

INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE DOS OVOS DE ANCYLOSTOMA SPP. POR EHAM

ALESSANDRA AGUIAR DE ANDRADE¹; DÉBORA DE CAMPOS AÑAÑA²;
SOLIANE CARRA PERERA³ GABRIELA DE ALMEIDA CAPELLA⁴ NATÁLIA
BERNE PINHEIRO⁵ MARLETE BRUM CLEFF⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – aleandrade1508@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – debora_anana@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – soliane.cp@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – capellavet@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – marletecleff@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A domesticação de cães e, sua relação com os seres humanos, teve o contato intensificado através da introdução desses animais ao ambiente doméstico (TATIBANA, 2009). Entretanto essa aproximação, gera a preocupação com a saúde e bem-estar animal e, implica no controle de enfermidades (AGUIAR, 2017).

Na medicina veterinária, o controle e tratamento de parasitoses é uma problemática conhecida, observa-se alta casuística de ancilostomíase, que apresenta grande importância na clínica veterinária, assim como pelo caráter zoonótico (EVARISTO, 2019; CAPELLA, 2017). A enfermidade é ocasionada por *Ancylostoma* spp. que são importantes parasitas intestinais de cães e gatos, sendo responsáveis diretamente por danos à saúde dos animais que são hospedeiros definitivos, além de infectar o ser humano o que tem relevância para a saúde pública (MORAES et al., 2018).

Ainda, o uso de fármacos antiparasitários sem orientação, ocasionam erros como subdoses e de protocolos inadequados o que pode favorecer a seleção de populações de parasitos resistentes aos fármacos, sendo esta resistência frequentemente reportada (MATOS & MADEIRA, 2013; OLIVEIRA & LESTINGI, 2011). Com isso, a busca por formulações inovadoras e novas moléculas têm sido realizada com destaque para o uso de plantas medicinais, onde grande parcela da população tem fácil aceitação, assim como apresentam conhecimento etnofarmacológico da utilização destas para infecções parasitárias.

Com objetivo de auxiliar no tratamento das parasitoses, e buscar novas alternativas terapêuticas, têm sido realizado pelo grupo Fitopeet-UFPEL testes com os extratos vegetais, óleos essenciais e compostos isolados de plantas. Neste sentido o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade do extrato EHAM frente a ovos de *Ancylostoma* spp. coletados de fezes de cães naturalmente parasitados.

2. METODOLOGIA

A pesquisa seguiu-se após a aprovação do projeto no Comitê de Ética da UFPEL, nº 4389. Para avaliação foram coletadas fezes de cães, naturalmente parasitados, na cidade de Pelotas/RS e realizada confirmação da ancilostomíase através da técnica de flutuação de Willis-Mollay (WILLIS, 1921). As fezes dos animais foram maceradas, acrescentada água destilada e filtradas em tamises com os seguintes diâmetros de malha (1 mm, 105 µm, 55 µm até 25 µm), para recuperação de ovos de *Ancylostoma* spp. Na sequência, os ovos do parasita foram colocados em tubos Falcon para centrifugação e lavados sucessivamente com

água destilada e em solução salina hipersaturada conforme literatura (GIRÃO E UENO, 1985), sendo que após a recuperação dos ovos, foram coletadas três alíquotas para quantificação.

O EHAM utilizado no estudo foi obtido previamente, através da pesagem das folhas secas da planta (Campus Universitário Capão do Leão, UFPel, Rio Grande do Sul, Herbário Pel nº 25.934), e adicionado álcool de cereais 70%, resultando em uma tintura que permaneceu armazenada por 7 dias em vidro estéril, protegido da luz e homogeneizada uma vez por dia conforme a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010a). Após, a etapa inicial, foi realizada filtragem do extrato e restituído o volume inicial com álcool de cereais 70%, sendo este levado ao rota-evaporador sob temperatura de 40°C até a retirada do álcool e restituído o volume inicial com água destilada estéril. O extrato de EHAM foi utilizado imediatamente após o preparo nos ensaios, sendo que outra alíquota foi liofilizada e armazenada sob refrigeração e ao abrigo da luz até utilização.

Os resultados de inibição da eclodibilidade dos ovos foram comparados, a fim de verificar a viabilidade do extrato e confirmar a atividade após o armazenamento. Os ovos de *Ancylostoma* spp. (n= 100), foram colocados em placas de 24 poços em quadruplicata, e adicionado o extrato EHAM em seis diferentes concentrações (15; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg/mL) e incubados em estufa BOD à 28°C por 48h. Também foi realizado controles negativo e positivo, com água e tiabendazol (0,025 mg/mL). Após este período, foi realizada a leitura com o uso de microscópio de luz invertida, onde foram observadas se houve ou não eclosão dos ovos.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA, seguido pós-teste de múltipla comparação de Tukey com nível de 5% de probabilidade, para comparar os valores de eficácia de inibição da eclodibilidade do primeiro e do segundo teste GraphPad Prism, versão 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliações de extratos quanto a atividade antiparasitária tem sido pouco explorada em parasitas de cães, com literatura escassa frente a *Ancylostoma* spp., entretanto alguns estudos demonstram resultados satisfatórios (AZAMBUJA, 2015). Não sendo encontrados na literatura consultada, estudos com extrato EHAM frente a *Ancylostoma* spp., bem como a avaliação do mesmo após o armazenamento, reafirmando assim a importância deste estudo.

No ensaio, utilizando o extrato que não sofreu processo de liofilização e armazenagem observou-se 100% de inibição da eclodibilidade dos ovos de *Ancylostoma* spp. nas três primeiras concentrações (15, 10 e 5mg/mL) de EHAM, com decréscimo nas outras concentrações, porém ainda demonstrando atividade. Enquanto que, foi observada atividade ovicida de EHAM armazenado em todas as concentrações, com destaque para 10mg/mL e 5mg/mL onde apresentou 100% de inibição de eclodibilidade dos ovos.

Ao compararmos os dois extratos, houve diferença estatística apenas na concentração de 2,5mg/mL, onde o extrato armazenado apresentou melhores resultados quanto aos tratamentos aplicados, podendo então afirmar que o tempo de armazenamento não interferiu na eficácia do extrato na inibição da eclodibilidade dos ovos de *Ancylostoma* spp.

O método de conservação do extrato foi a liofilização, demonstrando este ser eficaz na manutenção da integridade do extrato assim como, provavelmente na manutenção das moléculas ativas. Estudos químicos demonstram que os polifenóis e flavonoides são os principais constituintes dos extratos das folhas de EHAM, tendo destaque para o etil galato (SILVA, 2017; GIORDANI, 2017). Sendo que,

estas substâncias provavelmente sejam responsáveis pela ação ovicida observada neste trabalho.

Os animais infectados por *Ancylostoma* spp. liberam os ovos nos excrementos, sendo que o calor e a umidade elevada do ambiente, favorecem o desenvolvimento das larvas e a consequente eclosão dos ovos de ancilostomídeos em até 5 dias (REY, 2001), condições estas de manutenção do ciclo do parasita.

Os extratos de EHAM, poderiam ser utilizados na quebra do ciclo do parasita, levando a inibição da eclosão dos ovos no solo, impedindo assim a contaminação do ambiente e de pessoas, em razão da impossibilidade de formação das larvas infectantes de ancilostomídeos. A bioprospecção a partir de plantas tem sido investigada, SANTOS e colaboradores (2013), testaram dez diferentes tipos de extratos vegetais frente a ovos e larvas de *Ancylostoma* spp., porém não encontraram uma concentração que inibisse a eclosão dos ovos, mas ainda assim observou ação larvicida.

Assim, reiteramos a importância do trabalho, que demonstra o promissor efeito dos extratos vegetais como de EHAM, mesmo após armazenagem, no controle de parasitos do gênero *Ancylostoma*.

4. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que o EHAM tem importante potencial ovicida para o gênero *Ancylostoma*, e que a armazenagem do extrato não interferiu na sua ação. Sugere-se a sequência de testes para determinação das concentrações mais eficazes para atividade ovicida frente a outros parasitos, bem como determinar as formas terapêuticas mais acessíveis e práticas para utilização do extrato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, Ricardo Osman Gomes; et al. O bem-estar de cães na prática hospitalar. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 14, n. 26, p. 446-457, 2017.

AZAMBUJA, Rosaria Helena Machado. **Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae, sobre ovos de *Ancylostoma* spp.** 2015. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação Bioquímica e Bioprospecção) - Universidade Federal de Pelotas.

BRASIL, M. S. Farmacopéia brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010.

CAPELLA, Gabriela de Almeida. **Ambiente como fonte de formas parasitárias e potencial de extratos vegetais da família *Lamiaceae* contra parasitos do gênero *Toxocara***, 2017. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

DOS SANTOS, Elizabeth Cristina Ferreira et al. AÇÃO DE DIFERENTES DESINFETANTES SOBRE VIABILIDADE E MORTALIDADE DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Ancylostoma* SPP., Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 34, n. 1, p. 55-59, 2012.

EVARISTO, Tainá Ança; LIGNON, Julia Somavilla; PELLEGRIN, Taíssa Gomes; et al. Frequência de *Ancylostoma* spp. em amostras fecais ambientais nas praças públicas de Pedro Osório, RS. **PUBVET**, v.13, n. 04, p. 152, 2019.

GIORDANI, Claudia. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. 2017. 150f. Tese (Doutorado em Ciências-área de concentração: Sanidade Animal) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

GIRÃO, Eneide Santiago; UENO, Hakaru. Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 8, p. 905-912, 1985.

MATOS, Mariana Santos; MADEIRA, Doutor Luís. Anti-helmínticos em animais de companhia: quando o fim justifica o meio. **Revista Clínica Animal**, Lisboa-Portugal, v.6 p. 18-22, 2013.

MORAES, Paulo Victor Silva; DE CARVALHO, Victor Machado; CAVALCANTE, Nathan Lobo; et al. Incidência de *Ancylostoma* sp. e *toxocara* sp. em cães recolhidos pelo Centro de Zoonoses. **Ciência Animal**, Fortaleza-CE, v.28, n.4, p.31-34, 2018.

OLIVEIRA, R. O.; LESTINGI, V. Resistência parasitária em helmintos intestinais de cães: A importância do tratamento adequado e o papel do clínico na prevenção deste problema. **Coleção sem vermes: atualização em parasitologia**, Brasil, v. 1, n. 5, p. 1-4, 2011.

REY, Luís. Um século de experiência no controle da ancilostomíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 61-67, 2001.

SILVA, Marciane M. da; IRIGUCHI, K. K. Edna; KASSUYA, Candida Aparecida L.; et al. *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 27, n. 4, p. 445-452, 2017.

TATIBANA, Lilian Sayuri; DA COSTA-VAL, Adriane Pimenta. Projeto de educação continuada. É o CRMV-MG investindo no seu potencial. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, Minas Gerais-MG, v.1, n. 03, p.13-14, 2009.

WILLIS, H. Hastings et al. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, Australia, v. 2, n. 18, p. 375-376, 1921.