

ATIVIDADE *IN VITRO* DE 3,7-DIMETHYL-2,6-OCTADIENAL EM *TRICHOMONAS GALLINAE*

¹BRUNA BACCEGA¹; ²ALEXIA BRAUNER DE MELLO; ³ÉLVIA ELENA SILVEIRA VIANNA; ⁴NARA AMÉLIA DA ROSA FARIAS, ⁵CAMILA BELMONTE OLIVEIRA.

¹Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alexiabraunermello@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – elviavianna@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – naraameliafarias@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – camilabelmontevet@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Tricomoníase aviária é uma importante enfermidade na causa da mortalidade de aves, tanto silvestres como de cativeiro, em todo o mundo. Sua transmissão ocorre diretamente durante a corte, alimentação de filhotes e/ou por predação por aves de rapina (AMIN et al., 2014). Sendo transmitida principalmente pelos pombos da espécie *Columba livia* para outras espécies de aves, como Columbiformes, Falconiformes e Passeriformes (MARTINEZ-DIAZ et al., 2015)

No trato digestivo superior, apresentam-se em lesões caseosas amareladas na região digestiva alta, particularmente na boca e no esôfago de aves infectadas, levando ao emagrecimento e asfixia. A tricomoníase caracteriza-se principalmente por lesões caseosas e ulceração na cavidade oral e outras partes do trato digestivo superior, que podem afetar a alimentação causando fome ou sufocamento (AMIN et al., 2014). Podendo se apresentar na forma subclínica aguda ou crônica, dependendo da espécie hospedeira, patogenicidade do isolado e estado imunológico do indivíduo (ROBINSON et al., 2010).

O capim-limão é uma planta aromática pertencente às gramíneas (AKHILA et al., 2010). O óleo essencial isolado de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) é utilizado em vários alimentos e produtos da indústria de aromas. Esse óleo contém principalmente o composto citral (TAJIDIN et al., 2012), uma combinação natural de dois aldeídos isoméricos, ou seja, os isômeros geranial (a-citral) e neral (b-citral) (PENGELLY, 2004). Estudos demonstraram que o óleo de capim-limão e o citral têm atividades como antineoplásicas, antimicrobianas, antifúngicas, antiprotzoárias, anti-helmínticas e contra artrópodes (SATTHANAKUL et al., 2015; GITERU et al., 2015).

A identificação de novos agentes terapêuticos seguros e mais eficientes podem representar novas alternativas de tratamento para este protozoário, como os compostos majoritários e minoritários de óleos essenciais com potencial ação. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiparasitária do citral (3,7-Dimethyl-2,6-octadienal) *in vitro* em trofozoítos de *Trichomonas gallinae*.

2. METODOLOGIA

T. gallinae foram recuperados de *C. livia* na cidade de Pelotas, RS. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, sob o protocolo 23110.005097/2017-51 em 10/09/2017 e SISBIO em 08/02/2018, sob o número 61235-1. A coleta dos isolados foi realizada utilizando swabs, as amostras foram retiradas da cavidade oral e de lesões membranosas da região orofaríngea dos pombos domésticos. O cultivo do parasito foi preparado por imersão de swabs orais em meio tripton/extrato de levedura/maltose (TYM) (DIAMOND, 1957), suplementado com 10% de soro fetal

bovino e incubado a 37°C (SANSANO et al., 2009). Os cultivos foram então examinados sob um microscópio óptico em 100 e 400 x para observação de trofozoítos móveis.

Para analisar a atividade *in vitro* da susceptibilidade de trofozoítos de *T. gallinae* em relação ao composto majoritário 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal (Sigma-Aldrich®) do óleo essencial de *C. flexuosus*, foram utilizadas placas estéreis de 96 poços para incubação em diferentes concentrações. Os parasitos foram incubados em uma densidade inicial de 1×10^6 trofozoítos/mL de TYM juntamente com o composto. Três controles foram testados: NC (controle negativo, apenas trofozoítos), MTZ (trofozoítos mais metronidazol - 0,171 µg/ml) e DMSO (trofozoítos e veículo para solubilização dos derivados - 0,6%). O composto citral foi adicionado aos poços para obter concentrações finais de 0,015, 0,030, 0,045, 0,060, 0,076, 0,091, 0,106, 0,121, 0,137, e 0,152 µg/ml, respectivamente. Posteriormente, para gerar condições anaeróbicas, as placas de microcultura foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 h. Após esse período, uma preparação com trofozoítos, contendo azul de tripan (0,4%) (1:1), foi avaliada em câmara de Neubauer, para determinação do IC₅₀ (metade da concentração inibitória máxima) e MIC (concentração inibitória mínima).

Apenas a concentração que apresentou redução na viabilidade dos trofozoítos de 100% foi utilizada para determinar a MIC. A partir da MIC, foram preparadas novas placas de microcultivo e analisadas nos seguintes tempos: 1, 6, 12, 24, 48, 72, e 96 h, pelo método de exclusão do corante, afim de determinar o tempo de morte dos trofozoítos perante ao 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal. Todos os ensaios foram realizados de forma independente em triplicata (SENA-LOPES et al., 2017). A análise estatística foi realizada por análise unidirecional variância (ANOVA) usando um valor de probabilidade de $p \leq 0,05$, seguido pelo Teste de Tukey (GraphPad Prism 8.0 Software).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do estudo *in vitro* sobre o efeito inibitório do composto citral sobre *T. gallinae* e a comparação dessa atividade com o fármaco metronidazol são apresentados na Figura 1.

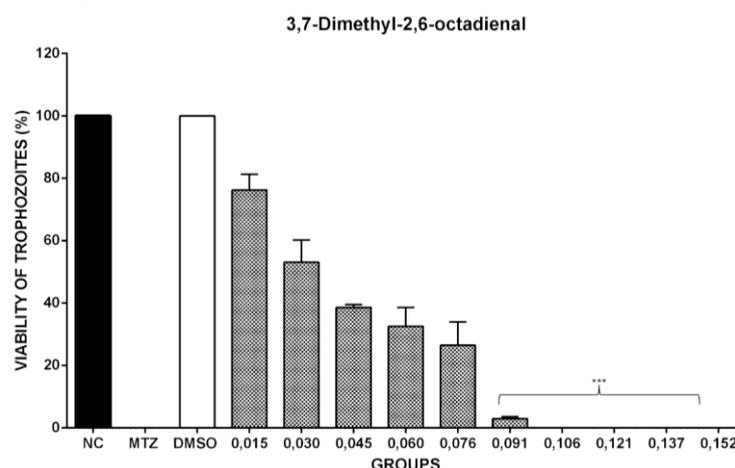


Figura 1. Atividade anti-tricomonas em meio de cultura da formulação do composto majoritário nas concentrações de 0,015 µg/ml a 0,152 µg/ml, como controles: NC (controle negativo), MTZ (metronidazol 0,171 µg/ml), DMSO (diluente 0,6%). As análises foram avaliadas 24 horas após o tratamento. As colunas indicam os grupos

e * indicam a diferença estatística quando comparado ao controle de MTZ pelo teste de Tukey (P <0,05).

O composto majoritário, citral, apresentou eficácia contra *T. gallinae*, após 24h de incubação nas concentrações de 0,106, 0,121, 0,137, e 0,152 µg/ml, provocando 100% de inviabilização dos trofozoítos. O IC₅₀ foi de 0,030 µg/ml, a MIC foi de 0,106 µg/ml. O crescimento destes protozoários foi completamente inibido pelo composto em 12 horas de incubação quando analisado através da concentração do MIC (0,106 µg/ml).

O uso de plantas medicinais com potencial atividade tricomonocida vem aumentando significativamente para o tratamento. Vários países desenvolvem estudos com plantas nativas contra essa doença (SEDDIEK et al, 2014). Nosso estudo apresenta resultados inéditos de compostos majoritários de óleos essenciais de plantas como tratamento alternativo para o protozoário *T. gallinae*.

A importância do estudo de novas alternativas de tratamento e a resistência aos fármacos tem sido relatado em diferentes partes do mundo (TABARI et al., 2017). Cepas resistentes acabam se tornando uma ameaça na sanidade de aves, sendo que o parasito é encontrado em uma ampla variedade de espécies (FORRESTER & FOSTER, 2008).

Resistência aos quimioterápicos atuais evidenciam a necessidade de novos agentes antiparasitários. O presente estudo *in vitro* indicou a completa inibição dos trofozoítos de *Trichomonas gallinae* após 24 horas quando o MTZ foi adicionado a cultura, similar ao estudo realizado por ABD-EL-MOTELIB (1993) que demonstrou que o parasita é muito sensível tanto ao MTZ quanto ao tinidazol. Em nossos dados, o constituinte químico majoritário do capim-limão testado apresentou atividade contra o protozoário flagelado na contração da MIC, inativando o mesmo em 12 horas, mostrando-se mais eficaz do que o fármaco padrão utilizado para tratamento. A atividade deste composto pode estar associada a sua capacidade de destruir a integridade da membrana celular, liberando seus componentes celulares e desta forma causando a lise celular, como já foi descrito nos trabalhos de ZHOU et al., (2014) e TAO et al., (2014).

4. CONCLUSÕES

O composto majoritário de *Cymbopogon flexuosus* mostrou-se capaz de reduzir a viabilidade dos trofozoítos de *Trichomonas gallinae* em distintas concentrações. A maior eficácia foi na concentração de 0,106 µg/ml no período de 12 horas. Os dados obtidos nesse estudo demonstram o potencial do citral como um agente anti-Trichomonas, no entanto estudos mais abrangentes são necessários para a utilização da atividade tricomonocida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-MOTELIB, J.Y.; GALAL, B.J. Some studies on *Trichomonas gallinae* infection in pigeons. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v.30, n.59, p. 277-280, 1993.
- AMIN, A.; BILIC, I.; LIEBHART, D.; HESS, M. Trichomonads in birds - a review. **Parasitology**, v.141, n. 6, p. 733-47, 2014.
- AKHILA, Anand. **Essential oil-bearing grasses: the genus Cymbopogon**. Estados Unidos: CRC press, 2010. 262 p.
- DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **The Journal Parasitology**, v. 43, n. 4, p. 488-499, 1957.

- FORRESTER, D.J.; FOSTER, G.W. Trichomonosis. In: Atkinson, C.T.; Thomas, N.J. & Hunter, D.B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. 1. ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2008. p.120-153.
- GITERU, S.G.; COOREY R, BERTOLATTI D, WATKIN E, JOHNSON S, FANG Z. Physicochemical and antimicrobial properties of citral and quercetin incorporated kafirin-based bioactive films. **Food chemistry**, v. 168, p. 341-347, 2015.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A.; PONCE-GORDO, F., RODRÍGUEZ-ARCE, I., DEL MARTÍNEZ-HERRERO, M.C., GONZÁLEZ, F.G., MOLINA-LÓPEZ, R., GÓMEZ-PENGELLY, Andrew. **Constituents of medicinal plants**: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. Reino Unido: CABi, 2004. 184 p.
- ROBINSON, R.A.; LAWSON, B.; TOMS, M.P.; PECK, K.M.; KIRKWOOD, J.K.; CHANTREY, J.; CLATWORTHY, I.R.; EVANS, A.D.; HUGHES, L.A.; HUTCHINSON, O.C.; JOHN, S.K.; PENNYCOTT, T.W.; PERKINS, M.W.; ROWLEY, P.S.; SANSANO-MAESTRE, J.; GARIJO-TOLEDO, M.M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. **Avian Pathology**, v. 38, n. 3, p. 201-207, 2009.
- SEDDIEK, S.A.; KHATER, H.F.; EL-SORBAGY, M.M.; ALI, M.M.A. The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitology Research*, v.113, n.4, p. 1319-1329, 2014.
- SENA-LOPES, Â.; DAS NEVES, R.N.; BEZERRA, F.S.B.; DE OLIVEIRA, M.T.; SILVA, P.C.; NOBRE, G.; PERIN, D.; ALVES, L.; SAVEGNAGO, K.R.; BEGNINI, F.K.; SEIXAS, T.; COLLARES, S.; BORSUK. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.89, p. 284-287, 2017.
- SATTHANAKUL, P.; TAWEECHAI SUPAPONG, S.; PAPHANGKORAKIT, J.; PESEE M, TIMABUT P, KHUNKITTI W. Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour micro-organisms and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 1, p. 11-17, 2015.
- TABARI M.A.; YOUSSEFI M.R.; MOGHADAMNIA 1 A.A. Antitrichomonal activity of Peganum harmala alkaloid extract against trichomoniasis in Pigeon (*Columba livia domestica*), **British Poultry Science**, v.58, n.3, p.236-241, 2017.
- TAJIDIN, N.E.; AHMAD S.H, ROSENANI A.B, AZIMAH. H, MUNIRAH. M. Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 2685-2693, 2012.
- TAO, N.; OUYANG, Q. JIA, L. "Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism," **Food Control**, v. 41, p. 116–121, 2014.
- ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. "Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*," **Food Control**, v. 37, p. 277–283, 2014.