

## ATIVIDADE *IN VIVO* DO ÓLEO ESSENCIAL E NANOEMULSÃO DE CAPIM-LIMÃO CONTRA TROFOZOÍTO DE *TRICHOMONAS GALLINAE*

BRUNA BACCEGA<sup>1</sup>, YAN WHAST ISLABÃO<sup>2</sup>, ALINE FERREIRA OURIQUE<sup>3</sup>,  
SAMANTA DA SILVA GÜNDEL<sup>4</sup>, ÉLVIA ELENA SILVEIRA VIANNA<sup>5</sup>, CAMILA  
BELMONTE OLIVEIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – yanwahast06@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Franciscana – alineourique@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – samantagundel@hotmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – elviavianna@gmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – camilabelmontevet@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

*Trichomonas gallinae*, é um organismo eucarioto, pertencente ao Reino Protista (GASPAR DA SILVA et al., 2007). A infecção pelo protozoário flagelado acomete primariamente o trato digestivo superior e respiratório de aves (Columbiformes, Falconiformes, Psitaciformes, Passeriformes e Galiformes) (FORRESTER & FOSTER, 2009).

Para o tratamento desta infecção, são utilizados os 5-nitroimidazóis, Dingsdag e Hunter (2018) descrevem a existência deste grupo de antimicrobianos há mais de 60 anos. Metronidazol e tinidazol têm sido utilizados para tratar as infecções causadas por este protozoário. Porém, relatos sobre a existência de cepas resistentes de *T. gallinae* a estes medicamentos, vem sendo observadas desde a década de 90 (DUNNE et al. 2003)

Alternativas de tratamentos são necessárias para fornecer um tratamento substituto para esse protozoário. O uso de óleos essenciais e extratos vegetais em vez de produtos químicos como o fármaco padrões utilizados contra algumas parasitoses vêm sido relatados nos últimos anos (TABARI et al., 2017; YOUSEFFI et al., 2017). Dentre as espécies do gênero *Cymbopogon*, o *C. flexuosus* espécie botânica conhecida como capim-limão é uma das plantas produtoras de óleo essencial mais cultivada em regiões tropicais e subtropicais (GANJEWALA & LUTHRA, 2010).

A eficácia dos óleos essenciais pode aumentar se incorporado a nanoemulsões que são sistemas coloidais, geralmente constituídos por duas fases imiscíveis, uma hidrofílica e outra hidrofóbica, e também chamada de aquosa e fases oleosas, onde uma das fases é dispersa na outra com gotas de tamanho manométrico (NIRMALA et al., 2010). O presente estudo teve como objetivo investigar a eficácia *in vivo* das possíveis atividades anti-tricomonas do óleo essencial e nanoemulsão de *Cymbopogon flexuosus* em codornas (*Coturnix coturnix japonica*) positivas para *Trichomonas gallinae*.

### 2. METODOLOGIA

O protozoário *T. gallinae* foi recuperado pelo método de montagem úmida de pombos naturalmente infectados (2 a 8 semanas de idade) oriundos da área urbana, do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, obtidos por meio de swab oral e crescido em meio TYM (Trypticase- Yeast Extract- Maltose) pH 7,0, com 1ml de soro bovino adulto, 300 µl de antibiótico e 40µl de antifúngico, e incubados a 37°C em aerobiose por 48 horas. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, 05/05/2018, sob o

protocolo 23110.012860 / 2018-81 e SISBIO em 02/08/2018, sob o número 61235-1.

O teste *in vivo* foi realizado com fêmeas de codornas (*Coturnix coturnix japônica*), com 6 semanas de idade e peso médio de 115 gramas, que foram divididas em grupos, A, B, C, D, E, F e G (n=5). O grupo A- controle sadios; B Grupo- controle infectados (somente trofozoítos); Grupo C- controle Tween 80% 0,44 mg/ml; Grupo D- nanoemulsão branca 0,44mg/ml; Grupo E- fármaco metronidazol 25mg/kg; Grupo F- OE-CL a 0,44 mg/ml e Grupo G- N-CL a 0,44 mg/ml.

As aves utilizadas neste experimento foram alocadas em gaiolas específicas para a espécie, separadas e alimentadas com ração para aves (100 a 120 gramas/ave/dia) e água, *ad libitum*. Os animais também passaram por um período de adaptação (15 dias) com a realização de exames laboratoriais e clínicos, para a isenção da presença de *T. gallinae*. A partir disto, foram infectadas experimentalmente por inoculação oral, com  $4 \times 10^4$  trofozoítos em 1 ml de cultura. A partir do sétimo dia pós-infecção, em que foram detectados trofozoítos nas aves dos grupos. Estes animais foram examinados diariamente, durante 15 dias, pelo método de montagem úmido e observado em microscópio óptico, para confirmação de infecção. Além disso, o peso corporal das codornas foi registrado no começo e fim do experimento.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a inoculação dos trofozoítos de *T. gallinae* nas aves, antes de se dar início aos tratamentos, foram verificados através do método de swab e inoculado em meio de cultivo TYM (DIAMOND, 1957). Os protozoários foram observados em câmara de Neubauer do sétimo ao décimo quinto dia. O número de trofozoítos recuperados através da colheita de aves não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Durante o experimento *in vivo*, a N-CL demonstrou eficácia em apenas uma dose contra trofozoítos de *T. gallinae*. No segundo dia de experimento, os tratamentos com o uso de OE-CL inviabilizaram 70% dos trofozoítos, apesar da administração de apenas duas doses, em comparação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

No tratamento com OE-CL foi observado a ausência de trofozoítos nas aves no 3º dia pós- tratamento (n=3), e até o 7º dia todas as aves desse grupo não apresentaram formas viáveis de trofozoítos de *T. gallinae* em cultivos de swabs em 24 e 48 horas, em comparação a todos os outros grupos controles ( $P < 0,05$ ). O tratamento com N-CL apresentou eficácia no 2º dia de tratamento com a ausência de trofozoítos (n=3) após 4º dia de tratamento, todas as aves deste grupo não apresentaram trofozoítos viáveis no cultivo até o 7º dia. O MTZ apresentou ausência de trofozoítos nas aves somente no 7º dia de tratamento. Durante o experimento não ocorreram mortes e efeitos adversos nos animais tratados. Durante o tempo de experimento (30 dias), o peso corporal e a postura de ovos das codornas tratadas com o uso do OE-CL e N-CL, bem como os outros grupos controles, não pode-se observar alterações significativas, quando comparado ao começo do experimento.

O metronidazol apresenta propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias e é comumente usado em aplicações médicas e para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias anaeróbicas e protozoários (FANG et al., 2011). As resistências às quimioterapias atuais evidenciaram a necessidade de novos agentes antiparasitários, como o uso de OEs e nanoemulsões

(SOLÓRZANO-SANTOS E MIRANDA-NOVALES, 2011). Há relatos de isolados resistentes de *T. gallinae* a nitroimidazol, e sua prevalência chega a 80-100%, poucos estudos foram realizados para encontrar agentes tricomonídeos alternativos (HARLIN E WADE, 2009). O presente trabalho é pioneiro em estudos relacionados ao OE e a nanoemulsão sobre o protozoário flagelado *T. gallinae* no Brasil.

Em 2018, TABARI et al. observaram a eficácia do óleo essencial *Pelargonium roseum* contra *T. gallinae*, em que no 5º dia de tratamento não foram recuperados trofozoítos móveis das aves tratadas com MTZ 50 mg / kg, e no 6º dia de tratamento não se observaram trofozoítos nas aves tratadas com o OE. Diferindo do presente estudo, quando comparado os resultados da nanoemulsão de *C. flexuosus*, que eliminou a presença do protozoário a partir do 3º dia de tratamento. YOUSSEFI et al. (2017) ao analisar o efeito *in vitro* e *in vivo* de *Artemisia sieberi*, constataram no teste *in vivo* que o tratamento com o uso do óleo essencial na dose de 50 mg / kg após 4 dias levou à recuperação total dos pombos infectados. Corroborando com o presente estudo, onde o óleo essencial livre de *C. flexuosus*. Sugere-se que a nanoemulsão foi mais eficaz devido a sua maior penetração nos tecidos e consequentemente na membrana do protozoário. Quando se comparam os resultados do fármaco padrão utilizado (MTZ), difere-se do estudo, o qual só apresentou a eliminação total do parasito a partir do 7º de tratamento.

#### 4. CONCLUSÕES

O OE-CL e N-CL foram capazes de reduzir a viabilidade de trofozoítos de *T. gallinae*. O uso da N-CL de capim-limão foi mais efetivo contra trofozoítos de *T. gallinae*, quando comparado ao metronidazol.

Os principais constituintes químicos do capim-limão podem ser considerados como compostos eficazes para futuras pesquisas e desenvolvimento de novos agentes anti-*Trichomonas gallinae*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **Journal of Parasitology**. v. 43, p.488-490, 1957.

DINGSDAG SA, HUNTER N. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. **J Antimicrob Chemother**. v.73, n.2, p. 265-79, 2018.

DUNNE RL, DUNN LA, UPCROFT P, O'DONOGHUE PJ, UPCROFT JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell Res**. v.13, n.4, p.239-49, 2003.

FANG, Z.; CHEN, J.; QIU, X.; QIU, X.; CHENG, W.; ZHU, L. Effective Removal of Antibiotic Metronidazole from Water by Nanoscale Zero-Valent Iron Particles. **Desalination**, v.268, p.60–67, 2011.

FORRESTER, D.J. & FOSTER, G.W. (2009). Trichomonosis. In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J. & Hunter, D.B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds* (1ª Edição, pp.120-153). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

GANJEWALA D, LUTHRA R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. **Nat Prod Commun.** v.5, n.1, p.163-72, 2010.

GASPAR DA SILVA, D., BARTON, E., BUNBURY, N., LUNNESS, P., BELL, D.J. & TYLER, K.M. Molecular identity and heterogeneity of trichomonad parasites in a closed avian population. **Infection Genetics and Evolution**, v.7,p. 433-440, 2007.

HARLIN, R., WADE, L. Bacterial and parasitic diseases of Columbiformes. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.12, n.3, p. 453-73, 2009.

SOLÓRZANO-SANTOS, F., MIRANDA-NOVALES. M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, n.2, p.136-41, 2012.

TABARI, MOHADDESEH ABOUHOSSEINI AND YOUSSEFI, MOHAMMAD REZA. *In vitro* and *in vivo* evaluations of *Pelargonium roseum* essential oil activity against *Trichomonas gallinae*. **Avicenna J Phytomed.** v. 8, n.2, p. 136–142, 2018.

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.

YOUSSEFI MR, TABARI MA, MOGHADAMNIA AA. *In vitro* and *in vivo* activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. **Iran J Veterin Res.** v.18, p.25, 2017