

## EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL E NANOEMULSÃO DE TOMILHO EM *Trichomonas gallinae*

BRUNA BACCEGA<sup>1</sup>; FILIPPE OBELAR MARTINS<sup>2</sup>; ÉLVIA ELENA SILVEIRA  
VIANNA<sup>3</sup>; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER<sup>4</sup>; NARA AMÉLIA DA ROSA  
FARIAS<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) – obelar05@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – elviavinna@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@gmail.com

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

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

### 1. INTRODUÇÃO

A tricomoníase aviária é causada pelo protozoário flagelado *Trichomonas gallinae* (RIVOLTA, 1878). Acomete aves, principalmente das ordens Columbiformes e Falconiformes (ROUFFAER et al., 2014). Os sintomas da infecção se dão a partir de lesões no trato digestivo e respiratório (GERHOLD et al., 2007).

As drogas utilizadas para o tratamento desta enfermidade são os nitroimidazóis. A administração do fármaco em subdoses e o seu uso de preventivo contra tricomoníase aviária, resultaram no surgimento de isolados resistentes (LUMEIJ E ZWIJNEMBERG, 1990). Uma das alternativas para minimizar este problema é a utilização de fitoterápicos, como os óleos essenciais (OEs), devido aos seus compostos químicos possuírem atividades antimicrobiana, antiparasitária e antiinflamatória (HAMMER et al., 2008). Os OEs por serem sensíveis às variações ambientais, o seu encapsulamento é uma estratégia eficiente para prevenir a degradação do mesmo. Este processo visa proteger os efeitos benéficos e a liberação de compostos ativos no sítio específico (HOSSEINI et al., 2013), como por exemplo as nanoemulsões. Os sistemas nanoestruturados são constituídos por duas fases (hidrofílica e hidrofóbica), ou seja, aquosa e fase oleosa. A fim de superar a instabilidade, surfactantes são adicionados à formulação a fim de diminuir a tensão superficial e estabilizar o sistema (NIRMALA et al 2010).

Diante disto, o presente estudo tem como objetivo investigar a eficácia e *in vitro* do óleo essencial (OE-T) e a nanoemulsão (N-T) de *Thymus vulgaris* contra trofozoítos de *Trichomonas gallinae*.

### 2. METODOLOGIA

O óleo essencial de tomilho, foi obtido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). A nanoemulsão foi desenvolvida pelo método de emulsificação espontânea, seguindo a metodologia descrita por Gündel et al., (2018).

A sua caracterização foi realizada pelo tamanho médio das gotículas, índice de polidispersividade e potencial zeta., determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz e técnica de mobilidade eletroforética após diluição da amostra (500 vezes) em solução aquosa de cloreto de sódio (10 mM), respectivamente. Os valores de pH foram determinados utilizando um potenciômetro (DM-22, Digimed®) anteriormente calibrado com solução padrão. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média (± DP) (GÜNDEL et al., 2018).

Espécimes de *T. gallinae* foram recuperados pelo método de montagem a úmido de pombos nativos naturalmente infectados, utilizando swabs da cavidade oral, e de lesões membranosas da região orofaríngea de pombos domésticos (*C. livia*). O cultivo do parasito foi preparado por imersão de swabs em meio triptona / extrato de levedura/ maltose (TYM) Diamond (1957) e incubado a 37°C (Sansano et al,2009). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, sob o protocolo 23110.012860/2018-81 e SISBIO 61235-1.

Para examinar a susceptibilidade de *T. gallinae* em relação ao OE-T e N-T, foram utilizadas placas estéreis de 96 poços. Os parasitos foram incubados em uma densidade inicial de  $1 \times 10^6$  trofozoítos / mL de TYM. Quatro controles foram realizados: a) apenas os trofozoítos (controle negativo), b) trofozoítos mais o veículo para solubilização dos derivados (0,01% Tween), c) trofozoítos mais metronidazol 100mM (como controle positivo) e d) nano branca (como controle das nanoemulsões). Além disso, OE-T e N-T foram adicionados aos poços para obter concentrações finais de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 e 2%. Subsequente, as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Para a verificação da viabilidade dos trofozoítos, os mesmos foram observados quanto à motilidade, morfologia e exclusão por corante Azul de Tripán (0,4%).

O IC<sub>50</sub> (metade da concentração inibitória máxima) foi determinado em concentrações para o OE-T e N-T. Apenas a concentração OE-T e N-T que apresentaram redução na viabilidade dos trofozoítos para 100% foram utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (MIC), sendo empregadas sob diferentes concentrações. As melhores concentrações, apresentadas após a análise do MIC para o OE-T e N-T, foram realizadas nos seguintes tempos: 1, 6, 12, 24, 48, 72, e 96 h também pelo método de exclusão azul de tripan (0,4%). Uma curva de tempo de morte foi construída para obter um perfil de atividade da eficácia do OE-T e N-T contra trofozoítos flagelados de *T. gallinae*. Todos os ensaios foram realizados de forma independente em triplicata (SENA-LOPES et al., 2017).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros observados na caracterização da nanoemulsão são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da formulação das nanoemulsões. Os resultados estão expressos em média ± dp

	Tamanho (nm)	Índ. de polidispersão	Potencial zeta	Ph
Nano branca	127 ± 1.02	0.25 ± 0.005	-6.37 ± 0.58	5.15±0.0
Nano tomilho	176 ± 200	0.20 ± 0.007	- 7.48 ± 1.02	3 6,06±0,0 5

O uso de plantas medicinais com potenciais efeitos e fitoterápicos vem aumentando para o tratamento da tricomoníase, principalmente para a espécie *Trichomonas vaginalis* (IBRAHIM, 2013). Os nossos resultados apresentaram efeito inibitório (OE-T) e (N-T-T) em comparação com MTZ.

Para inibição dos trofozoítos a N-T eliminou os trofozoítos na concentração de 1,25% e 1,5% para o OE-T, após 24 horas de incubação. O MIC do OE-T e da N-T foi 1,45 e 1,20 respectivamente. Os valores do IC50 foram fixados em 0,5%

para N-T e 0,75 para OE-T. O crescimento dos trofozoítos foi inibido completamente tanto pelo OE quanto pelo NT após 12 horas de incubação. No tratamento com tomilho não foi observado trofozoítos viáveis em meio de cultura após 24 horas, corroborando com Tabari et al. (2017). OE-T demonstrou efeitos anti-trichomonas e sugere-se a ação dos três constituintes químicos predominantes neste óleo (borneol (36,84%), alfa-terpineol (14,31%) e timol (8,98%), possam apresentar atividade contra o protozoário, principalmente sob o composto bioativo timol, que já exibiu atividade em outros estudos, como os trofozoítos de *Giardia lamblia* (CALZADA et al. 2006). O autor supracitado reporta que o OE-T tem a capacidade de destruir a integridade da membrana celular, liberando os componentes celulares de causar alterações morfológicas na membrana plasmática e flagelar, causando danos às organelas, e causando a lise celular.. A N-T quando comparada ao óleo essencial apresentou maior eficácia, quando comparado ao OE-T, este resultado demonstra que a redução do tamanho das partículas, aumenta a biodisponibilidade, biodistribuição e penetração. A relevância de pesquisas com sistemas nanoestruturados com bioativos retirados de plantas é evidente, como visto nos trabalhos de Wen-Chien et al. (2018).

#### 4. CONCLUSÕES

O OE e a nanoemulsão de tomilho foram eficazes contra trofozoítos de *T. gallinae* no período de 12 horas. No entanto, são necessários estudos mais abrangentes para o entedimento das interações entre o protozoário e os compostos bioativos abordados neste estudo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALZADA, F, YÉPEZ-MULIA, L; AGUILAR, A.. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, n.3, p.367-370, 2006.

GERHOLD, R. W.; TATE, C. M.; GIBBS, S. E.; MEAD, D. G.; ALLISON, A. B.; FISCHER, J. R. Necropsy findings and arbovirus surveillance in mourning doves from southeastern United States. **Journal of Wildlife Diseases**, v.43, n. 1, p. 129-135, 2007.

GÜNDEL, S. S.; SOUZA, M. E.; QUATRIN, P. M.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 268-276, 2018.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Frequencies of resistance to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and rifampicin in Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Enterococcus faecalis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 2, p.170-3, 2008.

HOSSEINI, S.F, ZANDI, M. REZAEI, F. Farahmandghavi Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydr. Polym.**, 95 (2013), pp.50-56.

IBRAHIM, A.N. Comparison of *in vitro* activity of metronidazole and garlic-based product (Tomex®) on *Trichomonas vaginalis*. **Parasitol Res.**v.112, p. 2063-7, 2013.

LUMEIJ, J.T.; ZWIJNENBERG, R.J.G. Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). **Avian Pathology**, v. 19, n. 1,p. 165-166, 1990.

NIRMALA, R. NAM KT, Park DK et al (2010) Structural, thermal, mechanical and bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly(e-caprolactone) nanofibers via electrospinning. **Surf Coat Technol** 205:174–181. doi:10.1016/j.surfcoat.2010.06.027.

STOCKDALE, J.E.; DUNN, J.C.; GOODMAN, S.J.; MORRIS, A.J.; SHEEHAN, D.K.; GRICE, P.V.; HAMER, K.C. The protozoan parasite *Trichomonas gallinae* causes adult and nestling mortality in a declining population of European Turtle Doves, **Streptopelia turtur**. **Parasitology**, v.142, n.3, p.490–498, 2015.

RIVOLTA, S. Una forma di croup prodotta da um infusorio, nei polli. **Giornale di Anatomia, Fisiologia e Patologia Animale**, v.10, p. 149-158, 1878.

ROBINSON, R.A.; LAWSON, B.; TOMS, M.P.; PECK, K.M.; KIRKWOOD, J.K.; et al. The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant in British non-passerines. **Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds**, v.140 , n.10 , p. 1234- 1245, 2010.

ROUFFAER, L.; ADRIAENSEN, C.; DE BOECK, C.; CLAEREBOUT, E.; MARTEL, A. Racing pigeons: a reservoir for nitro-imidazole-resistant *Trichomonas gallinae*. **Journal of Parasitology**, v.100, n.3, p.360-3, 2014.

SANSANO-MAESTRE J.; GARIJO-TOLEDO, M.M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. **Avian Pathol.**v. 38, p. 201-7, 2009.

SANTORO, GF; das GRAÇAS CARDOSO M; GUIMARÃES LG;SALGADO AP; MENNA-BARRETO RF; SOARES MJ.. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v.100, n.4, p. 783-790. 2007.

SENA-LOPES, Â.; DAS NEVES, R.N.; BEZERRA, F.S.B.; DE OLIVEIRA SILVA, M.T.; NOBRE, P.C.; PERIN, G.; et al. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. **Biomed Pharmacother**, v.89, p.284- 287. 2017.

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.

WEN-CHIEN L.; HUANG, D.W.; WANG, C.R., YEH, C.H.; TSAI, J.C.; HUANG, Y.T.; LI,P.H. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **J Food Grug anal.** v. 26, p. 82-89,2018.