49-76. ISBN: 978-85-57570-91-7. <https://doi.org/10.7476/9786587108643.0005>.

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

BELAL, A. S. F.; TEMRAZ, M. G.; ELZAHHAR, P. A.; EL—DIN, A. BEKHIT, A. A.; LABIB, H. F. Anti-Leishmanial Click Modifiable Thiosemicarbazones: Design, Synthesis, Biological Evaluation and in Silico Studies. **Eur. J. Med. Chem**, v. 151, p. 585–600, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.003>.

BOLAÑOS, K.D.; MEZA, E.A.; LOACHAMIN, L.V. Trematodes: una revisión a la importancia de *Fasciola hepática*. **Revista Veterinaria**, Argentina, v. 32, n. 2, p. 225-229, 2021.

BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 10. ed. St Louis: Elsevier Health Sciences, 2014. 477 p.

CARNEIRO, M.B. *et al.* *Fasciola hepatica* em ovinos, caprinos e bubalinos em municípios do sul do Espírito Santo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 80, p. 442-446, 2013.

CSUK, R.; HERNÁNDEZ, D. R.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; NAIN-PEREZ, A.; FERREIRA, S. R.; FUJIWARA, R. T.; DE ALMEIDA, R. M.; HELLER, Leishmanicidal and Cytotoxic Activity of Hederagenin-Bistriazolyl Derivatives. **Eur. J. Med. Chem**, v. 140, p. 624–635, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.045>.

FREITAS, D. F. **Análise espacial do risco de fasciolose bovina no estado do Espírito Santo por meio dos sistemas de informações geográficas**. 2013. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade federal do Espírito Santo, Centro de ciências agrárias, Alegre, 2013.

HENRIOUD, A.N. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.2-11,2011.

KASHYAP, A.; SILAKARI, O. **Triazoles: Multidimensional 5-Membered Nucleus for Designing Multitargeting Agents**. Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules, 2018, p. 323-342.

MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. **Vet Parasitol**, v. 163, p. 264-280, 2009.

NUNES, A.C.B *et.al*. Avaliação in vitro da eficácia de concentrações de albendazol sobre ovos de *Fasciola hepatica*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVAP (INICEPG), 23., 2023, São José dos Campos. *Anais...* São José dos Campos: Univap, 2023. p. 245-255.

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.

SAHU, J. K.; GANGULY, S.; KAUSHIK, A. Triazoles: A valuable insight in to recent developments and biological activities. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 5, p. 456-465, 2013.

SANTOS, L. DA S. **Síntese de derivados 1, 2, 3-triazólicos de isocumarinas e 3, 4-diidroisocumarinas com potencial atividade antimalárica in vitro**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de química do instituto de Ciências Exatas, Belo Horizonte, 2020

SILVA, I. C. *et al* .Fasciolose. I – incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. **Lavoura Arrozeira**, v. 33, n. 323, p. 34-42, 1980.

SONG, M.-X.; DENG, X.-Q. Recent developments on triazole nucleus in anticonvulsant compounds: a review. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 453–478, 2018.

TESSELE, B.; BRUM, J. S.; BARROS, C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 7. p. 873-889, 2013.

ZHANG, S. *et al*. Triazole derivatives and their anti-tubercular activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 501-513, 2017.