

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Tese de Doutorado

**Avaliação da atividade inibitória e antioxidante de óleos essenciais e
nanoemulsões sobre *Trichomonas vaginalis***

Juliana Montelli Fenalti

Pelotas, 2019

Juliana Montelli Fenalti

Avaliação da atividade inibitória e antioxidante de óleos essenciais e nanoemulsões sobre *Trichomonas vaginalis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Camila Belmonte

Co-Orientadora: Prof. Dra. Nara Amélia da Rosa Farias

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F332a Fenalti, Juliana Montelli

Avaliação da atividade inibitória e antioxidante de óleos essenciais e nanoemulsões sobre *Trichomonas vaginalis* / Juliana Montelli Fenalti ; Camila Belmonte, orientadora ; Nara Amélia da Rosa Farias, coorientadora. — Pelotas, 2019.

116 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Tricomoníase. 2. Fitoterapia. 3. Produtos naturais. 4. Citral. 5. Ist. I. Belmonte, Camila, orient. II. Farias, Nara Amélia da Rosa, coorient. III. Título.

CDD : 547.71

Juliana Montelli Fenalti

Avaliação da atividade inibitória e antioxidante de óleos essenciais e nanoemulsões sobre *Trichomonas vaginalis*

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17/09/2019

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Camila Belmonte Oliveira (Orientadora)
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof^a. Dr^a. Janice Luehring Giongo
Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof^a. Dr^a. Márcia Raquel Pergoraro de Machado
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Marcos Marreiro Vilella
Doutor em Ciências da Saúde pelo Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

À minha família e amigos pelo apoio e incentivo.
À minha bisavó Honorina (Vó Negra), pela minha ausência.
Dedico

Agradecimentos

À minha família e amigos, agradeço por todo apoio, carinho, palavras de conforto e por sempre acreditarem no meu potencial, me incentivando a não desistir.

À minha orientadora Camila Belmonte, agradeço a oportunidade e confiança. Agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório, me acolhido no momento que mais precisei e tornado a conclusão do doutorado uma realidade.

À Nara Amélia da Rosa Farias, minha coorientadora e “mãe científica”, agradeço pelos seus ensinamentos, conselhos e ombro amigo, sempre me mostrando que eu era capaz e tinha condições de ir até o final.

Ao meu “namorado” Moa, agradeço o incentivo para que eu chegasse até aqui e a paciência que teve nesse último ano, reconheço que não foi fácil me aguentar.

Aos colegas de laboratório, Angelita, Analice, Helena e professora Élvia Vianna, agradeço o apoio durante esse ano que estive com vocês, em especial, aos estagiários, Alexia, Filipe e Yan, que nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse necessário, independente do horário e do dia que fosse. E o meu muito obrigado a minha amiga Bruna Baccega, você foi essencial para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

Aos colegas e amigos de outros laboratórios, em especial, Mirian Bruni, Carolina Caetano, Raquel Neves, Ângela Sena, Talysson Barbosa, Paloma Birmann, Angela Casaril, Franciele Liz e Maria Antonieta Machado, agradeço a colaboração.

À minha amiga Tais Mata, agradeço pelas orientações e ensinamentos, mesmo de longe, ao longo da minha vida acadêmica.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e professores, agradeço pelo ensino. Também agradeço ao Laboratório de Ginecologia da FAMED pela coleta das amostras e a Universidade Franciscana, em especial a professora Aline Ferreira Ourique e sua equipe, pela disponibilização dos óleos essenciais e nanoemulsões para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço à Deus pela vida que tenho, pelas oportunidades e dificuldades que encontrei neste caminho, com certeza contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal.

À todos que de alguma forma contribuíram nessa trajetória, muito obrigado!

***“ Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades
e corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir.”***

(Augusto Cury)

Resumo

FENALTI, Juliana M. **Avaliação da atividade inibitória e antioxidante de óleos essenciais e nanoemulsões sobre *Trichomonas vaginalis***. 2019. 116 f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado causador da tricomoníase, infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum do mundo. Diante do aumento da prevalência de infecções resistentes ao metronidazol, o único medicamento reconhecido para o tratamento da tricomoníase, estudos vem sendo realizados em busca de alternativas terapêuticas. Os produtos naturais biologicamente ativos, como os óleos essenciais (OE), os quais se constituem em modelos para a síntese de novos fármacos, e podem tornar-se um novo recurso terapêutico com menores reações adversas associados à nanotecnologia. Neste estudo, foi avaliada a atividade tricomonicida *in vitro* dos óleos essenciais livres e nanoestruturados de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Ocimum basilicum* (manjerição), *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) e o seu composto majoritário citral, separados em dois experimentos. No primeiro experimento, foram testados os OE livres e nanoestruturados de Eucalipto, Manjerição e Capim-limão em isolado clínico. As Concentrações Inibitórias Mínimas (MICs) observadas no OE de capim-limão foi de 660 µg/ml quando livre e 440 µg/ml nanoestruturado e para manjerição foi de 1080 µg/ml tanto na forma livre quanto nanoestruturado, apresentando significativa atividade antiparasitária em 12 e 24 hs de exposição, respectivamente, inibindo 100% dos trofozoítos. Também foi avaliada através do ensaio TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) a atividade antioxidante desses óleos e nanoemulsões, observando a diminuição da peroxidação lipídica. No segundo experimento, foi avaliada a atividade do citral frente à ATCC (30236), apresentando MIC 100 µM/ml para inibir 100% dos trofozoítos em 12 hs de incubação e IC₅₀ de 40 µM/ml (24 h). Os níveis de óxido nítrico (NO) também foram determinados e após 24 hs de exposição do parasito ao citral, apresentou uma redução significativa de NO quando comparado ao controle. Diante dos resultados obtidos, os OE representam uma alternativa no desenvolvimento de novos fármacos para esta IST. Devem ser considerados maiores estudos desses produtos naturais tanto na forma livre quanto associado a nanocarreadores, em busca de desenvolver novos fármacos não nitroimidazólicos, a fim de reduzir a resistência e os efeitos adversos para o tratamento da tricomoníase.

Palavras-chave: Tricomoníase; Fitoterapia; Produtos Naturais; citral; IST.

Abstract

FENALTI, Juliana M. **Evaluation of inhibitory and antioxidant activity of essential oil and nanoemulsions against *Trichomonas vaginalis***. 2019. 116 f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Trichomonas vaginalis is the flagellate protozoan that causes trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) in the world. In front of the increased prevalence of metronidazole-resistant infections, the only recognize treatment to trichomoniasis, studies were realized in search of therapeutic alternatives. Natural products biologically active, as essential oil, which constitute a model for synthesizing new drugs, becoming a new therapeutic resource with lower side effects associate to nanotechnology. In this study, was evaluated in vitro the anti-trichomonal activity of free essential oils (EO) and nanostructured of *Eucalyptus globulus* (eucalyptus), *Ocimum basilicum* (basil), *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass) and its major compound citral, separated into two experiments. At the first experiment, were tested free EO and nanostructured of eucalyptus, basil and lemongrass in clinical isolate. The MIC observed to lemongrass was 660 µg/mL to free oil 440 µg/ml to nanoemulsion and to basil was 1080 µg/ml either in free or nanostructured form, showing significant antiparasitic activities in 12 and 24 hours exposure, respectively, inhibiting 100% of trophozoites. Also was evaluated through TBARS assay (Thiobarbituric acid reactive substances) antioxidant activity of these oils and nanoemulsions, observing the reduction of lipid peroxidation. At second experiment, was evaluated citral activity against ATCC (30236), showing MIC 100 µM/ml to inhibit 100% of trophozoites in 12 h of incubation and IC₅₀ 40 µM/ml (24 h). The nitric oxide (NO) levels was also determined and after 24 h of exposure of parasite to citral showed a significant reduction of NO when compared to control. In front of the results obtained, EO are an alternative to developing of drugs to this STI. Should be considered further studies of these natural products even at free form or associate to nanocarriers, in search to develop a new anti-trichomonal drugs non-nitroimidazole in order to reduce the resistance and the side effects to the treatment of trichomoniasis.

Keywords: Trichomoniasis; Phytotherapy; Resistance; Natural products; STI.

Lista de Figuras

Revisão bibliográfica

Figura 1: Formas evolutivas de <i>Trichomonas vaginalis</i> – a. Trofozoíto b. Pseudocisto c. Ameboide aderido a célula vaginal epitelial	19
Figura 2 - Ciclo de vida <i>T. vaginalis</i>	19
Figura 3 - <i>Cymbopogon citratus</i> (Capim-limão)	27
Figura 4 – Estrutura citral	27
Figura 5 – <i>Eucalyptus globulus</i> L. (Eucalipto comum)	28
Figura 6 – <i>Ocimum basilicum</i> (Manjeriço)	29

Artigo 1

Figure 1 - Antiparasitic activity of free and nanostructured essential oils of lemongrass (1A), eucalyptus (1B) and basil (1C) against <i>Trichomonas vaginalis</i> after 24 hours of exposure	61
Figure 2 - Time of death of <i>Trichomonas vaginalis</i> isolate after exposure to free and nanoemulsion of Lemongrass (A) and Basil (B) at time 1h, 6h, 12h, 24h, 48, 72h and 96h	62
Figure 3 – TBARS assay on <i>Trichomonas vaginalis</i> trophozoites after treatment - free and nanostructured essential oils of <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Ocimum basilicum</i> and <i>Eucalyptus globulus</i>	63

Artigo 2

Figure 1 - Antiparasitic activity of citral against <i>Trichomonas vaginalis</i> (ATCC 30236) after 24 hours of exposure	80
Figure 2 - Time of death of <i>Trichomonas vaginalis</i> (ATCC 30236) 1h, 6h, 12h, 24h, 48, 72h and 96h	80
Figure 3 - Nitric oxide levels obtained from nitrite levels measured by Griess assay	81
Figure 4 – Two-dimensional interactions and three-dimensional binding mode of citral with (A) TvTrx, (B) TvPNP, and (C) TvMGL	82

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1 - Physicochemical characterization of nanoemulsions, assessing the size, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH.....	60
--	----

Lista de Abreviaturas

ATP Adenosina 5'trifosfato

CD4+ Cluster of Differentiation

CDC Centers for Disease Control and Prevention

CDF Cell-Detaching Factor

DNA Ácido desoxirribonucleico

ERNs Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs Espécies reativas de oxigênio

FDA Food and Drug Administration

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HNO₂ ácido nitroso

HO• hidroxila

IC₅₀ Metade da Concentração Inibitória Máxima

IgA Imunoglobulina A

IgG Imunoglobulina G

IgM Imunoglobulina M

MDA Malondialdeído

MGL Metionina gama-liase

MIC Minimun Inibitory Concentration

MTT (3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio)

MTZ Metronidazol

N₂O₃ óxido nitroso

NC Controle negativo

NE Nanoemulsão

NO• Óxido nítrico

NO₂- nitritos

NO₃- nitratos

NOS óxido nítrico sintase

O₂•- superóxido

OE Óleo essencial

OEs Óleos essenciais

OMS Organização Mundial da Saúde

ONOO- peroxinitritos

PFOR Enzima ferredoxina oxirredutase

PNP Purina Nucleosídeo Fosforilase

RL Radicais Livres

RO• alcoxila

ROO• peroxila

STI Sexually Transmitted Infection

TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TV *Trichomonas vaginalis*

TYM trypticase–yeast extract–maltose

WHO World Health Organization

Sumário

Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	10
Lista de Abreviaturas	11
1 Introdução	15
2 Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 Revisão Bibliográfica	18
3.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	18
3.2 Tricomoníase	20
3.3 Tratamento	23
3.4 Produtos Naturais	25
3.4.1 Óleos Essenciais	26
3.5 Atividade Antioxidante e estresse oxidativo	30
3.6 Citotoxicidade	31
3.7 Docking Molecular	32
3.8 Nanoemulsões	32
4 Artigo 1 - Evaluation <i>in vitro</i> of anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> and antioxidant activities of free and nanostructured essential oils	35
5 Artigo 2 - Evaluation <i>in vitro</i> of anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> activity, cytotoxicity and antioxidant effects of citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal) major compound of the <i>Cymbopogon</i> species essential oil	64
6 Considerações finais	83
Referências Bibliográficas	84
Apêndices	103
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	104
Anexos	108
Anexo A – Submissão Revista Acta Parasitologica	109

Anexo B – Submissão Revista Molecular and Biochemical Parasitology..	110
Anexo C – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética	111

1. Introdução

Três espécies de *Trichomonas* são capazes de infectar os humanos, cada uma em um órgão específico: *T. tenax* na cavidade oral; *T. hominis* no trato intestinal e o *T. vaginalis* na região inferior do trato geniturinário, sendo esta última espécie amplamente estudada, pois o ser humano é o único hospedeiro natural (WANG, 2000). O protozoário flagelado *T. vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase, infecção sexualmente transmissível (IST) mais frequente do mundo. Estima-se que ocorram 142 milhões de novos casos por ano, a maioria em mulheres, as quais podem apresentar desde um estado assintomático até quadros severos (WHO, 2016).

Encontra-se na literatura diversos relatos de isolados de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol e a outros 5-nitroimidazóis, fármacos usualmente utilizados para o tratamento da tricomoníase, levando a recidivas e a transmissão da doença (CUDMORE *et al.*, 2004). A rápida evolução dos microrganismos e a resistência (manifestação genética natural dos organismos), desenvolvidas em função da exposição sucessiva e indiscriminada dos fármacos, torna o cenário alarmante e faz com que novas pesquisas sejam desenvolvidas em busca de agentes eficazes (SILVEIRA *et al.*, 2006).

De Brum Vieira *et al* (2015) realizou um levantamento bibliográfico dos diversos experimentos *in vitro* com produtos de origem natural frente o protozoário *T. vaginalis* ressaltando o potencial dos mesmos no tratamento da tricomoníase. Tradicionalmente, os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos os quais se constituem de modelos para a síntese de novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas, tornando-se um recurso terapêutico

seguro, com menores reações adversas e sem relatos de ocorrência de resistência aos seus constituintes (SIENKIEWICZ *et al.*, 2012).

Por sua vez, o avanço da nanotecnologia vem se destacando na indústria farmacêutica, apresentando um grande número de vantagens, especialmente no desenvolvimento de carreadores de fármacos, atuando com uma liberação controlada em alvos específicos (SHAFFER, 2005). A associação dessas nanoestruturas aos óleos essenciais, impede a volatilização dos mesmos, promove maior estabilidade, solubilidade, facilita a penetração na membrana do microorganismo e consequentemente aumenta a atividade biológica do ativo (CODEVILLA *et al.*, 2015).

Diante disso, a busca por novos compostos ativos e nanoestruturados contra *Trichomonas vaginalis* faz-se relevante, considerando a diversidade da flora brasileira e os crescentes avanços da nanociência.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade tricomonicida *in vitro* dos óleos essenciais livres e nanoestruturados de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Ocimum basilicum* (manjerição), *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) contra o protozoário *Trichomonas vaginalis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade tricomonicida de diferentes concentrações de óleos essenciais e nanoemulsões;
- Avaliar a atividade antioxidante de óleos essenciais e nanoemulsões sobre o flagelado *Trichomonas vaginalis*;
- Avaliar isoladamente a atividade tricomonicida do composto majoritário citral sobre *T. vaginalis*;
- Avaliar a atividade antioxidante do citral, *in vitro* sobre o flagelado *Trichomonas vaginalis*;
- Investigar a força de ligação do citral às proteínas presentes no *Trichomonas vaginalis*;
- Avaliar a citotoxicidade do composto citral.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis, agente causador da tricomoníase, foi registrado pela primeira vez por Donné em 1836 (KAMPMEIER, 1978). Pertence à família Trichomonadidae, à subfamília Trichomonadinae, ordem Trichomonadida, classe Zoomastigophorea, e filo Sarcomastigophora (DE CARLI & TASCA, 2005).

Este protozoário é observado somente na forma de trofozoíto, o qual possui um formato piriforme medindo de 10-20 µm. Ele possui cinco flagelos, um aderido a membrana ondulante e os demais livres, os quais são os responsáveis pela mobilidade do parasito (HEINE & MCGREGOR, 1993; LEWIS, 2014). *T. vaginalis* também apresenta outras duas formas, uma ameboide quando em contato com o hospedeiro e a de pseudocisto, que ao internalizar os seus flagelos em meios com baixas temperaturas e escassa oferta nutricional, apresenta-se em formato arredondado sem parede cística (Figura 1) (PEREIRA-NEVES et al., 2003; LEWIS, 2014). Seu ciclo de vida é simples, não apresenta a forma cística e reproduz-se por fissão binária (Figura 2) (SCHWEBKE & BURGESS, 2004).

É um parasito anaeróbico facultativo, amitocondriado, possui densos grânulos chamados de hidrogenossomos. Estes são responsáveis pela formação de ATP (adenosina 5' trifosfato) através da enzima ferredoxina oxirredutase (PFOR) presente em seu interior a qual promove a oxidação do piruvato em acetato (MACIEL et al., 2004). Esse flagelado através do metabolismo fermentativo em condições anaeróbicas e de microaerofilia, tem como sua principal fonte de energia os carboidratos além de manter o glicogênio como reserva de energia para garantir

a sua sobrevivência frente às variações do ambiente vaginal (MACIEL et al., 2004; KISSINGER, 2015).

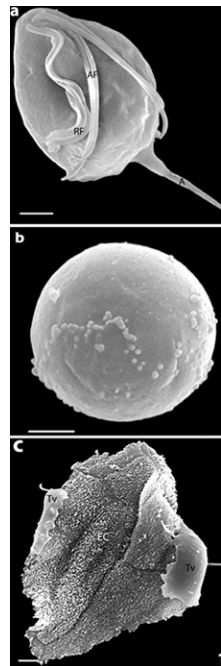


Figura 1: Formas evolutivas de *Trichomonas vaginalis* – a. Trofozoíto b. Pseudocisto c. Ameboide aderido a célula vaginal epitelial. **Fonte:** Benchimol, 2008.

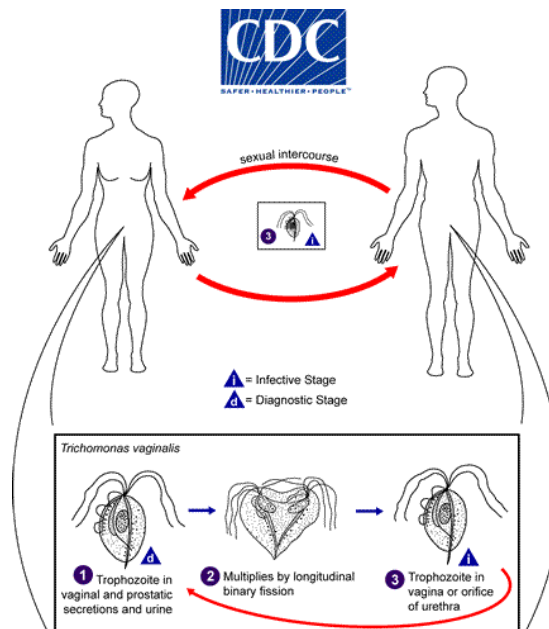


Figura 2: Ciclo de vida *T. vaginalis*.

Fonte: CDC - <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>

3.2 Tricomoniase

A tricomoniase é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum no mundo, sendo considerada a principal causa de vaginite entre as mulheres além de causar sérias complicações como infertilidade, câncer cervical, predisposição a doença inflamatória pélvica, nascimento prematuro, baixo peso em neonatos e facilitar a transmissão do vírus HIV-1 (HEINE & MCGREGOR, 1993; MCCLELLAND *et al.*, 2007; HOBBS & SEÑA, 2013).

Essa doença infecciosa acomete ambos os sexos, porém apresenta maior prevalência entre as mulheres, sendo as manifestações clínicas características dessa parasitose um corrimento amarelo-esverdeado, disúria e dor pélvica. Os homens, quando sintomáticos, apresentam como manifestação clínica quadros de uretrite e raramente complicando com epididimite e prostatite (BRAVO *et al.*, 2010; RODRIGUES MACHADO & SOUZA, 2012; CDC, 2015), mas na maioria das vezes essa infecção é autolimitada e assintomática devido a presença de zinco no sêmen, o qual possui ação tricomonicida.

Cerca de 80% das infecções por *T. vaginalis* são assintomáticas tanto em homens como em mulheres, sendo ambos considerados carreadores do parasito (SUTTON *et al.*, 2007; ALLSWORTH *et al.*, 2009; POOLE & MCCLELLAND, 2013). Entretanto, os parceiros devem ser simultaneamente tratados a fim de evitar as recidivas (MACHADO *et al.*, 2005). A tricomoniase é uma doença de fase reprodutiva, sendo o estabelecimento do protozoário no trato genital feminino facilitado pelo ciclo hormonal fisiológico e pela presença de ferro durante o ciclo menstrual que permite a sua aderência aos tecidos (POOLE & MCCLELLAND, 2013).

O processo de adesão do protozoário ao hospedeiro é complexo e determinante para a patogenicidade. A citoaderência do *T. vaginalis* deve-se ao mosaico de moléculas existentes em sua superfície, adesinas, proteínas e carboidratos, as quais permitem um maior contato com a célula epitelial hospedeira (PETRIN *et al.*, 1998). As adesinas AP65, AP51, AP33, e AP23, são mediadoras da citoaderência reguladas pela presença de ferro, as quais são expressas após o contato do parasito com a célula hospedeira, assumindo o parasito uma forma

achatada, conhecida como ameboide (PETRIN *et al.*, 1998; SCHWEBKE & BURGESS, 2004; BRAVO *et al.*, 2010).

Juntamente às adesinas, as cisteínas-proteinases também desempenham papel importante na colonização, apresentando capacidade citotóxica e hemolítica além de degradar as imunoglobulinas IgM, IgG e IgA presentes no epitélio vaginal (PETRIN *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2010). Além desses mediadores, o parasito possui outras variações fenotípicas como forma de evadir o sistema imune. A expressão de adesinas imunogênicas como P270 evita o ataque dos anticorpos e garante a sobrevivência no organismo hospedeiro (PETRIN *et al.*, 1998).

Outra proteína também responsável pela patogênese e virulência do *T. vaginalis* é a CDF (*cell detaching fator*), a qual promove uma reação inflamatória e consequente descamação do epitélio. Esta glicoproteína é influenciada pelo pH e pela concentração de estrógeno, estando os seus níveis relacionados a severidade dos sintomas, tendo em vista que a administração do hormônio intravaginal diminui a produção de CDF e ameniza os sinais clínicos (PETRIN *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2004; MIELCZAREK & BLASZKOWSKA, 2016).

Após aderir ao tecido epitelial, o *T. vaginalis* libera aminoácidos que rapidamente se degradam em aminas alcalinas, acarretando no aumento do pH vaginal, que por sua vez, modifica o ambiente vaginal possibilitando o aumento da proporção de bactérias anaeróbias, inibindo a proliferação de lactobacilos e favorecendo o seu desenvolvimento (AMSEL *et al.*, 1983). A infecção desencadeia uma resposta imune celular, inflamação pélvica, algumas vezes com pontos hemorrágicos, e infiltração leucocitária, recrutando um grande número de células suscetíveis a infecção pelo vírus, incluindo linfócitos T CD4+ e macrófagos. Essa cascata facilita dessa forma o acesso do HIV à corrente sanguínea através das lesões causadas na mucosa, além de degradar o inibidor da protease leucocitária secretória que normalmente bloqueia a adesão do vírus às células (SORVILLO *et al.*, 2001; ALLSWORTH *et al.*, 2009). O protozoário *T. vaginalis* provoca hemólise através da eritrofagocitose para adquirir ferro, a qual é mediada pelas proteínas de aderência e pelos receptores eritrocitários, causando o quadro clínico de colpíte multifocal (BRAVO *et al.*, 2010).

Essa parasitose representa um grande problema para a saúde pública mundial, devido às intercorrências provenientes dessa infecção, como o aumento do

risco de aquisição do vírus HIV, partos prematuros, entre outras, as quais promovem um impacto direto na economia dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, nos quais são detectadas taxas elevadas de prevalência dessa IST (SECOR *et al.*, 2014). A prevalência de ISTs vem aumentando significativamente, devido ao precário atendimento do sistema de saúde e baixas condições socioeconômicas e nível escolar, já sendo considerado um problema de saúde pública (ALVES *et al.*, 2011).

Segundo os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012, foi estimado 142 milhões de novos casos de pessoas infectadas por *T. vaginalis*, sendo a maioria (89%) mulheres (LEITSCH, 2016; WHO, 2016). Em estudos recentes realizados no sul do Rio Grande do Sul, foram observadas prevalências semelhantes, onde Dos Anjos Gatti *et al* (2017), detectaram uma positividade de 4,1% e Bruni *et al* (2018) 4,2%, respectivamente, entre as mulheres avaliadas, apresentando ambos os públicos baixos níveis econômicos e escolares, variáveis as quais facilitam a transmissão.

O diagnóstico laboratorial permite a identificação do protozoário por sua movimentação flagelar característica, em amostras de secreção vaginal através do exame a fresco, diferenciando a vaginite causada por *T. vaginalis* das demais IST. Entretanto, quando não observado e as manifestações clínicas permanecerem e serem sugestivas de tricomoníase, deve-se realizar a cultura em meio de cultivo específico, Diamond, a fim de garantir um tratamento específico (MICHEL *et al.*, 2006).

O cultivo é considerado o meio de diagnóstico padrão-ouro da tricomoníase, de maior especificidade e sensibilidade, evitando um resultado falso negativo e a transmissão do mesmo (MACIEL *et al.*, 2004). O sistema de cultivo comercial *in pouch* *T. vaginalis* é semelhante ao cultivo, mesma sensibilidade e de fácil execução, podendo ser utilizado tanto para amostras de secreções como para amostras de urina (BRAVO *et al.*, 2010). Outros métodos como o Papanicolau, testes imunológicos e testes moleculares também são utilizados, porém como menor frequência (DE LEMOS; GARCÍA-ZAPATA, 2014).

A falta de estabelecimento de um programa de controle e triagem em pacientes assintomáticos, a não notificação compulsória e a baixa sensibilidade dos testes disponíveis nas rotinas laboratoriais, tornam a tricomoníase uma doença

infecçiosa subestimada e negligenciada, apresentando uma prevalência de 2,6% a 20% entre as mulheres no país (MENEZES *et al.*, 2016; MUZNY, 2018).

3.3 Tratamento

Desde 1959, o metronidazol (MTZ), medicamento de fácil acesso e baixo custo, é a droga de escolha para o tratamento da tricomoníase. Após ter sido observada uma significativa atividade da azomicina (2-nitroimidazol) contra protozoários anaeróbicos, foi obtido através de modificações em sua estrutura química o protótipo dos antimicrobianos da classe dos 5-nitroimidazóis, o MTZ, originalmente introduzido para o tratamento dessa IST (VÁZQUEZ *et al.*, 2001).

O MTZ é considerado um pró-fármaco, a sua penetração ocorre por difusão passiva, sendo ativado em contato com os hidrogenossomos de *T. vaginalis*. Através da redução dos grupos nitros pela enzima piruvato ferredoxina oxi-redutase (PFOR) encontradas nos organismos anaeróbicos, são formados intermediários lábeis, radicais nitro tóxicos, os quais ligam-se ao DNA do parasito impedindo a replicação e as sínteses enzimáticas, levando a destruição da célula e o protozoário à morte (MACIEL *et al.*, 2004).

Metabolizado pelo fígado em cinco metabólitos, o MTZ atinge uma concentração plasmática de 60% a 100% na maioria dos tecidos, demonstrando atividade em até 24 horas após a administração de 1g e é excretado na urina e nas fezes. Algumas modificações químicas na cadeia do MTZ deram origem a outros membros dessa classe como o tinidazol (TNZ), o ornidazol e o secnidazol (SCZ), os quais apresentam propriedades farmacocinéticas distintas, porém mecanismos de ação semelhantes ao fármaco de origem (LAMP *et al.*, 1999).

Para o tratamento da tricomoníase, é recomendada a dosagem de 500 mg de MTZ, administrado 2 vezes ao dia, por 7 dias, ou em dose única de 2 gramas por via oral, além do TNZ que pode ser administrado também em dose única de 2 gramas (SOPER, 2004, CDC, 2015). Em pacientes refratários ao tratamento inicial, é sugerido o aumento das doses, entretanto, devem ser destacadas as reações adversas promovidas pelo MTZ como dor epigástrica, náuseas e vômitos, as quais dificultam a adesão do paciente ao tratamento, contribuindo para o surgimento de

cepas resistentes com frequentes recorrências (ANDERSSON, 1981; CROWELL *et al.*, 2003; BOUCHEMAL *et al.*, 2017).

Desde 1962, diversos estudos vêm relatando ao longo dos anos isolados de *T. vaginalis* resistentes ao MTZ e a outros medicamentos da classe dos imidazóis (ROBINSON, 1962; KLEBANOFF *et al.*, 2001, CUDMORE *et al.*, 2004, SCHWEBKE & BARRIENTES, 2006). Entretanto, o MTZ e o TNZ são os únicos fármacos reconhecidos pela *Food and Drug Administration* (FDA, USA) para a terapêutica da tricomoníase (BRANDELLI *et al.*, 2013). Alguns autores associam a resistência a quadros de reinfecção, baixa absorção da droga, inativação da mesma pela flora vaginal, diminuição da atividade das enzimas envolvidas no processo de redução do pró-fármaco bem como a formação de pseudocistos, o qual vem sendo apontado como uma forma de resistência do parasito (MEINGASSNER, 1979; NARCISI & SECOR, 1996, LEITSCH *et al.*, 2009; PEREIRA-NEVES *et al.*, 2003).

O mecanismo de resistência do *T. vaginalis* frente ao MTZ ainda é desconhecido, entretanto autores sugerem que a redução da atividade das enzimas PFOR, ferredoxinas e hidrogenases, também chamada de resistência anaeróbica, e a aeróbica, provoca a diminuição da remoção do oxigênio impedindo a ativação do MTZ (CUDMORE *et al.*, 2004). A resistência aeróbica é observada na administração de níveis de terapêuticos do medicamento, onde para manter a anaerobiose ocorre no interior do parasito um aumento da concentração de oxigênio, o que prejudica a ativação do MTZ devido à competição por elétrons. Enquanto na anaeróbica, ocorre a diminuição das hidrogenases com formação de radicais hidroxilas e consequente lipoperoxidação lipídica e modificações no DNA, bem como a diminuição das enzimas essenciais para a ativação do fármaco, PFOR e ferredoxina, sendo necessárias doses mais altas e um tempo maior de tratamento. (GEHRIG & EFFERTH, 2009).

Frente à resistência, torna-se necessário a administração de doses altas por um período prolongado de tratamento o que contribui para que os efeitos colaterais sejam acentuados e com a falha do tratamento (GEHRIG & EFFERTH, 2009). Assim, a resistência reportada pela única classe de medicamentos disponível para o combate dessa IST torna-se um problema, tornando-se urgente a pesquisa por novos compostos biologicamente ativos e eficientes contra este protozoário (GHOSH *et al.*, 2018).

3.4 Produtos Naturais

Desde a antiguidade as plantas medicinais e seus derivados constituíram a base da terapêutica da humanidade (RIOS & RECIO, 2005). Considerando a diversidade da flora brasileira, tendo em vista que o Brasil detém em torno de 15 a 20% da biodiversidade do planeta, deve-se explorar o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Este patrimônio genético associado a uma rica diversidade étnica e cultural detentora de um valioso conhecimento tradicional do uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para o uso sustentável dos recursos naturais na área da saúde (ELISABETSKY & SHANLEY, 1994; SHU, 1998; BRASIL, 2006).

Os recursos naturais têm demonstrado ao longo dos anos um papel importante no processo de descoberta e desenvolvimento do arsenal terapêutico, sendo 47% dos medicamentos provenientes de produtos naturais ou derivados deles (NEWMAN & CRAGG, 2007; 2012). Os metabólitos primários são produtos da síntese de compostos essenciais à sobrevivência das espécies vegetais e dão origem aos metabólitos secundários, por diversas rotas biossintéticas elaboradas. Os metabólitos secundários são necessários para a sobrevivência e preservação dos vegetais, os quais apresentam funções de atração de insetos polinizadores e de defesa contra insetos-praga, fungos, bactérias e parasitos (SIMÕES *et al.*, 2010).

Dentre os compostos sintetizados pelas duas rotas metabólicas intermediárias, encontram-se os alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenos e poliacetilenos, os quais variam a intensidade e composição de acordo com a espécie, variabilidade genética e fatores ambientais. Estes despertam interesse, tanto pelas suas atividades biológicas exercidas em resposta aos estímulos do meio ambiente, quanto pela sua atividade farmacológica (BAKKALI *et al.*, 2008).

O interesse em terapias alternativas tem aumentado, independente dos avanços da indústria farmacêutica, com a busca de produtos naturais como as drogas de origem vegetal. A OMS estimou que 65-80% da população que vive em países em desenvolvimento, depende essencialmente de plantas medicinais como tratamento primário à saúde (CALIXTO, 2000). Dentro deste contexto, as plantas vem sendo cada vez mais alvos de pesquisas, considerando os efeitos colaterais

provocados e a resistência desenvolvida pela maioria dos patógenos em relação as drogas sintéticas, o desenvolvimento de novos fitoterápicos são alternativas de baixo custo e fácil acesso.

3.4.1 Óleos Essenciais

Os produtos provenientes de fontes naturais como os óleos essenciais (OEs), são promissores no combate de diferentes patógenos, tendo em vista as suas ações antimicrobianas, antifúngicas e antiparasitárias já descritas na literatura (PEREIRA et al., 2004; DE OLIVEIRA LIMA, et al., 2006; LIU, et al., 2017). Possuem um baixo custo e menores reações adversas, tornando-se uma possível alternativa para o tratamento da tricomoníase. Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, são provenientes do metabolismo secundário das plantas, os quais devem suas propriedades biológicas aos constituintes químicos presentes, principalmente aos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (SIMÕES et al., 2010).

A rápida evolução dos microrganismos, e a resistência desenvolvida por eles frente aos fármacos existentes, como no caso do *T. vaginalis* frente ao MTZ, tem incentivado a pesquisa em busca de novas alternativas para o tratamento das doenças infecciosas (LIMA et al., 2012). No estudo realizado por Frasson et al. (2012), o extrato de *Polygala decumbens* foi capaz de reduzir *in vitro* a viabilidade do trofozoíto de *T. vaginalis*, apresentando atividade contra seis isolados clínicos, incluindo uma cepa metronidazol resistente.

Dentre as plantas com potencial terapêutico candidatas ao tratamento da tricomoníase, encontra-se o capim-limão ou erva cidreira, originário da Índia, encontrado em vários países tropicais (Figura 3) (MING et al., 1996). No Brasil, a espécie de capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., é a mais conhecida e comumente empregada como antiespasmódico, analgésico, antipirético, anti-inflamatório, diurético e sedativo na forma de chá. Além de inúmeros estudos realizados a fim de avaliar as suas atividades farmacológicas como larvicida, antimicobacteriana, antifilárica, ascaricida, antinociceptiva, hipoglicêmica, hipolipidêmica, entre outras (SHAH et al., 2011). Este OE é rico em citral (Figura 4), amplamente empregado na indústria alimentícia e farmacêutica (KOSHIMA et al., 2006).



Figura 3: *Cymbopogon citratus* (Capim-limão)

Fonte: Wikipédia Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Cymbopogon_citratus

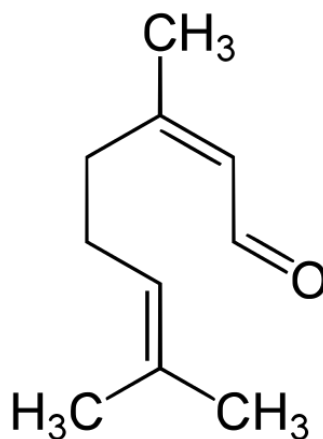


Figura 4: Estrutura citral

Fonte: Wikipédia Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Citral>

Estudos vêm demonstrando também promissoras atividades fungicida e antimicrobiana do óleo dessa espécie, sendo estas atividades atribuídas a mistura isomérica do alfa-citral (geranial) e beta-citral (neral), devendo ser avaliada a atividade desse óleo e de seu composto majoritário sobre demais patógenos, tendo em vista seu potencial para o controle de microrganismos (ONAWUNMI *et al.*, 1984; HAMMER *et al.*, 1999). Recentemente tem sido extensivamente avaliado as propriedades antiprotozoárias deste OE, apresentando atividade parasitária contra *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp., e *Tripanossoma* sp., o que reforça o possível

potencial desse gênero frente ao flagelado *T. vaginalis* (TCHOUMBOUGNANG *et al.*, 2005; SANTIN *et al.*, 2009; SANTORO *et al.*, 2007).

Outra espécie vegetal amplamente utilizada na medicina popular por suas ações terapêuticas é o *Eucalyptus globulus* L. (Figura 5), popularmente conhecido como eucalipto comum, o qual apresenta em seu óleo essencial compostos majoritários como eucaliptol e cineol, responsáveis pelas suas atividades antifúngicas e antimicrobianas (DE CASTRO & OLIVEIRA, 2010). O gênero *Eucalyptus* pertencente à família Myrtaceae é originário da Austrália, mas é encontrado na maioria dos continentes, sendo popularmente empregado como anestésico, expectorante, anti-inflamatório e antisséptico (BACHIR *et al.*, 2012).

O OE *Eucalyptus globulus* também possui amplo uso na indústria de cosméticos, alimentícia e farmacêutica (MULYANINGSIH *et al.*, 2011). Suas atividades antifúngica, antimicrobiana, inseticidas, carrapaticidas já foram relatadas (MOTA *et al.*, 2015; ABDEL *et al.*, 2005; CHAGAS, 2002), além do seu potencial antiprotozoário frente a tripomastigotas de *Trypanoma evansi* (BAWN *et al.*, 2010).



Figura 5: *Eucalyptus globulus* L. (Eucalipto comum)

Fonte: Wikipédia Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Eucalyptus_globulus

O manjerição (*Ocimum basilicum* L.) (Figura 6), planta medicinal de origem asiática, pertencente à família Lamiaceae, é encontrado facilmente durante o ano inteiro no Brasil devido a sua boa adaptação às condições climáticas do país (MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.*, 2011; VELOSO, 2012). Esse OE detém vários

compostos químicos possuidores de inúmeras propriedades terapêuticas, antibacteriana, antisséptica, antioxidante e anti-inflamatória (ÁVILA, 2008).

É amplamente utilizado na medicina popular na forma de infusão devido as suas atividades antireumática, digestiva e antiespasmódica (LORENZI; MATOS, 2002), além de ser muito utilizado em perfumarias e aromatização de alimentos e bebidas (COSTA *et al.*, 2009). O chavicol e o linalol, principais compostos químicos isolados do OE desta espécie vegetal, apresentam resultados promissores frente a protozoários (MOTA *et al.*, 2012; DE ALMEIDA *et al.*, 2007). *O. basilicum* é um agente promissor no tratamento da tricomoníase, segundo Eldin *et al.*, (2015), a exposição do TV ao OE dessa planta causou danos a membrana do trofozoíto e vacuolização do citoplasma, impedindo dessa forma o crescimento e proliferação do parasito.



Figura 6: *Ocimum basilicum* L. (Manjerição)

Fonte: Wikipédia Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Manjeri%C3%A7%C3%A3o-de-folha-larga>

Estudos recentes demonstraram a atividade do OE de própolis vermelho sobre os trofozoítos de *T. vaginalis*, apresentando 100% de atividade na concentração de 500 µg/ml após 24 horas e IC₅₀ na concentração de 100 µg/ml, ressaltando o potencial dos óleos essenciais sobre este parasito (SENA-LOPES *et al.*, 2018). Cada óleo essencial apresenta específicos componentes químicos majoritários na sua composição. Entretanto, deve-se também considerar os demais constituintes, mesmo que em menores concentrações, pois a ação sinérgica desencadeada entre eles pode também ser responsável pelos efeitos inibitórios exercidos sobre os parasitos (MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2009).

Um dos benefícios de buscar, a partir de óleos essenciais, novos produtos terapêuticos no combate de doenças infecciosas, é enfatizado pelo baixo risco de

desenvolvimento de resistência dos micro-organismos patogênicos frente a esses produtos, considerando a atuação deles por meio de diversos mecanismos e a produção de substâncias complexas em diferentes misturas e concentrações, as quais variam de acordo com fatores genéticos e climáticos (RAHMAN & KANG, 2009; de MORAIS, 2009).

3.5 Atividade Antioxidante e estresse oxidativo

Nos processos metabólicos normais dos organismos aeróbicos há a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), conhecidos por radicais livres (RL), os quais podem ser aumentados por fatores exógenos físicos e químicos, provocando um desequilíbrio chamado de estresse oxidativo, o qual interfere nos processos biológicos e fisiológicos causando consequentemente danos celulares (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006; COTINGUIBA *et al.*, 2015). As EROs são: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}\bullet$) os quais fazem parte do grupo dos radicalares; e os oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, as quais compõe o grupo dos não-radicalares. Já as ERN são: o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-)¹⁰ (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006). O NO por exemplo, catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NO_s), desempenha papéis essenciais na vida de mamíferos, entretanto a produção desenfreada desse radical pode causar sérios danos (SUN *et al.*, 2003).

O estresse oxidativo pode ser descrito como o desequilíbrio entre a formação de RL e sua remoção do organismo, decorrente da geração excessiva de espécies reativas e/ou diminuição de antioxidantes endógenos. A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente, é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de RL pode causar danos e morte celular (WILKINSON *et al.*, 1996). A produção excessiva desses radicais são prejudiciais ao organismo, podendo causar a peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e às enzimas, carboidratos, causando danos graves ao DNA (PIETTA *et al.*, 2000; BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006).

A peroxidação lipídica é um processo contínuo e o mais comum que ocorre nos organismos vivos durante a respiração, levando a produção de RL na presença de oxigênio. Estes interagem nas membranas celulares com os ácidos graxos poli-insaturados, dando início a esse processo e sendo convertidos em peroxilipídeos e metabólitos secundários tóxicos como o malondialdeído (MDA). A fim de avaliar o balanço redox para análise dos danos causados pelo estresse oxidativo e com a finalidade de avaliar a deficiência das defesas antioxidantes, os metabólitos tóxicos originários da peroxidação é um biomarcador a ser quantificado através do teste TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), o qual é baseado na reação do produto de peroxidação lipídica, o MDA, com o ácido tiobarbitúrico, sendo considerado um dos principais biomarcadores de estresse oxidativo (LITTLE & GLADEN, 1999).

Nesse contexto, ressalta-se que as plantas possuem substâncias antioxidantes. Devido a isso, os óleos essenciais são alvos de pesquisa nos últimos anos, devido os seus constituintes terpênicos e polifenólicos, os quais possuem o potencial de remover os RL, quebrar a cadeia de oxidação lipídica, além de regenerar outros antioxidantes (PIETTA, 2000; SACCHETTI *et al.*, 2005; SICHIERI, 2013).

3.6 Citotoxicidade

Para a introdução de novos fármacos é necessário que nos estágios iniciais seja realizada uma avaliação de citotoxicidade desses constituintes, a qual pode ser realizada em uma variabilidade de células, detectando os possíveis efeitos sobre elas e fornecendo informações sobre a segurança para uma possível utilização desses compostos com fins terapêuticos, a fim de dar continuidade nos estudos ou serem descartadas (PUTNAM, BOMBICK & DOOLITTLE, 2002).

A verificação da citotoxicidade nos óleos pode ser avaliada por uma série de bioensaios que são considerados mais ou menos sensíveis, expressando assim, resultados satisfatórios para utilização como triagem em relação à toxicidade dos mesmos (SOTELO-FÉLIX, 2002). Este ensaio é realizado *in vitro* onde a amostra é colocada direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos e

avaliando o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelo composto testado (ROGERO *et al.*, 2003; CHORILLI, *et al.*, 2009).

Entre os inúmeros ensaios disponíveis para a avaliação da viabilidade celular encontra-se o método colorimétrico MTT (3- (4,5)-dimetiltiazolil-2,5- difeniltetrazólio). Este se baseia na redução do MTT a partir da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, presente somente em células metabolicamente ativas, a um produto insolúvel, o azul de formazan, permitindo avaliar a citotoxicidade em diferentes células (DIAS *et al.*, 1999).

3.7 Docking Molecular

A busca por novos compostos biologicamente ativos com baixa toxicidade, alta biodisponibilidade e outras características necessárias para ser produzido e introduzido no mercado para o tratamento de doenças é complexo e demorado. A fim de identificar o sítio de ação de novos fármacos em relação a um determinado patógeno, vem sendo utilizados métodos computacionais, chamando de “docking molecular” (SETHI *et al.*, 2019).

O docking molecular é a investigação da possível interação e orientação de uma determinada molécula bioativa no interior de um sítio ativo em um biorreceptor, expressada na forma de energia de ligação (FERREIRA *et al.*, 2015). Dessa forma, a capacidade de prever com precisão o encaixe dessas moléculas através desse recurso é de extrema valia para o processo de descoberta de novos compostos antiparasitários com alta especificidade e importante para o desenvolvimento de fármacos clinicamente úteis.

3.8 Nanoemulsões

A fim de obter um produto mais estável, a nanotecnologia vem sendo muito usada na indústria farmacêutica, conferindo inúmeros benefícios, como o direcionamento do fármaco a locais específicos, liberação controlada, melhora da biodisponibilidade e diminuição dos efeitos colaterais (BRUXEL *et al.*, 2012). A capacidade dos nanocarreadores de veicular agentes bioativos, tornam esses sistemas promissores para o tratamento de diversas enfermidades (ROSSI-BERGMANN, 2008).

Através desta tecnologia, diversos autores vêm pesquisando diferentes formas de nanoestruturar os óleos essenciais, com a finalidade obter uma diminuição da volatilização e consequente instabilidade e aumentar a vetorização do óleo (DANIELLI *et al.*, 2013). Desde 1998 vem sendo estudada a Anfotericina B lipossomada no tratamento da leishmaniose visceral, doença infecto-parasitária também causada por protozoário flagelado. Este fármaco apresenta, mesmo em altas doses, menor toxicidade renal que a apresentação convencional e dos antimoniais pentavalentes. O medicamento na sua forma lipossômica, em dose única apresenta 100% de eficácia, similar a 15 dias de tratamento com a Anfotericina B convencional (1mg/kg/dia) (LIMA *et al.*, 2007; SUNDAR *et al.*, 2016).

O sistema de liberação de fármacos nanoestruturados é uma alternativa para voltar a introduzir na clínica fármacos promissores já não mais utilizados devido a sua baixa biodisponibilidade, efeitos colaterais e resistência apresentada (ROSSI-BERGMANN, 2008). Uma grande vantagem das nanoemulsões, dispersões estáveis de tamanho nanométrico, compostas por óleo, água, e um ou mais agentes emulsionantes, é o uso tópico, promovendo uma alta absorção por essa via de administração, devido a suas características lipofílicas semelhantes a dos tecidos e por apresentarem pouca irritabilidade (BRUXEL *et al.*, 2012; da SILVA PATIAS, 2016).

Em frente às inúmeras vantagens que dispõem esse sistema de liberação de ativos, juntamente com as promissoras inovações tecnológicas da área farmacêutica, vem se expandindo as pesquisas em busca de tratamentos mais eficazes, com redução das doses administradas e menores efeitos adversos. Na área da parasitologia, inúmeros estudos vêm sendo realizados a fim de avaliar a atividade parasitária de produtos naturais associados a nanotecnologia.

O efeito da licochalcona A foi avaliado sobre o parasito *Schistosoma mansoni*, apresentando *in vitro* atividade em menor concentração quando incorporada em nanopartículas lipídicas sólidas do que livre enquanto *in vivo* foi capaz de reduzir 30% da carga parasitária, atividade a qual não foi observada na forma livre (SILVA, 2018). Também foi avaliada a atividade amebicida de nanoemulsões contendo extrato hexânico de *Pterocaulon balansae* para o tratamento da ceratite ocular, apresentando a concentração de 1,25 mg/ml desse extrato rico em cumarinas capacidade de inativar 95% dos trofozoítos de

Acanthamoeba castellanii em 24 horas, além de não apresentar *in vitro* citotoxicidade frente às células de epitélio de córnea humana (FERREIRA PANATIERI, 2015). O potencial larvicida da nanoemulsão contendo o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. também foi observado, inibindo 90% das larvas de *Aedes aegypti* em 48 horas (DUARTE *et al.*, 2015).

Dentro deste contexto, os produtos de origem natural e o uso de OEs associados à nanotecnologia, podem ser considerados sistemas terapêuticos com promissora abordagem no tratamento de doenças parasitárias.

4 Artigo 1. Evaluation *in vitro* of anti *Trichomonas vaginalis* and antioxidant activities of free and nanostructured essential oils

**Artigo submetido à Revista ACTA PARASITOLOGICA – B3
(Anexo A)**

Evaluation *in vitro* of anti-*Trichomonas vaginalis* and antioxidant activities of free and nanostructured essential oils

J.M. FENALTI^{1*}, B. BACCEGA¹; R.N. NEVES², M. BRUNI¹, A.B. MELLO¹, Y. W. ISLABÃO¹, S.S. GÜNDEL³, M.C. VELHO³, S.N. GODOI³, P.T. BIRMANN⁴, D.F. ACOSTA⁵, A.F. OURIQUE³, L. SAVEGNAGO⁴, N.A.R. FARIAS¹, C.B. OLIVEIRA¹

¹ Post Graduate Program, Department of Microbiology and Parasitology- Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

² Laboratory of Infectious-Parasitic Biotechnology, Center for Technological Development, Biotechnology, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

³ Laboratory of Nanotechnology - Franciscan University, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Technologic Development Center, Biotechnology Unit, Neurobiotechnology Research Group, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil ⁵ Faculty of Medicine of Pelotas - Federal University of Pelotas

⁵ Faculty of Medicine of Pelotas - Federal University of Pelotas

* Corresponding author: Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Pelotas (UFPel), RS, Brazil. E-mail: jufenalti@hotmail.com; camilabelmontevet@yahoo.com.br

Address: Avenida Eliseu Maciel s/nº - Campus Capão do Leão – UFPel

Abstract

Introduction: Trichomoniasis, infection caused by *Trichomonas vaginalis* is the most common non-viral sexually transmitted infection worldwide. Due to the resistance showed by Metronidazole (MTZ), standard drug, this study aimed to evaluate the efficacy of *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass), *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) and *Ocimum basilicum* (basil) free Essential oils (EOs) and nanostructured besides antioxidant activities against *T. vaginalis*.

Materials and Methods: Free EOs and nanostructured was tested for *in vitro* activity against *Trichomonas vaginalis*; trophozoites were treated with different concentrations (ranging from 0.25% to 1.5%) in order to establish the MIC and IC50 values. Oxidative stress was also evaluated by measuring lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) detection.

Results: The MIC observed to lemongrass was 660 µg/ml to free oil 440 µg/ml to nanoemulsion and to basil was 1080 µg/ml either in free or nanostructured form. Were observed significant antiparasitic activities in 12 and 24 hours exposure, respectively, inhibiting 100% of trophozoites, and showed similar results when compared with metronidazole. Antioxidant activity was also observed in these oils, either in free or nanostructures forms were able to reduce the lipid peroxidation.

Conclusions: EOs were more effective than standard drug, MTZ, and in association with nanoemulsions, a novel nanocarrier that combine advantages of enhance de activity of the compound that is carrying besides developing a new biologically active natural drugs with lowest and non-toxic concentration, becoming a promising alternative to the treatment of trichomoniasis.

Key Words: nanotechnology, trichomoniasis, *Cymbopogon flexuosus*, *Eucalyptus globulus*, *Ocimum basilicum*.

Introduction

Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) in the world. This infection is caused by the flagellated protozoan *Trichomonas vaginalis* (TV) (Muzny, 2018). This parasite is considered the main agent responsible to the occurrence of vaginitis in woman and also been associated to infertility, cervical cancer, pelvic

inflammatory disease, preterm birth and low birth weight. Besides, indicated factor of risk to human immunodeficiency virus acquisition and transmission (Kissinger, 2015).

Since 1959, metronidazole (MTZ) has been the drug of choice for the treatment of trichomoniasis, is recommended a 2g single oral dose or 500 mg twice daily for 7 days, the last regimen is suggested to HIV infected or recidives patients (Soper, 2004; CDC, 2015). Side effects such nausea, vomiting and epigastric pain promotes a barrier to patients finish the protocol of treatment, which promotes the appearance of resistant strains (Bouchemal *et al.* 2017).

In front of this resistance, natural products have been important sources of novel therapeutic, the literature demonstrates the remarkable performance of essential oils (EOs), derived from secondary metabolism of plants, showing many biological activities (Bilia *et al.* 2014). In reason of lipophilic and also chemical characteristics, EOs could be incorporate into nanostructures. Nanotechnology is an alternative to facilitates and improve its absorption and distribution to target cell, besides reduce the volatility and instability through the incorporation in nanocapsules (Couvreur and Vauthier, 2006; Danielli *et al.* 2013). Thus, the aim of this study was evaluate the efficacy of essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Eucalyptus globulus* and *Ocimum basilicum* against *T. vaginalis*, comparing both forms, free and nanostructured.

Materials and Methods

***Trichomonas vaginalis* recovered and Method of culture**

Trichomonas vaginalis was isolated from vaginal discharge of female patients attending at Gynecology Ambulatory in Faculty of Medicine of Federal University of Pelotas (UFPel)

during routine medical appointments. To isolate and keep the axenic culture, trophozoites were inoculated in TYM (trypticase–yeast extract–maltose) medium, pH 6,0, supplemented with 10% inactivated bovine serum and antibiotic (meropenem) at 37°C (Diamond, 1957). Isolates were sub-cultured every 24 hours in new culture tube containing TYM medium and maintained at laboratory.

***In vitro* assay**

Sample of culture were taken and viable trophozoites were counted in Neubauer cell-counter chamber, in triplicate, to adjusted the final concentration to 2×10^5 trophozoites/ml culture. The tests were performed at 37°C at atmosphere of 5%CO₂, in nonoplicate, in 96 wells microtiter plates according Sena-Lopes *et al.* (2018). Free and nanostructured oils was added to each well containing 100 µL of medium with *T. vaginalis* trophozoites, to reach a final concentration of 0.5%, 1.0% and 1.5%. The viabilities of the trophozoites in the culture plate wells were assessed by counting of parasites at 24h in Neubauer cell-counter chamber with 0,4% Trypan blue dye. Was determinate also IC50 (half the maximum inhibitory concentration) and evaluate the minimal inhibitory concentration (MIC) from free oils or nanoemulsions that was able to inactivate 100% of viable cells at the screening. The oils that showed activity after 24 hours of exposure were determined the MIC and checked the kinetic growth of cells after 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h. Additionally, was evaluate also four controls containing trophozoites with: TYM medium (negative control), 100mM metronidazole Sigma-Aldrich® (positive control), control of Tween 80 0.01% (solubilizer) and blank nanoemulsions. The same procedure of screening was applied for all tests.

Essential oil

The essential oils of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) were commercially obtained respectively from FERQUIMA Indústria e Comércio de Oliveira de Oliveira, and basil (*Ocimum basilicum*) from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) Trade Ltda. The characterization of free essential oils of lemongrass, eucalyptus and basil using the Varian Star 3400CX gas chromatograph (CA, USA). For the qualitative analysis of the compounds was performed using a Shimadzu QP2010 Plus gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC / MS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Godoi *et al.* 2017; Da Silva Gündel *et al.* 2018a, 2018b). Oil free and nanostructured were assigned to the present study by the Nanotechnology Laboratory of the Franciscana University of Santa Maria-RS (UFN).

Development of nanoemulsions

Nanoemulsions were developed under high agitation method with homogenizator to incorporate the EOs lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) or basil (*Ocimum basilicum*) according to Da Silva Gündel *et al.* (2018a), Godoi *et al.* (2017) and Da Silva Gündel *et al.* (2018b), respectively. The nanoemulsions were composed of two phases, oil and aqueous. The essential oil (5% lemongrass or 5% eucalyptus and 7.5% basil) and sorbitan monoleate surfactant (2%) are part of oil phase, while polysorbate 80 (2%) and ultrapure water are part of the aqueous phase. Both phases were prepared individually, and then were homogenized in the Ultra-Turrax® (IKA, Germany) equipment. The aqueous phase was placed first and homogenized at 10.000 rpm, after 10 minutes the oil phase were injected into the aqueous phase, and maintained in the Ultra-Turrax® at 17,000 rpm more 30 minutes, with temperature control. The blank nanoemulsion was developed using a medium chain

triglyceride, derived from caprylic and capric acids (Godoi *et al.* 2017; Da Silva Gündel *et al.* 2018a, 2018b).

Characterization of nanoemulsions

The physicochemical characterization of the formulations was evaluated by determining the mean droplet size, polydispersity index, zeta potential and pH. The mean droplet size and polydispersity index were determined by the dynamic light scattering technique (Zetasizer® equipment, nano-ZS model ZEN 3600, Malvern) after sample dilution (500 times) in ultrapure water. The zeta potential was determined using the electrophoretic mobility technique (Zetasizer® equipment, nano-ZS model ZEN 3600, Malvern) after sample dilution (500 times) in aqueous solution of sodium chloride (10 mM). The pH was determined using a potentiometer (DM-22, Digimed®) previously calibrated with standard solution, and the readings were carried out directly in formulations. All readings were done in triplicate and the results expressed as mean $\pm$ standard deviation (Gündel *et al.* 2018a). The nanoemulsions were stable under refrigeration for 90 days, maintaining during this period the same parameters when characterized immediately after preparation.

Preparation of dilutions used in the parasitological assay

From stock solution of free and nanoemulsions oils (100%), were prepared dilutions in TYM medium at double concentration of desired for testing. At the time of *in vitro* assay, the oils free or nanoemulsions were add to TYM medium containing trophozoites, both at same volume (100 μ l), to obtain desire concentrations ranging from 110 to 1080 μ g/ml (0.25 to 1.5%).

Statistical analysis

The results of *in vitro* tests are presented as percentages and were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) followed by comparison with the Tukey test using Graph Pad Prism 7.04 software. The significance level was $p < 0.05$.

Results

In the present *in vitro* study, was observed an antiprotozoal activity of lemongrass and basil oils in pure and nanostructured form. The nanoemulsions of lemongrass oil exhibited highly antiprotozoan effect against *T. vaginalis* as well the pure form of oil, followed by basil free oil.

The nanoemulsions formulation used in this study present nanometric size, ranging the average size of all nanoemulsions 66 to 127 nm, homogeneous size distribution as can be observed at polydispersity index and the zeta potential was also measured like pH, as showed at Table 1.

The major compounds was determine by gas chromatography, identifying as the major constituent in the *C. flexuosus* essential oil composition used in our study were β -geranial (45.74%), Z-citral (34.42%) and geraniol (6.01%). The components of *O. basilicum* oil also was determinated by gas chromatography, the major constituent of this oil estragole (87%), 1,8-cineole (3%) and trans-alpha-bergamotene (2%). The main components identified of oil *E. globulus* was 1,8- cineole (75.7%); p-cymene (7.5%); alpha-pinene (7.3%); and limonene (6.4%) (Da Silva Gündel et al. 2018).

Free as well as nanoemulsion oil of lemongrass showed similar statistics results between them. When compared with MTZ, free oil at 660 $\mu\text{g/ml}$ (1,5%) concentration inhibited the growth of *T. vaginalis* like the standard drug, however when incorporate into

nanoemulsions, showed activity in lower concentration than free form, don't presenting significant statistic difference to MTZ also (Fig. 1). The efficacy of lemongrass can be observed through the Minimal Inibitory Concentration (MIC), at 12 hours of exposure, exhibiting free oil MIC of 660 µg/ml and 440 µg/ml to nanoemulsions, showing both presentations high potential when compared to the standard drug (Fig. 2) and IC₅₀ of 220 µg/ml and 110 µg/ml, respectively.

However, don't be observed the same results with *Ocimun basilicum* (Lamiaceae). Free oil and nanoemulsion showed no statistical significant difference between them and when compared to metronidazole (Fig. 1). Basil free oil showed 90% inhibition of trophozoites growth with MIC of 1080 µg/ml after 12 h incubation period, reached 100% inhibition after 24 h and nanoemulsion at the same concentration be able to inactivate all parasites at the same period (Fig. 2). The IC₅₀ values shown by this oil in free form was 180 µg/ml when into nanoemulsion was 360 µg/ml. The inhibition of *T. vaginalis* trophozoites growth was time-dependent, as are shown in the graphic (Fig. 2).

The activity of *Eucalyptus globulus* L. free and nanostructured oil was also evaluated in our study, but were not effective against *T. vaginalis*, the cells were viable even after 24 h of incubation (Fig. 1).

At TBARS assay was observed that trophozoites at negative control (NC) increased lipoperoxide levels, nevertheless, when added free EO or nanoemulsion containing theses oils, as well as Tween 80, the peroxidation activity was reduced, showing significant difference when compared to NC, as shown in the graphic (Fig 3).

Discussion

Several reports over the years have shown, even low level, MTZ resistance when exposed to *T. vaginalis* (Meingassner & Thurner, 1979; Kulda *et al.* 1982; Meri *et al.* 2000; Kirkcaldy *et al.* 2011). Studies which aimed to evaluate the biological activities like our research, emphasize the increase of the search for new metabolites with therapeutics value considering the large biodiversity and the potential of natural products in the treatment of diseases (Basso *et al.* 2005). In our study was observed promising results using lemongrass and basil EO, in addition to the new data with nanoemulsion

In this work, compounds identified by gas chromatography in *C. flexuosus* corresponding to literature, the lemongrass is composed mainly citral, an isomeric mixture of two compounds, alfa-citral (geranial) and beta-citral (neral) (Ming *et al.* 1996; Kakarla *et al.* 2009). These major components probably determine the several biological properties of *C. citratus* specie well known, such antiprotozoan, antibacterial and antifungicidal (Onawunmi *et al.* 1984; Hammer *et al.* 1999; Tchoumboungang *et al.* 2005; Boukhatem *et al.* 2014), however, this is the first report of *C. flexuosus* specie anti-*T. vaginalis* activity. In addition, complex natural mixture, where the synergism between these chemical composition could be linked to the promisor pharmacological potential of them (Bakkali *et al.* 2008, Galindo *et al.* 2010). Thus, acting through differents mechanism of action in several targets in cell, as in cell proteins present in the cytoplasmic membrane (Burt *et al.* 2004).

Highlighting the potential of this specie, four strains of *Acinetobacter baumannii* including two multi-drug-resistant, showed susceptibility when exposed to from *C. flexuosus* oil and citral, been an alternative in resistant infections (Adukwu *et al.* 2016), as detected in our study, higher trophozoites inactivation of *T. vaginalis* when treated with lemongrass in both presentation.

Nanotechnology has been used such as alternative to improve the activity of the EOs. Nanocarriers contribute to the cellular absorption increase and bioefficacy, avoiding the decompose of these oils against environmental factors, that way keeping the stability and decreasing the volatility, which can justify the higher activity presented in lower concentration by *C. flexuosus* nanoemulsion when exposed to the trophozoites (Bilia *et al.* 2014). This nanoemulsion was able to reduce the MIC of lemongrass, when compared to free oil, as observed with a nanostructured drug in other study (Baldissera *et al.* 2013; Fuentesfria *et al.* 2014; Bajerski *et al.* 2016). The protection offer by nanostructure to bioactive content enhance the delivery to target, showing more effective than other conventional forms (Lovelyn *et al.* 2011).

Researches have suggested that the use of drug system delivery in nano size may increase the passive cellular absorption, probably through the association of porins and phenolic compounds. This interaction promote the cell breaking in consequence of leakage of ions and others contents of cell, increasing the bioactivity and consequently the therapeutic efficacy of oils when nanostructured (Donsi *et al.* 2012; Salvia-Trujillo *et al.* 2015), which justify the better activity of lemongrass nanoemulsion observed in our study against *T. vaginalis*, eventhough don't be observed thus proprerties with basil.

Nanoparticles are solid and spherical particles prepared from differents materials with dimension ranging 0,1 to 500 nm, this size and biocompatibility could lead better penetration into trophozoites membrane and facility the EO activity, wich could explain the significantly inhibitory activity observed in our tests (Breno *et al.* 2015). This characteristic contribute to the efficiency of nanoemulsion activity, considering that zeta potential different from zero reduce the instability and polydispersity index less than 0.3 demonstrate the uniformity of monodisperse system (Flores *et al.* 2011; Danei *et al.* 2018). According to literature, the

nanoemulsion possess adequate properties and morphology and preserved within 90 days the same quantity of major compounds when storage under refrigeration.

The surface charge of nanoemulsions droplets, also known as zeta potential, is the electrical characteristics of the delivery system drug (McClements *et al.* 2011). The control of the charge is a way to control the interactions with infect agent, once, microorganisms possess opposite charges than nanoemulsions, when in contact with oil incorporate into these droplets will be occur electrostatic attraction (Ziani *et al.* 2011; Chang *et al.* 2015). This way, increasing the concentration of the oil at the target cell and consequently improving the biological activity (Donsi & Ferrari, 2016). Even though, the electrostatic attraction could be discarded in this study, because the nanoemulsion posses negative charge and the trophozoites membrane is compound mainly by sialic acid wich contributed to negative charge of the protozoan also (Costa e Souza, 1986).

Was observed by Anwer *et al.* (2014) higher bioactivity of clove EOs when nanostructured than free oil and than amikacin, the same was evidenced in this present study, with higher activity of lemongrass incorporate into nanostructures than free oil and MTZ, highlinghting the potencial of natural products associate to nanoemulsions droplets, promoting the enhance of biological properties of the compounds to the target.

The obtained results are in accordance with the literature, the same ability of the free EO to inhibit the growth of *T. vaginalis* observed in our research is also reported by Eldin *et al.* (2015). In this study, the growth inhibition was dose and time dependent and non statistical significant difference was detected when compared to MTZ. They suggest that the antiprotozoal activity observed probably is related to the capacity of basil to inhibit the proteolytic activity of cysteine proteinase, an enzyme present in the life cycle of several protozoan, the same may occur with *T. vaginalis*.

However, there are no reported studies using nanoemulsions containing *O. basilicum* with anti – *Trichomonas* activity for comparison, this is the first time that was reported the activity of this oil nanostructured against this protozoan. This activity of free oil can be justified also through the characteristics of the EO, which one possess low density and hydrophobicity that facility the delivery of active compounds into specific target cell at parasites (Monzote *et al.* 2005). At literature is evidenced that the oil of basil is constitute by terpenes (linalool and geraniol) and phenylpropanoids (methyl chavicol, eugenol, methyl eugenol and methyl cinnamate), this varying of concentration or presence of major compound between the species can be justified due the ambiental factors and geography where the plant were obtained (Özcan *et al.* 2005; Pandey *et al.* 2014). The pharmacological potential of *O. basilicum* oil was highlighting in the literature, showing also antibacterial, antioxidant, insecticidal and antifungal properties (Dube *et al.* 1989; Politeo *et al.* 2007; Thongchai *et al.* 2018).

The absence of parasitic activity of *Eucalyptus globulus* L. free and nanostructured oil probably is due that this is not able to adhere to the membrane of trophozoites. Otherwise, five extracts from another specie, *E. camaldulensis* showed growth inhibitory activity when exposed to the parasite (Youse *et al.* 2012; Hassani *et al.* 2013). According to Azerad *et al* (2014), 1,8- cineole is commonly found in high concentration in EO from several species of eucalyptus.

Anti-*trichomonas* activity revealed that, no growth was observed after 24h of incubation of *C. flexuosus* and *O. basilicum*. The mechanism of action of EOs against microorganisms has not been enlightened, studies deduced that the bioactive compounds penetrate to the phospholipid bilayer after attach the membrane, acting directly in the synthesis of the components cell promoting a structural destabilization and consequently parasite death (Lambert *et al.* 2001; Chouhan *et al.* 2017). The activity of EOs against

parasites is conferred to major compounds or to the synergism between all compounds. Is suggested by the literature that this relationship of bioactives compounds contribute to avoid the emergence of new resistant strains, due the different receptors that the oil can react during all stages of life cycle of parasite (André *et al.* 2018).

EOs can be considered good sources of natural compounds with significant antioxidant activity, which can be also attributed to the main constituents. The capacity of phenolics compound to donating hydrogen or an electron and remove oxygen from free radicals are responsible for this biological propertie (Singh *et al.* 2015). Our results confirmed earlier reports, the antioxidant activity is conferred to EOs, wich is justified by the presence of lipid peroxidation also at blank nanoemulsion, don't presenting significative difference from NC and when introduced the oil into this system was detected the decrease of MDA concentration.

The reduction of lipid peroxidation observed at the treatments with free and nanostructured oils are confirmed in earlier reports, is well known that lemongrass are source of bioactives compounds, flavonoids and vitamins which could inhibit the chain reactions of lipid oxidation (Ibrahim and Salem, 2013).

Conclusions

Lemongrass and basil are a promissing alternative to the treatment of trichomoniasis. Furthermore lemongrass showed that the incorporation of oils in nanoemulsions is an attractive option in the developing of new biologically active natural drugs, in search to promoting therapeutich efficacy in the treatment of this IST.

Contributorship statement

J.M. FENALTI* : *in vitro* test, maintenance of culture, sample collections

B. BACCEGA, R.N. NEVES: *in vitro* test, maintenance of culture, *in vitro* test

M. BRUNI, A.B. MELLO, Y. W. ISLABÃO: preparation of TYM medium and sample collections

D.F. ACOSTA: sample collections

S.S. GÜNDEL, M.C. VELHO, S.N. GODOI, A.F. OURIQUE: preparation of nanoemulsion and oil characterization

BIRMANN P.T., L. SAVEGNAGO: Antioxidant TBARS test

N.A.R. FARIAS, C.B. OLIVEIRA: Orientation

Acknowledgements We thank all the involved at FAMED for provide us swab of vaginal discharge to obtain *Trichomonas vaginalis* strains and UFN the essential oil and nanoemulsions.

Funding This work was supported by grants from the Programa de Apoio a Pós-Graduação (PROAP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, DF, Brazil.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Federal University of Pelotas (Committee Approval number 873.180) and National Commission on Ethics in Research (amendment 1.838.829).

References

- Adukwu, E. C., Bowles, M., Edwards-Jones, V., & Bone, H. (2016). Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Applied microbiology and biotechnology* 100(22), 9619-9627. doi: 10.1007/s00253-016-7807-y
- André, W. P. P., Ribeiro, W. L. C., de Oliveira, L. M. B., Macedo, I. T. F., Rondon, F. C. M., & Bevilaqua, C. M. L. (2018). Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Acta Scientiae Veterinariae* 46, 1522. doi: 0.22456/1679-9216.81804
- Anwer, M. K., Jamil, S., Ibnouf, E. O., & Shakeel, F. (2014). Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. *Journal of oleo science*, ess13213. doi: 10.5650/jos.ess13213
- Anwar, H., Hussain, G., & Mustafa, I. (2018). Antioxidants from natural sources. *Antioxidants in foods and its applications*, 3-28.
- Azerad, R. (2014). 1, 8-Cineole: Chemical and Biological Oxidation Reactions and Products. *Chempluschem* 79(5), 634-655. doi: 10.1002/cplu.201300422
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology* 46(2), 446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106

Baldissera, M. D., Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., Zimmermann, C. E., Vaucher, R. A., Santos, R. C., ... & Koester, L. (2013). Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: in vitro tests. *Experimental parasitology* 134(3), 356-361. doi: 10.1016/j.exppara.2013.03.035

Bajerski, L., Michels, L. R., Colomé, L. M., Bender, E. A., Freddo, R. J., Bruxel, F., & Haas, S. E. (2016). The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 52(3), 347-363. doi: 10.1590/s1984-82502016000300001

Basso, L. A., Silva, L. H. P. D., Fett-Neto, A. G., Azevedo Junior, W. F. D., Moreira, Í. D. S., Palma, M. S., ... & Santos, D. S. (2005). The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100(6), 475-506. doi: /S0074-02762005000600001

Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014. doi: 10.1155/2014/651593.

Bouchemal, K., Bories, C., & Loiseau, P. M. (2017). Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. *Clinical microbiology reviews* 30(3), 811-825. doi: 10.1128/CMR.00109-16

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine* 9(1), 25431. doi: 10.3402/ljm.v9.25431

Breno N. Matos, Paula M. Oliveira, Camila A. Areda, Marcílio S. S. Cunha-Filho, Taís Gratieri, Guilherme M. Gelfuso. (2015) Preparações farmacêuticas e cosméticas com uso de nanotecnologia. *Brasília Médica* 52 (1), 8-20. doi: 10.14242/2236-5117.2015v52n1a296p8

Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2015). Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food chemistry* 172, 298-304. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.081

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines* 4(3), 58. doi: 10.3390/medicines4030058

Costa e Silva FF, Elias CA, de Souza W. (1986) Further studies on the surface charge of various strains of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Cell Biophys.* 8(3), 161–76.

Couvreux, P., & Vauthier, C. (2006). Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical research* 23(7), 1417-1450. doi: 10.1007/s11095-006-0284-8

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... & Mozafari, M. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* 10(2), 57. doi:10.3390/pharmaceutics10020057

Danielli, L. J., dos Reis, M., Bianchini, M., Camargo, G. S., Bordignon, S. A., Guerreiro, I. K., ... & Apel, M. A. (2013). Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. *Industrial crops and products* 50, 23-28. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.027

da Silva Gündel, S., de Souza, M. E., Quatrin, P. M., Klein, B., Wagner, R., Gündel, A., ... & Ourique, A. F. (2018a). Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. *Microbial pathogenesis* 118, 268-276. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.043

da Silva Gündel, S., Velho, M. C., Diefenthaler, M. K., Favarin, F. R., Copetti, P. M., de Oliveira Fogaça, A., ... & Ourique, A. F. (2018). Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 46, 378-383. doi: 10.1016/j.jddst.2018.05.038

de Almeida, I., Alviano, D. S., Vieira, D. P., Alves, P. B., Blank, A. F., Lopes, A. H. C., ... & Maria do Socorro, S. R. (2007). Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitology research* 101(2), 443-452. doi: 10.1007/s00436-007-0502-2

de Brum Vieira, P., Giordani, R. B., Macedo, A. J., & Tasca, T. (2015). Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. *Parasitology research* 114(4), 1249-1261. doi: 10.1007/s00436-015-4340-3

Donsi, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of biotechnology* 233, 106-120. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005

Dube, S., Upadhyay, P. D., & Tripathi, S. C. (1989). Antifungal, physicochemical, and insect-repelling activity of the essential oil of *Ocimum basilicum*. *Canadian journal of botany* 67(7), 2085-2087. doi: 10.1139/b89-264

Eldin, H. M. E., & Badawy, A. F. (2015). *In vitro* anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Pistacia lentiscus* mastic and *Ocimum basilicum* essential oil. *Journal of parasitic diseases* 39(3), 465-473. doi: 10.1007/s12639-013-0374-6

Flores, F. C., Ribeiro, R. F., Ourique, A. F., Rolim, C. M. B., Silva, C. D. B. D., Pohlmann, A. R., ... & Guterres, S. S. (2011). Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Química Nova* 34(6), 968-972. doi: 10.1590/S0100-40422011000600010

Fuentefria, A. M., Jesus, R. S., Back, P. I., Oliveira, T. V., Knecht, H., & Kuelkamp-Guerreiro, I. C. (2014). Ketoconazole-Loaded Poly (epsilon-Caprolactone) Nanocapsules for Improved Antifungal Activity Against *Candida* spp. *Latin American Journal of Pharmacy* 33(10), 1589-1595. doi:

Galindo, L. A., de Moraes Pultrini, A., & Costa, M. (2010). Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of natural medicines* 64(4), 436-441. doi: 10.1007/s11418-010-0429-2

Godoi, S. N., Quatrin, P. M., Sagrillo, M. R., Nascimento, K., Wagner, R., Klein, B., ... & Ourique, A. F. (2017). Evaluation of stability and in vitro security of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil. *BioMed research international* 2017. doi: 10.1155/2017/2723418

Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology* 86(6), 985-990. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780

Hassani, S., Asghari, G., Yousefi, H., Kazemian, A., Rafieiean, M., & Darani, H. Y. (2013). Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. *Advanced biomedical research*, 2. doi: 10.4103/2277-9175.114187

Hussain, A. I., Anwar, F., Shahid, M., Ashraf, M., & Przybylski, R. (2010). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research* 22(1), 78-84. doi: 10.1080/10412905.2010.9700269

Ibrahim HM, Salem FMA. (2013) Effect of adding lemongrass and lime peel extracts on chicken patties quality. *J Appl Scie Res* 9, 5035-5047.

Kakarla, S., & Ganjewala, D. (2009). Antimicrobial activity of essential oils of four lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) varieties. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 3(1), 107-09.

Kirkcaldy, R. D., Augostini, P., Asbel, L. E., Bernstein, K. T., Kerani, R. P., Mettenbrink, C. J., ... & Davis, D. (2012). *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. *Emerging infectious diseases* 18(6), 939. doi: 10.3201/eid1806.111590

Kissinger, P. (2015). *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC infectious diseases* 15(1), 307. doi: 10.1186/s12879-015-10550

Kulda, J., Vojtěchovská, M., Tachezy, J., Demes, P., & Kunzova, E. (1982). Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* as a cause of treatment failure in trichomoniasis - A case report. *Sexually Transmitted Infections* 58(6), 394-399. doi:

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology* 91(3), 453-462. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.

Lovelyn, C., & Attama, A. A. (2011). Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2(05), 626. doi: 10.4236/jbmb.2011.225075

McClements, D.J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51 4, 285-330. doi: 10.1080/10408398.2011.559558

Meingassner, J. G., & Thurner, J. (1979). Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 15(2), 254-7. doi: 10.1128/AAC.15.2.254

Meri, T., Jokiranta, T. S., Suhonen, L., & Meri, S. (2000). Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. *Journal of clinical microbiology* 38(2), 763-7.

Monzote, L., Alarcón, O. i Setzer, W.N. (2012). Antiprotozoal Activity of Essential Oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 77 (4), 167-175.

Christina A Muzny; (2018) Why Does *Trichomonas vaginalis* Continue to be a “Neglected” Sexually Transmitted Infection? *Clinical Infectious Diseases* 67(2), 218–220. doi: 10.1093/cid/ciy085

Onawunmi, G. O., Yisak, W. A., & Ogunlana, E. O. (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology* 12(3), 279-286. doi: 10.1016/0378-8741(84)90057-6

Özcan, M., & Chalchat, J. C. (2002). Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. *Czech Journal of Food Sciences* 20(6), 223-228. doi: 10.17221/3536-CJFS

Pandey, A. K., Singh, P., & Tripathi, N. N. (2014). Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(9), 682-694. doi: 10.12980/APJTB.4.2014C77

Politeo, O., Jukic, M., & Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry* 101(1), 379-385. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.045

Singh R, Nishi K. (2015) Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorossi* Gaertn.– A valuable medicinal tree. *Ind Crop Prod* 73, 1-8. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.04.012

Sena-Lopes, Â., Bezerra, F. S. B., das Neves, R. N., de Pinho, R. B., de Oliveira Silva, M. T., Savegnago, L., ... & Ely, M. R. (2018). Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PloS one* 13(2), e0191797. doi:10.1371/journal.pone.0191797

Soper, D. (2004). Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *American journal of obstetrics and gynecology* 190(1), 281-290. doi:10.1016/j.ajog.2003.08.023

Tchoumboungang, F., Zollo, P. A., Dagne, E., & Mekonnen, Y. (2005). In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Planta medica* 71(01), 20-23. doi: 10.1055/s-2005-837745

Thongchai T, Jakkrit J, Nuthapol M & Waya, S P. (2018). Major Compounds from *Ocimum basilicum* L . and their Antimicrobial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 3(3), 1-9. doi: 10.26717/BJSTR.2018.03.000910

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep. <https://www.cdc.gov/std/tg2015/trichomoniasis.htm>

Youse, H. A., Kazemian, A., Sereshti, M., Rahmanikhoh, E., Ahmadinia, E., Rafaian, M., ... & Darani, H. Y. (2012). Effect of *Echinophora platyloba*, *Stachys lavandulifolia*, and *Eucalyptus camaldulensis* plants on *Trichomonas vaginalis* growth in vitro. *Advanced biomedical research*, 1. doi:10.4103/2277- 9175.102987

Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *Journal of agricultural and food chemistry* 59(11), 6247-6255. doi: 10.1021/jf200450m

Table 1 - Physicochemical characterization of nanoemulsions, assessing the size, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH.

	Average droplet size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	pH
Nanoemulsion containing lemongrass oil	98 ± 0.82	0.20 ± 0.007	$- 7.48 \pm 1.02$	4.00 ± 0.07
Nanoemulsion containing eucalyptus oil	66 ± 0.81	0.23 ± 0.004	$- 7.53 \pm 0.72$	5.90 ± 0.04
Nanoemulsion containing basil oil	113 ± 0.78	0.19 ± 0.007	$- 8.47 \pm 0.98$	5.37 ± 0.04
Blank nanoemulsion	127 ± 1.02	0.25 ± 0.005	$- 6.37 \pm 0.58$	5.15 ± 0.03

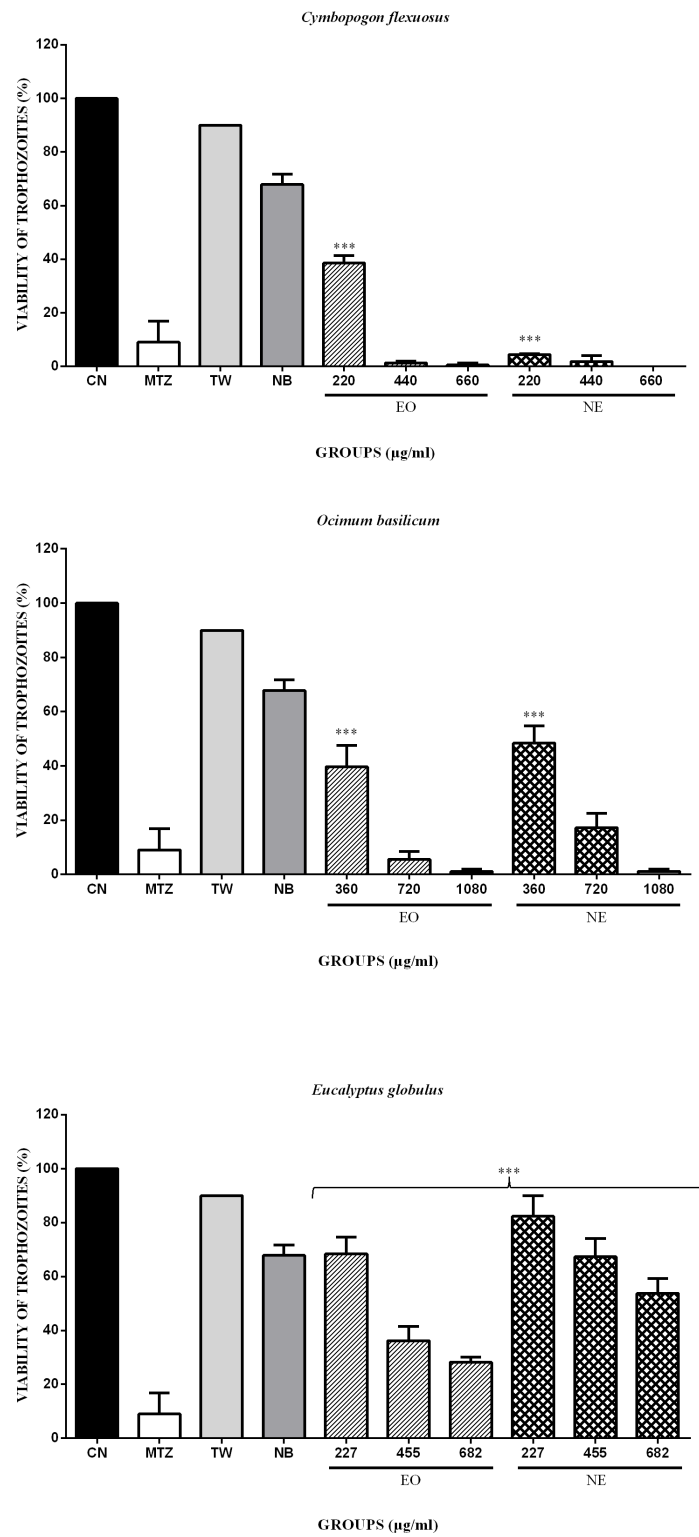


Fig. 1 - Antiparasitic activity of free (EO) and nanostructured (NE) essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Ocimum basilicum* and *Eucalyptus globulus* against *Trichomonas vaginalis* after 24 hours of exposure. The * indicate statistical differences compared the groups by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests ($p < 0.05$)

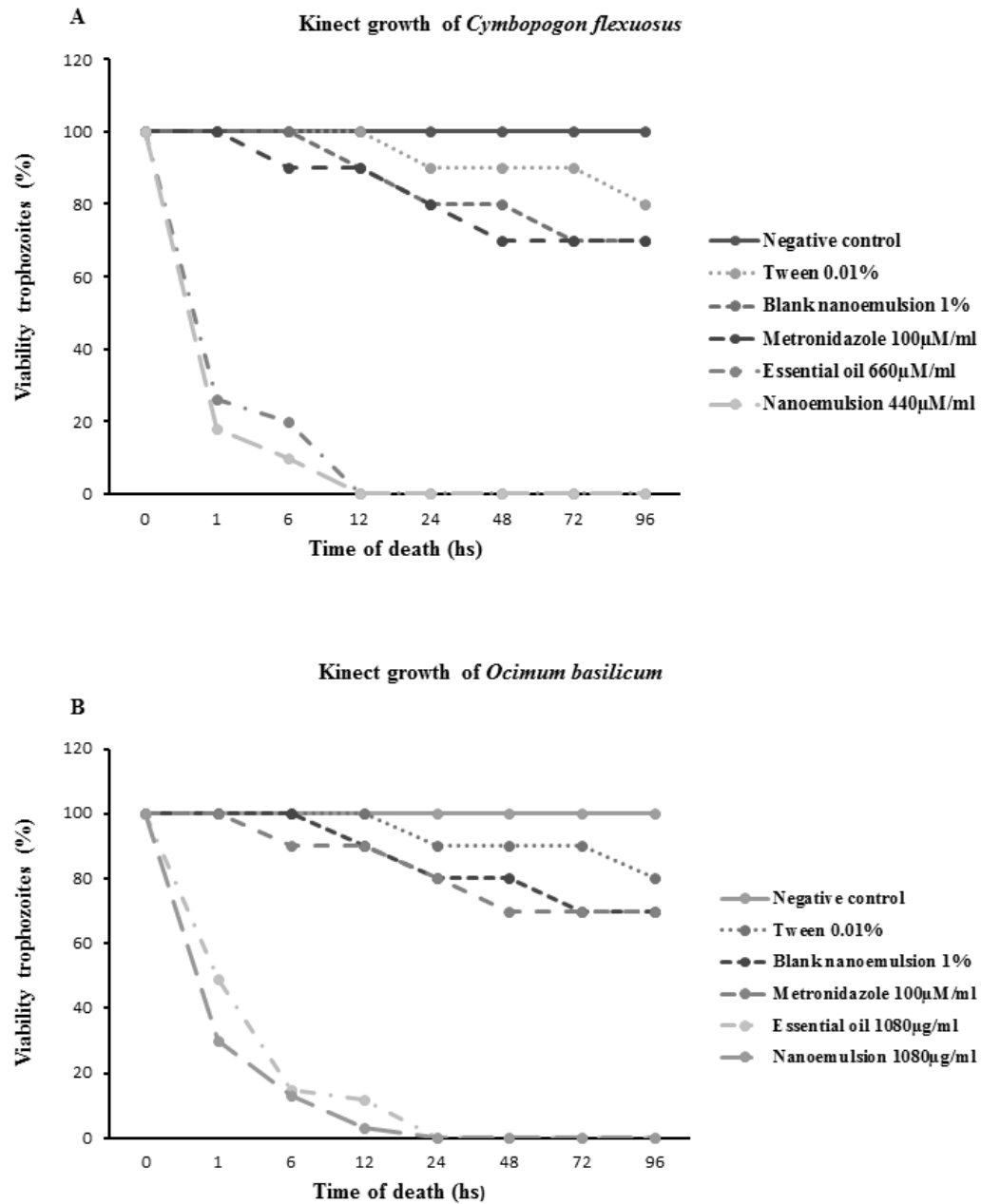


Fig. 2 – Time of death of *Trichomonas vaginalis* isolate (MIC) after exposure to free (EO) and nanoemulsion (NE), respectively, of *Cymbopogon flexuosus* (660 µg/mL; 440 µg/mL) and *Ocimum basilicum* (1080 µg/mL; 1080 µg/mL) at time 1h, 6h, 12h, 24h, 48, 72h and 96h.

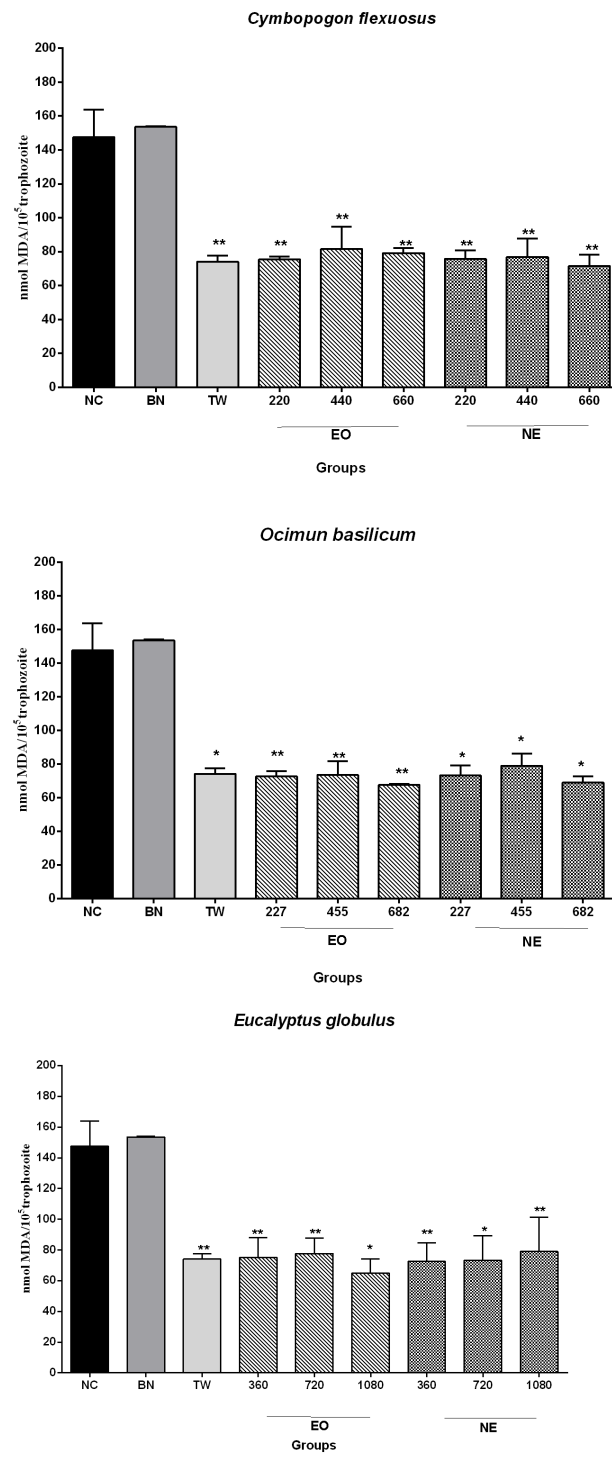


Fig. 3 – TBARS assay on *Trichomonas vaginalis* trophozoites after treatment - free and nanostructured essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Ocimum basilicum* and *Eucalyptus globulus*

**5 Artigo 2. Evaluation *in vitro* of anti *Trichomonas vaginalis* activity,
cytotoxicity and oxidative stress caused by citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal)
major compound of the *Cymbopogon* species essential oil**

**Submetido a Revista Molecular and Biochemical Parasitology – A4
(ANEXO B)**

Evaluation *in vitro* of anti-*Trichomonas vaginalis* activity, cytotoxicity and antioxidant effects of citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal) major compound of the *Cymbopogon* species essential oil

In vitro activity of citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal) major compound of the *Cymbopogon* species essential oil against *Trichomonas vaginalis*

J.M. FENALTI*¹; B. BACCEGA¹; A.B. MELLO¹; F. OBELAR¹; Y.W. ISLABÃO¹; P. BIRMANN²; A.M. CASARIL²; T. BARBOSA³; A. SENA-LOPES³; F.L. MONTEIRO⁴; L. SAVEGNAGO²; S. BORSUK³; S. de O. HÜBNER⁴; N.A.R. FARIAS¹; C.B. OLIVEIRA¹

1 Laboratório de Parasitologia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

2 Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel

3 Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária. Centro de Tecnologia e Desenvolvimento, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

4 Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

ABSTRACT

The increasing of *Trichomonas vaginalis* resistance to the single class of drug recognized, 5-nitroimidazoles, encourage the research to new agents against this most common major non-viral sexually transmitted infection worldwide. Natural products have been an important source of new options therapeutic against trichomoniasis, in front of this, this study aimed to evaluated the anti-*T. vaginalis* activity of citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal). Citral is the main constituent of *Cymbopogon* species essential oil, popularly known as lemongrass and with a range of biological activities recognized. Our results showed that citral MIC (minimal inhibitory concentration) 100 μM /mL inhibit the growth of *T. vaginalis* trophozoites in 12 h of exposure and affect by 50% after 24 h about 40 μM /mL ($\text{IC}_{50}/24\text{h}$). Further, the determination of nitric oxide (NO) levels showed that citral possess an antioxidant activity and the role of this reactive specie at the inviabilization of trophozoites should be evaluated. Molecular docking experiment was also carried out, showing weak interaction with evaluated proteins TvTrxR, TvPNP and TvMGL. MTT assay showed decrease of the Vero cells viability, suggesting a cytotoxic activity. The present study offers new possibilities for the search of potential no-nitroimidazole drugs candidate as an additional option for the treatment of trichomoniasis.

Key Words: fitotherapy; natural products; sexually transmitted infection; trichomoniasis; docking.

Correspondence to

MsC. Juliana Fenalti, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Pelotas (UFPel), RS, Brazil. E-mail: jufenalti@hotmail.com; Address: Avenida Eliseu Maciel s/n° - Campus Capão do Leão – UFPel Phone: +5553981380533

HIGHLIGHTS

- Citral is an alternative to the treatment of trichomoniasis.
- Citral showed anti-*Trichomonas vaginalis* activity in less time of exposure than metronidazole;
- Citral is able to reduce nitric oxide levels showing an antioxidant activity.

1. INTRODUCTION

Trichomoniasis is the most common nonviral sexually transmitted infection (STI) in the world. According World Health Organization (WHO) 276 millions new *Trichomonas vaginalis* (TV) cases has estimated each year, and this infection exceed the number of cases of Chlamydia, Gonorrheae and syphilis [1]. Highlighting the importance of this pathogen as a public health problem, this parasite can increase the risk of acquiring and transmitting human immunodeficiency virus (HIV) besides the risks of pregnancy complications [2,3]. Metronidazole (MTZ) is the first drug recognized for treatment of anaerobic protozoan like *T. vaginalis*, and their biological properties ranging from antiparasitic, antibacterial to anticancer activities [4]. TV refratary cases and clinically resistance to MTZ was reported since to 1962 [5,6,7].

An update review of several studies that evaluate the efficacy of plants and their derivatives against *T. vaginalis*, showed potential activity and promissor results, been natural products an alternative for the treatment of trichomoniasis [8]. Citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal) is a monoterpene, natural mixture of two isomeric compounds, alfa-citral (geranial) and beta-citral (neral) [9]. Environmental conditions and geographic directly influences to the composition of essential oil, however lemongrass is homogeneous and independent of the origin, citral is always the main constituent of *Cymbopogon* species [10].

In view of the search for new agents from natural resources, the antiparasitic activity of lemongrass essential oil and the resistance developed by some strains of TV, the present study aimed to evaluate the anti-*T. vaginalis* (ATCC 30236 isolate) activity of citral, the major compound of *Cymbopogon* species. In addition, antioxidant activity, cytotoxicity and molecular docking were also determined.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 *Trichomonas vaginalis* culture

T. vaginalis 30236 isolate (from American Type Culture Collection, ATCC), susceptible to MTZ, was used in this study. Trophozoites were axenically cultured *in vitro* in a trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium without agar (pH 6.0), supplemented with

10% sterile heat-inactivated bovine serum, and 5 mg/mL streptomycin, incubated at 37°C [11].

2.2 *In vitro* assay

Anti-*T. vaginalis* activity, IC₅₀ (half the maximum inhibitory concentration), minimum inhibitory concentration (MIC) and kinetic growth assay were realized following the methodology described by Sena-Lopes et al. [12]. Initially, for the anti- *T. vaginalis* assays, it was used cultures with viability equal or higher than 95%. The activity of citral were screened *in vitro* against *T. vaginalis* in 96-well microtiter plates (Cral®). Citral was obtained commercially from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). A volume of 150 µL of trophozoites solution was seeded at an initial density of 2.6×10^5 trophozoites/mL and incubated with 50 µL of a solution containing TYM medium and citral at concentration of 100 µM, 80 µM, 60 µM, 40 µM and 20 µM previously diluted in DMSO (0.6%) [13]. Three controls were applied in each assay: a negative control containing only trophozoites, a 0.6% DMSO control, and a positive control containing 100 µM of Metronidazole (MTZ) (Sigma-Aldrich). The microtiter plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h. After that, trophozoites motility and morphology was counted in a Neubauer chamber and analyzed by light microscopy while viability was assessed through trypan blue dye exclusion (0.4%) at a ratio of 1:1. Anti-*T. vaginalis* MIC, as well as controls, were inoculated in fresh TYM medium and re-incubated at 37°C with 5% CO₂. Trophozoites were counted in a Neubauer chamber every 24 h during 96 h to confirm MIC and the viability was assessed by trypan blue dye exclusion (0.4%) assay. A kinetic growth curve was established to obtain a more accurate profile for citral activity against *T. vaginalis*. Trophozoites viability was observed by light microscopy after incubation at respective MIC. Growth analysis was performed at 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h by trypan blue dye exclusion (0.4%) assay. The tests were performed independently three times in triplicate and results were expressed as the percentage of viable trophozoites.

2.3 Citotoxicity

The cytotoxic effect of citral was assessed on Vero cells (1.8×10^6 cells/plate) by MTT assay, according to methodology described by Mosmann [14] with minor modifications.

Briefly, 100 µl of cells were seeded in 96-well polystyrene plates and 24h later were added of different Citral concentrations (100µM, 80µM, 60µM, 40µM, 20µM). After 14 h of incubation, an MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) solution (5mg/mL) was added in all wells and the plates were incubated for 4 h until violet color development. The supernatant was replaced by 200 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO). The optical density was determined by spectrophotometry (550 nm) and the results were expressed in percentage of viable cells relative to cell control (untreated).

2.4 Molecular docking

Next we wanted to investigate the possible mechanism of action of citral using molecular docking approach with three proteins required for *T. vaginalis* survival. We used the protein structure of thioredoxin reductase (TvTrx; PDB 2F51), purine nucleoside phosphorylase (TvPNP; PDB 1Z36), and methionine gamma lyase (TvMGL; PDB 1E5F) which were retrieved from RSCB protein data bank (<http://www.rcsb.org/>). Prior to docking, the protein structures were prepared by removing water molecules and other ligands using CHIMERA 1.5.3 software [15]. A grid box size covering the residues in the active site of the proteins was implemented. Citral was built and optimized in the software Avogadro 1.1.1 [16]. The lowest binding energy of citral with each protein was calculated using the default parameters of Autodock Vina 1.1.2. [17] and the docking poses of the investigated compound were visualized using Accelrys Discovery Studio 3.5.

2.5 Nitric oxide (NO_x) levels

NO_x is an unstable compound rapidly oxidized into nitrate and nitrite. The nitrate was converted in to nitrite by nitrate reductase and measured using the colorimetric Griess reaction in a microplate reader at a wavelength of 462 nm. An aliquot of the trophozoite (100 µl) was incubated with Griess (100 µl) at 37 °C during 65 min. The values were expressed as nitrite (mmol/mg of trophozoites) [18].

2.6 Statistical analysis

The results of *in vitro* tests are presented as percentages and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by comparison with the Tukey post-test to multiple comparisons between all treatments using Graph Pad Prism 7.04 software. The significance level was $P < 0.05$. Tukey's post-test was conducted to identify significant differences between negative control and the means of different treatments. The results of NO_x are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). The results were analyzed by One-way ANOVA following Newman-Keuls post hoc test. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant. The statistical analysis was accomplished using GraphPad Prism version 7.0 for Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

The analysis of anti-*T. vaginalis* activity of citral showed that at concentration of 80 μM , 60 μM and 40 μM doesn't reduced all viable trophozoites (99,1%, 94,1% and 74,7%, respectively) but doesn't showed statistical significant difference of standard drug (100 μM). Eventhough, this major compound at 100 μM showed potential activity, was detected as MIC at *in vitro* assay and was able to reduce 100% viability of trophozoites also without showing statistical significant difference when compared to MTZ. The IC_{50} value was determined at 40 μM , invibializing 44% of trophozoites, showing statistical difference when compared to MTZ. No significant differences were observed at control group DMSO 0,6% among the negative control (TYM medium and trophozoites) (Figure 1).

The kinetic growth curve showed that after 1 hour time of exposure trophozoites growth are affected by citral at 100 μM . Significant inactivation of trophozoites was observed after 1 h of incubation (48%); after 6 h of storage time, trophozoites growth reduced to 50% and after 12 h of treatment reached 100% of trophozoites inactivation, eventough, after the same time was observed different activity with MTZ, 18% of trophozoites still was viable, promoting all trophozoites inactivation only in 24 hours (Figure 2).

Despite the optimal antiprotozoan observed, under our experiment conditions, a meaning decrease in proliferation of VERO cells was detected after 24 h drug treatment, in a dose-time dependent, compared with control proliferation (100%). As was observed, the number of viable cells to concentrations of 100 μM , 80 μM , 60 μM , 40 μM and 20 μM was 3,2%, 7,1%, 10,8%, 12,3% and 14,2%, respectively. In order to evaluate the antioxidant

activity of citral, we analysed the NOx levels. After 24 h of treatment of citral it was observed that decreased of NOx levels ($F_{(12, 26)} = 2,99$, $P = 0,009$) in the concentrations of 100 μM , 80 μM , 60 μM and 40 μM when compared of control. (Figure 3)

In addition, to explore the mechanism of action of citral against *T. vaginalis*, molecular docking experiment was carried out. From an overall determination of the estimated binding free energy (ΔG_{bind}), the best docking pose of citral with each protein was selected. As depicted in Figure 4A, citral interacts with aminoacids near to the active site of TvTrx with a binding free energy (ΔG_{bind}) of -3.8 kcal/mol. Citral forms a hydrogen bond with LYS59 and interacts via covalent interactions with PHE31 and CYS38. Van der Waals interactions with other aminoacids help to stabilize the interaction between TvTrx and citral. The binding mode of citral in the TvPNP active site (ΔG_{bind} of -5.1 kcal/mol) is depicted in Figure 4B. The model suggests that citral interacts via hydrogen bonds with ANS161 and ALA167. Covalent interactions (PHE159, VAL178, and ILE206) and van der Waals interactions help to maintain the citral in the active site of TvPNP. Figure 4C shows the interaction of citral with TvMGL (ΔG_{bind} of -5.0 kcal/mol). Citral forms a covalent hydrogen bond with PRO290 and several covalent and van der Waals interactions with other residues.

4. DISCUSSION

We report for the first time, the inhibitory effects of these major compound against this protozoa in concentrations higher than 40 μM , when compared to MTZ. The mechanism responsible for the antiprotozoal activity detected in our study is still unexplained, probably can be justify by the capacity of this compound of promote cell membrane damage, alternate the integrity and permeability of the membrane, as was observed at antifungal assays [19]. EOs are lipophilic, wich contribute to the easy entrance to cell membrane, interacting with polysaccharides, fatty acids and phospholipids, been the first mechanism of action, causing the cell death due the loss of ions and cellular contents [20]. Furthermore, the modes of action of EOs appear to be multi-target oriented, wich enhance their potential application in diseases caused by multidrug-resistant pathogens [21].

The inhibitory effects of citral was observed *in vitro* against *Trypanossoma cruzi*, reducing the epimastigote and trypomastigotes forms, acting at the process of differentiation of protozoa [22,23]. The same antiprotozoan activity was detected against promastigotes, axenic amastigotes and intracellular amastigote forms of *Leishmania amazonensis*, been the

inhibition dose-dependent on the proliferation of this parasites, as was observed in our study. Moreover, according with the data this compound is more selective against to the protozoan than to macrophage cells, this way doesn't showing toxic effects. Our data are in agreement with those found in literature, pointing out to the anti-protozoan effects of citral, which may be responsible to alterations in the morphology of parasite, caused by rupture of the plasma membrane, interfering at the cell division process and promoting the disintegration of the parasite [13].

The potential inhibitory activity of citral observed against *T. vaginalis* in our study, was also detected against MDR *Acinetobacter baumannii*, been an alternative against infections promoted by drug resistant MRSA and MSSA strains [24]. Studies have been showed similar resistance mechanism between the only recognized drugs, metronidazole and tinidazole, therefore, new alternatives non-nitroimidazole are necessary to promote the therapeutic efficacy against this protozoa. The alternatives medicines through the utilization of bioactive compounds from traditional medicinal plants, like citral, are a promising source to the treatment of trichomoniasis [25,26].

Besides optimal activities reported against pathogens, studies highlighted another biological properties of citral, like antioxidant, inhibiting the oxidative process of formation of free radicals [27]. We also investigated the effects of citral at the production of NO by *T. vaginalis*, observing the decrease in these levels, as was observed when the trophozoites were treated with MTZ.

In our study was observed that citral has the ability to inhibit the production of reactive oxygen species. In iron-deficient situations, *T. vaginalis* use NO-dependent regulatory network to the maintenance of hydrogenosome modulation, a mitochondrial homolog, responsible for the production of energy, essential to cell proliferation and to the survival of protozoa [28]. In view of this fact, the decrease of NO levels may have contributed to the antiprotozoan activity find out, been NO essential to the viability of parasite in deficiency of iron. The same behavior was observed in melanoma cells, where the high levels of NO and nitric oxide synthase guarantee the survival and proliferation of the cells [29].

In addition, molecular docking with *T. vaginalis* enzymes were performed to investigate the possible molecular mechanism responsible for the anti-*T. vaginalis* activity of this compound, revealing a weak interaction of citral with TvTrxR, TvPNP, and TvMGL. TvTrxR is the isoenzyme responsible for the reduction of thioredoxin which protects the

parasite against the oxidative stress. This important isoenzyme to the physiological functions of TV is the target of nitroimidazole drugs, however, in our study the citral did not present a significant interaction with TvTrxR, corroborating with Setzer et al. [30]. These authors have proposed that TvPNP is an important protein for the study of new agents, concluding that several polyphenolic compounds showed selective docking to this human homologous isozyme, as well as to TvMGL. Here we showed that citral has a weak interaction with the active site of TvPNP and does not interact with the active site of TvMGL. Based on this molecular docking approach, we suggest that the mechanism of action of citral should be associated to other pathways that deserve further investigation.

This compound is regarded as safe by FDA and approved for human consumption as a food additive and also flavouring [31] (FDA, 2018), even though, our MTT cell viability data showed that citral suppressed the growth of Vero cells dose and time dependent manner. Previous studies have also reported cytotoxic and genotoxic effects exhibited by citral at 5 μg / mL in hematopoietic human culture cells and leukocytes, showing a significant decrease in cell viability [32]. Citral has gained attention and been widely studied their chemotherapeutic effect against several cancer cell lines showing be a potent candidate [33,34,35]. In view of the cytotoxic frequently reported to normal cells and the promising ability of this major compound to inhibit the proliferation of cancer cells, studies suggesting the incorporation of citral into nanostructured lipid carrier system, still maintaining apoptosis of this cell line without inducing toxic effects [36,37].

Nevertheless, the nanocarrier is an alternative to the use of citral in lower concentrations or even in association with MTZ, with high activity at the target and reduced toxic effects. Owing to the traditional use of medicinal plants for a long time and the promising results observed in our *in vitro* study, citral should be evaluate nanostructured against *T. vaginalis*, in order to establish as safe compound to therapeutic use.

5. CONCLUSIONS

Based on these experimental data, it can be concluded that for the first time was reported the ability of citral to inhibit the proliferation of *T. vaginalis* trophozoites. Citral possess a promising properties to the treatment of this STI, been a good candidate for further studies nanostructured in a drugcarrier system, in order to develop a new anti-trichomonal drug nonnitroimidazole without cytotoxicity.

Funding This work was supported by grants from the Programa de Apoio a Pós-Graduação (PROAP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, DF, Brazil.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Who (2012) Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008: World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012 ISBN 978 92 4 150383 9 Reproductive health matters 20:207-209
2. Maciel, Gisele de Paiva; Tasca, Tiana; De Carli, Geraldo Attilio. Clinical aspects, pathogenesis and diagnostic of *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p. 152-160, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442004000300005>
3. Serwin, Agnieszka Beata; KOPER, Marta. Trichomoniasis--an important cofactor of human immunodeficiency virus infection. **Przegląd epidemiologiczny**, v. 67, n. 1, p. 47-50, 131-4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1086/526496>
4. Duai'y, Alawadi et al. Metronidazole derivatives as a new class of antiparasitic agents: synthesis, prediction of biological activity, and molecular properties. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 3, p. 1196-1209, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-014-1197-4>
5. Robinson, S. C. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. **Canadian Medical Association Journal**, v. 86, n. 14, p. 665, 1962.
6. Narcisi, E. M.; Secor, W. E. In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 1121-1125, 1996.

7. Klebanoff, Mark A. et al. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 7, p. 487-493, 2001 <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa003329>

8. De Brum Vieira, Patrícia et al. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology research**, v. 114, n. 4, p. 1249-1261, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2012.10.006>

9. Kakarla, Shalini; Ganjewala, Deepak. Antimicrobial activity of essential oils of four lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) varieties. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*, v. 3, p. 107-9, 2009.

10. Olayemi, R. F.; Jawonisi, I. O.; Samuel, J. A. Characterization and physico-chemical analysis of essential oil of *Cymbopogon citratus* leaves. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 74-81, 2018. <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v11i1.14>

11. Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol.* 1957;43(4):488–90.

12. Sena-Lopes A, et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PloS One* 2018; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797>.

13. Santin, Marta Regina et al. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology research**, v. 105, n. 6, p. 1489, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1578-7>

14. Mosmann, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

15. Pettersen, Eric F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
16. Hanwell, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
17. Trott, Oleg; Olson, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
18. Cryan, J.F., Markou, a, Lucki, I., 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 238–245. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02017-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02017-5)
19. Leite, Maria Clerya Alvino et al., Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/378280>
20. Raut, Jayant Shankar; Karuppayil, Sankunni Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
21. Singh, Ishwar. Antimicrobials in Higher Plants: classification, mode of action and bioactivities. **Chem. Biol. Lett**, v. 4, n. 1, p. 48-62, 2017
22. Santoro, G. F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1649-1656, 2007. <https://doi.org/10.1017/S0031182007002958>

23. Cardoso, Josiane; Soares, Maurilio José. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1026-1032, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800012>

24. Adukwu, Emmanuel C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9619-9627, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7807-y>

25. Mehriardestani, Mozghan et al. Medicinal plants and their isolated compounds showing anti-*Trichomonas vaginalis* activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 885-893, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.149>

26. Smith, Jeffrey D.; Cudmore, Sarah L.; Garber, Gary E. Diagnosis and Treatment of Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* Infection. In: **Antimicrobial Drug Resistance**. Springer, Cham, 2017. p. 1277-1291. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47266-9_28

27. Rabbani, S.I et al., Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. **Pak J Pharm Sci**, v. 19, n. 2, p. 108-13, 2006.

28. Cheng, Wei-Hung et al. Nitric oxide maintains cell survival of *Trichomonas vaginalis* upon iron depletion. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 393, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1000-5>

29. Sanches, Larissa Juliani et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1010428317695914, 2017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695914>

30. Setzer, Mary et al. Natural products as new treatment options for trichomoniasis: A molecular docking investigation. **Scientia pharmaceutica**, v. 85, n. 1, p. 5, 2017. <https://doi.org/10.3390/scipharm85010005>

31. Food and Drug Administration 21CFR182.60 Title 21, Volume 3, Abril 2018
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.60&SearchTerm=citral> Accessed: Jun 2019

32. Souza, Ana CS et al. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. **Drug and chemical toxicology**, p. 1-6, 2019.
<https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1585445>

33. Chaouki, Wahid et al. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 23, n. 5, p. 549-556, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00738.x>

34. Liu, Yang et al. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e53178, 2012.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053178>

35. Ghosh, Kavisa. Anticancer effect of lemongrass oil and citral on cervical cancer cell lines. **Pharmacognosy Communications**, v. 3, n. 4, p. 41, 2013.
<https://doi.org/10.5530/pc.2013.4.6>

36. Nordin, Noraini et al. *In vitro* cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1614, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38214-x>.

37. Nordin, Noraini et al. Characterization and toxicity of citral incorporated with nanostructured lipid carrier. **PeerJ**, v. 6, p. e3916, 2018. <https://doi.org/10.7717/peerj.3916>

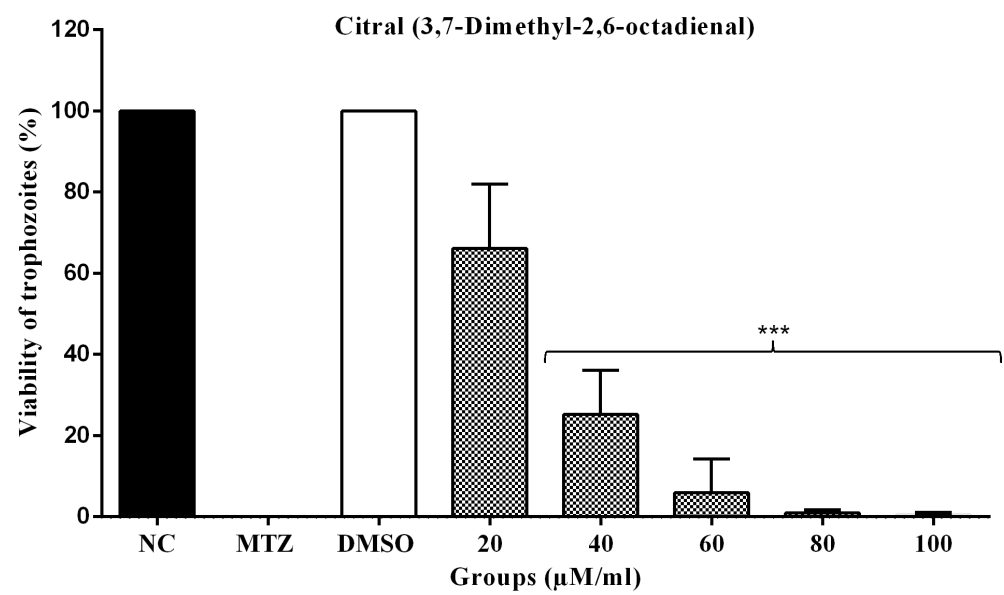


Figure 1 - Antiparasitic activity of citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal) against *Trichomonas vaginalis* (ATCC 30236) after 24 hours of exposure (20 µM/mL, 40 µM/mL, 60 µM/mL, 80 µM/mL and 100 µM/mL). The * indicate statistical differences compared the groups by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests (p<0.05)

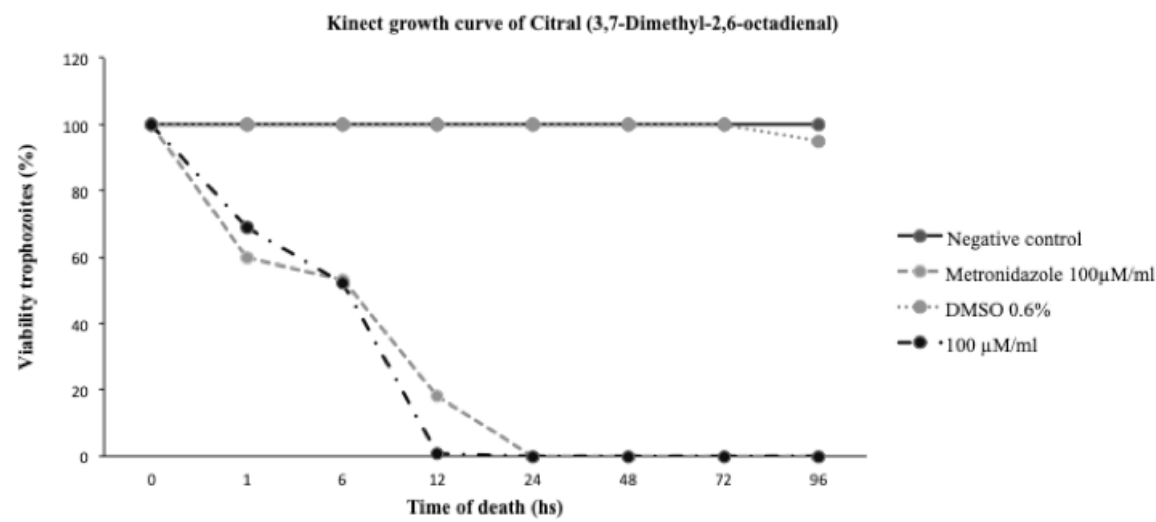


Figure 2 - Time of death of *Trichomonas vaginalis* ATCC 30236 isolate after exposure to citral (MIC 100 µM/mL) at time 1h, 6h, 12h, 24h, 48, 72h and 96h.

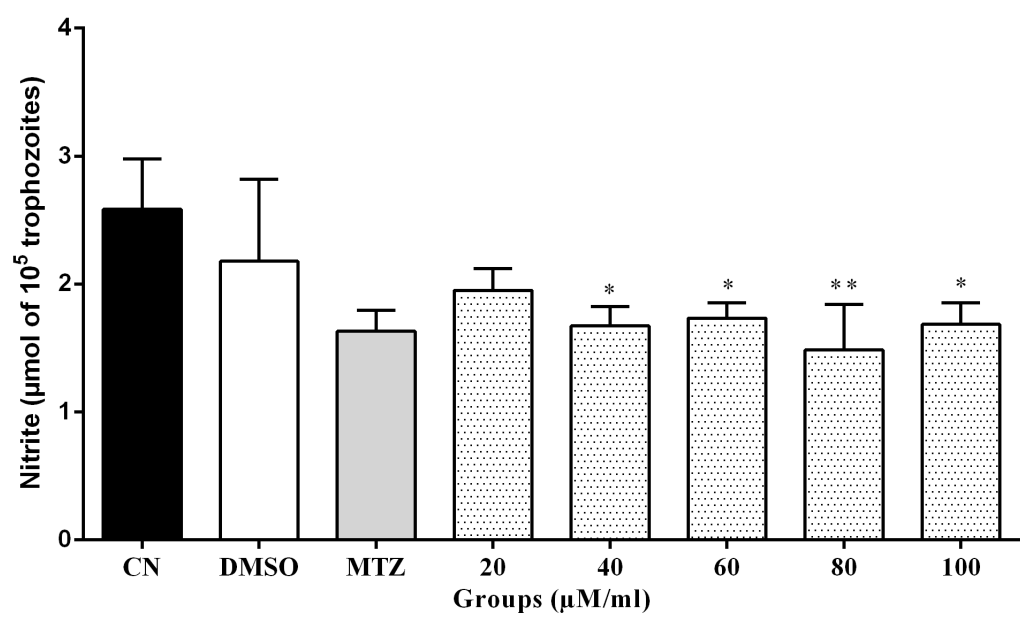


Figure 3 - Nitric oxide levels obtained from nitrite levels measured by Griess assay.

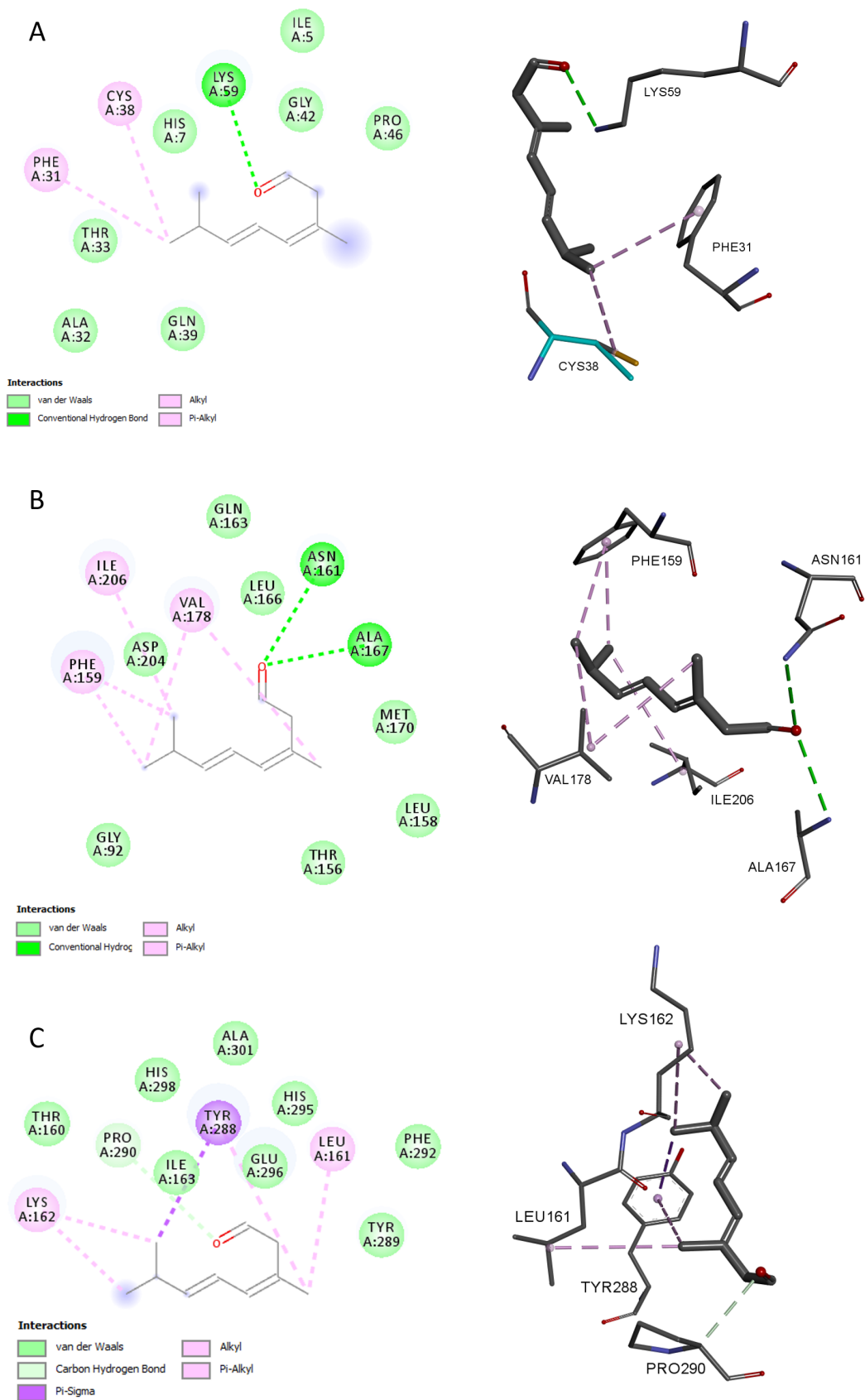


Figure 4. Two-dimensional interactions and three-dimensional binding mode of citral with (A) TvTrx, (B) TvPNP, and (C) TvMGL.

Considerações finais

- Os óleos essenciais e nanoemulsões de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) e *Ocimum basilicum* (manjerição) exibiram atividade anti-*Trichomonas vaginalis* (isolado clínico);
- O óleo essencial de capim-limão nanoestruturado apresentou atividade em menor concentração e em menor intervalo de tempo;
- Os óleos essenciais e as nanoemulsões também apresentaram a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica;
- O citral, composto majoritário do capim-limão, apresentou atividade frente a ATCC (30236) de *Trichomonas vaginalis*, inviabilizado 100% dos trofozoítos em menor intervalo de tempo se comparado ao metronidazol;
- O citral apresentou capacidade de reduzir os níveis de óxido nítrico quando comparado ao controle.

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que deve se explorar o potencial dos produtos naturais como uma opção adicional para o tratamento de diferentes doenças, como a tricomoníase.

Referências Bibliográficas

ABDEL, AS Halim; MORSY, T. A. The insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* oil on the development of *Musca domestica* third stage larvae. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 631-636, 2005.

ADUKWU, Emmanuel C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9619-9627, 2016.

ALLSWORTH, Jenifer E.; RATNER, Jane Alyce; PEIPERT, Jeffrey F. Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001–2004 NHANES surveys. **Sexually transmitted diseases**, v. 36, n. 12, p. 738, 2009.

ALVES, Maria José et al. Epidemiologia de *Trichomonas vaginalis* em mulheres. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 29, n. 1, p. 27-34, 2011.

AMSEL, Richard et al. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **The American journal of medicine**, v. 74, n. 1, p. 14-22, 1983.

ANDERSSON, K. E. Pharmacokinetics of nitroimidazoles. Spectrum of adverse reactions. **Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum**, v. 26, p. 60-67, 1981.

ANDRÉ, Weibson Paz Pinheiro et al. Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 1522, 2018.

ANWER, Md Khalid et al. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. **Journal of oleo science**, v. 63, n. 4, p. 347-354, 2014.

ÁVILA, L.C. (editor). Índice Terapêutico fitoterápico: Petrópolis: ITF. 1o Ed RJ:EPUB, 2008. 328 p.

AZERAD, Robert. 1, 8-Cineole: Chemical and Biological Oxidation Reactions and Products. **ChemPlusChem**, v. 79, n. 5, p. 634-655, 2014.

BACHIR, Raho G.; BENALI, Mechaal. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 739-742, 2012.

BAJERSKI, Lisiane et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347-363, 2016.

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDISSERA, Matheus D. et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: *in vitro* tests. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 356-361, 2013.

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASSO, Luiz Augusto et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 475-506, 2005.

BENCHIMOL, Marlene. The hydrogenosome as a drug target. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 9, p. 872-881, 2008.

BILIA, Anna Rita et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BOUCHEMAL, Kawthar; BORIES, Christian; LOISEAU, Philippe M. Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 811-825, 2017.

BOUKHATEM, Mohamed Nadjib et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v. 9, n. 1, p. 25431, 2014.

BRANDELLI, Clara Lia Costa et al. Remarkable anti-*trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbyá-Guarani indigenous group in Brazil. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRAVO, R. S.; GIRALDO, P. C.; CARVALHO, N. S.; GABIATTI, J. R. E.; VAL, I. C.C.; GIRALDO, H. P. D.; PASSOS, M. D. L. Tricomoníase vaginal: o que se passa? DST - **J bras Doenças Sex Transm**, v.22, n.2, p.73-80, 2010.

BRENO N. MATOS et al. Preparações farmacêuticas e cosméticas com uso de nanotecnologia. **Brasília Med**, v. 52, n. 1, p. 8-20, 2015.

BRUNI, Mirian Pinheiro et al. Aptima *Trichomonas vaginalis* assay elucidates significant underdiagnosis of trichomoniasis among women in Brazil according to an observational study. **Sex Transm Infect**, v. 95, n. 2, p. 129-132, 2019.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. Química nova. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 9 (2012), p. 1827-1840, 2012.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of medical and Biological research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CARDOSO, Josiane; SOARES, Maurilio José. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1026-1032, 2010.

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR Recomm Rep**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/trichomoniasis.htm>

CHAGAS, AC de S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Embrapa Milho e Sorgo- Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2002.

CHANG, Yuhua; MCLANDSBOROUGH, Lynne; MCCLEMENTS, David Julian. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food chemistry**, v. 172, p. 298-304, 2015.

CHAOUKI, Wahid et al. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 23, n. 5, p. 549-556, 2009.

CHENG, Wei-Hung et al. Nitric oxide maintains cell survival of *Trichomonas vaginalis* upon iron depletion. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 393, 2015.

CHORILLI, Marlus et al. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, p. 19-30, 2009.

CHOUHAN, Sonam; SHARMA, Kanika; GULERIA, Sanjay. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CODEVILLA, Cristiane Franco et al. Nanostructures containing bioactive compounds extracted from plants. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 142-151, 2015.

COSTA, C. M. G. R. et al. Efeito inibitório do óleo essencial de manjeriço sobre o crescimento *in vitro* de *Erwinia carotovora*. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 3, p. 35-38, 2009.

COSTA, Fernando Silva; ELIAS, Cezar Antonio; DE SOUZA, Wanderley. Further studies on the surface charge of various strains of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Cell biophysics**, v. 8, n. 3, p. 161-176, 1986.

COTINGUIBA, George Gomes et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015.

COUVREUR, Patrick; VAUTHIER, Christine. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.

CROWELL, Andrea L.; SANDERS-LEWIS, Kolby A.; SECOR, W. Evan. *In vitro* metronidazole and tinidazole activities against metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1407-1409, 2003.

CRYAN, John F.; MARKOU, Athina; LUCKI, Irwin. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CUDMORE, Sarah L. et al. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 783-793, 2004.

DA SILVA GÜNDEL, Samanta et al. Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2018b.

DA SILVA GÜNDEL, Samanta et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial pathogenesis**, 2018a.

DA SILVA PATIAS, Ian et al. Estabilidade e atividade antifúngica de nanoemulsão contendo óleo de gerânio incorporada em hidrogel. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 17, n. 2, p. 269-283, 2016.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DANIELLI, Letícia J. et al. Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. **Industrial crops and products**, v. 50, p. 23-28, 2013.

DE ALMEIDA, Igor et al. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitology Research**, v. 101, n. 2, p. 443-452, 2007.

DE BRUM VIEIRA, Patrícia et al. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology research**, v. 114, n. 4, p. 1249-1261, 2015.

DE CARLI, G.A., TASCA, T. *Trichomonas*. In: NEVES, D.P., **Parasitologia Humana**. 11 ed., São Paulo: Atheneu, 2005, p. 115-120.

DE CASTRO, Ricardo Dias; DE OLIVEIRA LIMA, Edeltrudes. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

DE LEMOS, Patricia Abreu Pinheiro; GARCÍA-ZAPATA, Marco Tulio Antonio. Aspects of *Trichomonas vaginalis* infection and diagnostic methods Aspectos relacionados com a infecção por trichomonas vaginalis e diagnóstico laboratorial. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 8, n. 2, p. 152-162, 2014.

DE OLIVEIRA LIMA, Igara et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

DIAMOND, Louis S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **The Journal of parasitology**, v. 43, n. 4, p. 488-490, 1957.

DIAS,N.; NICOLAU,A.;CARVALHO,G. S.;MOTA,M.; LIMA,N. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. **J. Basic Microbiol.** 39 (1999) 2, 103–108.

DONSÌ, Francesco et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342-350, 2012.

DONSÌ, Francesco; FERRARI, Giovanna. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

DOS ANJOS GATTI, Fabiane Aguiar et al. The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0173604, 2017.

DUA'Y, Alawadi et al. Metronidazole derivatives as a new class of antiparasitic agents: synthesis, prediction of biological activity, and molecular properties. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 3, p. 1196-1209, 2015.

DUARTE, J.L.; AMADO, J.R.R.; OLIVEIRA, A.E.M.F.M.; CRUZ, R.A.S.; FERREIRA, A.M.; SOUTO, R.N.P.; FALCÃO, D.Q.; CARVALHO, J.C.T.; FERNANDES, C.P. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2015.

DUBE, S.; UPADHYAY, P. D.; TRIPATHI, S. C. Antifungal, physicochemical, and insect-repelling activity of the essential oil of *Ocimum basilicum*. **Canadian journal of botany**, v. 67, n. 7, p. 2085-2087, 1989.

ELDIN, Hayam Mohamed Ezz; BADAWY, Abeer Fathy. In vitro anti-Trichomonas vaginalis activity of *Pistacia lentiscus* mastic and *Ocimum basilicum* essential oil. **Journal of parasitic diseases**, v. 39, n. 3, p. 465-473, 2015.

ELISABETSKY, Elaine; SHANLEY, Patricia. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacology & therapeutics**, v. 64, n. 2, p. 201-214, 1994.

FERREIRA PANATIERI, LUA. Avaliação da atividade amebicida de nanoemulsões contendo extrato hexânico de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) frente à *Acanthamoeba* sp. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2015.

FERREIRA, Leonardo et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FLORES, Fernanda Cramer et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FRASSON, Amanda Piccoli et al. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. **Parasitology research**, v. 110, n. 6, p. 2581-2587, 2012.

FUENTEFRIA, Alexandre M. et al. Ketoconazole-Loaded Poly (epsilon-Caprolactone) Nanocapsules for Improved Antifungal Activity Against *Candida* spp. **LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY**, v. 33, n. 10, p. 1589-1595, 2014.

GALINDO, Luciane Almeida; DE MORAES PULTRINI, Aline; COSTA, Mirtes. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 4, p. 436-441, 2010.

GEHRIG, Stefanie; EFFERTH, Thomas. Development of drug resistance in *Trichomonas vaginalis* and its overcoming with natural products. **The Open Bioactive Compounds Journal**, v. 2, n. 1, 2009.

GHOSH, Arindam P.; AYCOCK, Cheri; SCHWEBKE, Jane R. Susceptibility of clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and secnidazole—an in vitro study. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02329-17, 2018.

GODOI, Samantha Nunes et al. Evaluation of stability and in vitro security of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

HAMMER, Katherine A.; CARSON, Christine F.; RILEY, Thomas V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of applied microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

HASSANI, Solmaz et al. Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. **Advanced biomedical research**, v. 2, 2013.

HEINE, Phillip; MCGREGOR, JAMES A. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 36, n. 1, p. 137-144, 1993.

HOBBS, Marcia M.; SEÑA, Arlene C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. **Sex Transm Infect**, v. 89, n. 6, p. 434-438, 2013.

IBRAHIM, Hayam M.; SALEM, Ferial M. Abu. Effect of adding lemongrass and lime peel extracts on chicken patties quality. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 8, p. 5035-5047, 2013.

KAKARLA, Shalini; GANJEWALA, Deepak. Antimicrobial activity of essential oils of four lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) varieties. **Med Aromat Plant Sci Biotechnol**, v. 3, p. 107-9, 2009.

KAMPMEIER, Rudolph H. Description of *Trichomonas vaginalis* by MA Donne. **Sexually transmitted diseases**, v. 5, n. 3, p. 119, 1978.

KIRKCALDY, Robert D. et al. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 6, p. 939, 2012.

KISSINGER, Patricia. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 307, 2015.

KLEBANOFF, Mark A. et al. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 7, p. 487-493, 2001.

KOSHIMA, F. A. T.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4, p. 112-116, 2006.

KULDA, J. et al. Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* as a cause of treatment failure in trichomoniasis- A case report. **Sexually Transmitted Infections**, v. 58, n. 6, p. 394-399, 1982.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LAMP, Kenneth C. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. **Clinical pharmacokinetics**, v. 36, n. 5, p. 353-373, 1999.

LEITE, Maria Clerya Alvino et al. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

LEITSCH, David et al. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. **Molecular microbiology**, v. 72, n. 2, p. 518-536, 2009.

LEWIS, David. Trichomoniasis. **Medicine**, v. 42, n. 7, p. 369-371, 2014.

LIMA, Edson Borges de et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. bras. dermatol**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LIMA, Jarlene Pereira et al. Avaliação do Potencial antiepipimastigota e citotoxicidade do citronelol. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 11, n. 1, p. 38-41, 2012.

LITTLE, Ruth E.; GLADEN, Beth C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reproductive Toxicology (Elmsford, NY)**, v. 13, n. 5, p. 347-352, 1999.

LIU, Qing et al. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1283, 2017.

LIU, Yang et al. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e53178, 2012.

LORENZI, M.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa**: Institutoo Plantarum, 2002, 512 p.

LOVELYN, Charles; ATTAMA, Anthony A. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 2, n. 05, p. 626, 2011.

MACIEL, Gisele de Paiva; TASCA, Tiana; DE CARLI, Geraldo Attilio. Clinical aspects, pathogenesis and diagnostic of *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p. 152-160, 2004.

MARIE-MAGDELEINE, Carine et al. In vitro effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 99-105, 2009.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, Moises et al. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 108, n. 2, p. 481-487, 2011.

MCCLELLAND, R. Scott et al. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 5, p. 698-702, 2007.

MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MEHRIARDESTANI, Mozghan et al. Medicinal plants and their isolated compounds showing anti-*Trichomonas vaginalis* activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 885-893, 2017.

MEINGASSNER, Josef G.; THURNER, Josefina. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 2, p. 254-257, 1979.

MENEZES, Camila Braz; FRASSON, Amanda Piccoli; TASCA, Tiana. Trichomoniasis are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?. **Microbial cell**, v. 3, n. 9, p. 404, 2016.

MERI, Taru et al. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 2, p. 763-767, 2000.

MICHEL, R.; BORGES, F.; WILTUSCHNIG, R.; NEVES, F.; RIBEIRO, J.; VIEIRO, R.; VIEIRA, P. B.; BOHNS, G.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Prevalência da

tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeleiros em Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38, p.127–130, 2006.

MIELCZAREK, Ewelina; BLASZKOWSKA, Joanna. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, v. 44, n. 4, p. 447-458, 2016.

MING, L. C. et al. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (dc) stape) poaceae. In: **International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants 426**. 1996. p. 555-559.

MONZOTE, Lianet; ALARCÓN, Oswald; SETZER, William N. Antiprotozoal activity of essential oils. **Agriculturae conspectus scientificus**, v. 77, n. 4, p. 167-175, 2012.

MORAIS, Lilia Aparecida Salgado de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In Embrapa Meio Ambiente -Artigo em anais de congresso, **Hortic. bras.**, v. 27, n. 2 2009.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, Magaly L. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. **Planta medica**, v. 78, n. 07, p. 658-664, 2012.

MOTA, Valéria de Siqueira; TURRINI, Ruth Natalia Teresa; POVEDA, Vanessa de Brito. Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xylitol and papain: a pilot study. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, n. 2, p. 0216-0220, 2015.

MULYANINGSIH, Sri et al. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 9, p. 893-899, 2011.

MUZNY, Christina A. Why Does *Trichomonas vaginalis* Continue to be a “Neglected” Sexually Transmitted Infection?. **Clinical Infectious Diseases**, 2018.

NARCISI, E. M.; SECOR, W. E. *In vitro* effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 1121-1125, 1996.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NORDIN, Noraini et al. Characterization and toxicity of citral incorporated with nanostructured lipid carrier. **PeerJ**, v. 6, p. e3916, 2018.

NORDIN, Noraini et al. *In vitro* cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1614, 2019.

OLAYEMI, R. F.; JAWONISI, I. O.; SAMUEL, J. A. Characterization and physico-chemical analysis of essential oil of *Cymbopogon citratus* leaves. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 74-81, 2018.

ONAWUNMI, Grace O.; YISAK, Wolde-Ab; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 279-286, 1984.

ÖZCAN, Musa; CHALCHAT, JEAN-CLAUDE. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. **Czech J. Food Sci.** Vol, v. 20, n. 6, p. 223-228, 2002.

PANDEY, Abhay Kumar; SINGH, Pooja; TRIPATHI, Nijendra Nath. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 682-694, 2014.

PEREIRA-NEVES, A.; RIBERIO, K. C.; BENCHIMOL, M. Pseudocysts in trichomonads - new insights. **Protist**, v.154, p. 313–329, 2003.

PEREIRA, Rogério Santos et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 326-328, 2004.

PETRIN, Dino et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

POLITEO, Olivera; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 379-385, 2007.

POOLE, Danielle N.; MCCLELLAND, R. Scott. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. **Sex Transm Infect**, v. 89, n. 6, p. 418-422, 2013.

PUTNAM, K. P.; BOMBICK, D. W.; DOOLITTLE, D. J. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology in vitro**, v. 16, n. 5, p. 599-607, 2002.

RABBANI, SYED IMAM et al. Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. **Pak J Pharm Sci**, v. 19, n. 2, p. 108-113, 2006.

RAHMAN, Atiqur; KANG, Sun Chul. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) BSP. **Journal of food safety**, v. 29, n. 2, p. 176-189, 2009.

RAUT, Jayant Shankar; KARUPPAYIL, Sankunni Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

ROBINSON, S. C. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. **Canadian Medical Association Journal**, v. 86, n. 14, p. 665, 1962.

RODRIGUES MACHADO, Eleuza; PIRES DE SOUZA, Luciana. Assistência de enfermagem na prevenção e controle. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 4, 2012.

ROGERO, Sizue Ota et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROSSI-BERGMANN, Bartira. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SACCHETTI, Gianni et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SALVIA-TRUJILLO, Laura et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547-556, 2015.

SANCHES, Larissa Juliani et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1010428317695914, 2017.

SANTIN, Marta Regina et al. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology research**, v. 105, n. 6, p. 1489, 2009.

SANTORO, G. F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1649-1656, 2007.

SCHWEBKE, Jane R.; BARRIENTES, Frank J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.

SCHWEBKE, Jane R.; BURGESS, Donald. Trichomoniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004.

SECOR, W. Evan et al. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 5, p. 800-804, 2014.

SENA-LOPES, Ângela et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **PloS one**, v. 13, n. 2, p. e0191797, 2018.

SERWIN, Agnieszka Beata; KOPER, Marta. Trichomoniasis - an important cofactor of human immunodeficiency virus infection. **Przegląd epidemiologiczny**, v. 67, n. 1, p. 47-50, 131-4, 2013.

SETHI, Suresh P. What is optimal control theory?. In: **Optimal Control Theory**. Springer, Cham, p. 1-26., 2019.

SETZER, Mary et al. Natural products as new treatment options for trichomoniasis: A molecular docking investigation. **Scientia pharmaceutica**, v. 85, n. 1, p. 5, 2017.

SHAFFER, Catherine. Nanomedicine transforms drug delivery. 2005.

SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A.S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **J Adv Pharm Technol Res**, v. 2, p. 3-8, 2011.

SHU, Yue-Zhong. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of natural products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SICHERI, A.P.M.P. Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, 2013. 126p.

SIENKIEWICZ, Monika; KOWALCZYK, Edward; WASIELA, Malgorzata. Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 7, n. 2, p. 133-140, 2012.

SILVA, Livia Mara. Atividade esquistossomicida de substâncias naturais em nanopartículas lipídicas sólidas. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). 2018.

SILVEIRA, Gustavo Pozza et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: **Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SINGH, Ishwar. Antimicrobials in Higher Plants: classification, mode of action and bioactivities. **Chem. Biol. Lett**, v. 4, n. 1, p. 48-62, 2017.

SMITH, Jeffrey D.; CUDMORE, Sarah L.; GARBER, Gary E. Diagnosis and Treatment of Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* Infection. In: **Antimicrobial Drug Resistance**. Springer, Cham, 2017. p. 1277-1291.

SOPER, David. Trichomoniasis: under control or undercontrolled? **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 190, n. 1, p. 281-290, 2004.

SORVILLO, Frank et al. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 6, p. 927, 2001.

SOTELO-FELIX, J. I. et al. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 145-154, 2002.

SOUZA, Ana CS et al. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. **Drug and chemical toxicology**, p. 1-6, 2019.

SUN, Jie et al. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276-284, 2003.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 3, n. 3-4, p. 98-109, 2016.

SUTTON, Madeline et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001–2004. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 10, p. 1319-1326, 2007.

TCHOUMBOUGNANG, F et al. *In vivo* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta medica**, v. 71, n. 01, p. 20-23, 2005.

THONGCHAI T, JAKKRIT J, NUTTHAPOL M, WAYA S P. Major Compounds from *Ocimum Basilicum* L. and their Antimicrobial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Biomed J Sci&Tech Res** v. 3, n.03, 2018.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VÁZQUEZ, Fernando et al. *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. **Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica**, v. 19, n. 3, p. 114-124, 2001.

VELOSO, A.V. Divergência genética, análise do óleo essencial e bioatividade de acessos de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) no estado do Tocantins. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Tocantins. Tocantins. Disponível em: <http://www.uft.edu.br/producaovegetal/dissertacoes/Ronice%20Alves%20Veloso.pdf>

WILKINSON, Richard F. et al. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 41-49, 1996.

World Health Organization (WHO). Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016–2021: Towards ending STIs. Geneva: WHO; 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246296/WHO-RHR-16.09-eng.pdf;jsessionid=5A115F37E9D4473AC2BAF991F4E7B916?sequence=1>

World Health Organization (WHO) (2012) Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008: World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012 ISBN 978 92 4 150383 9 Reproductive health matters 20:207-209.

YOUSE, Hossein Ali et al. Effect of *Echinophora platyloba*, *Stachys lavandulifolia*, and *Eucalyptus camaldulensis* plants on *Trichomonas vaginalis* growth *in vitro*. **Advanced biomedical research**, v. 1, 2012.

ZIANI, Khalid et al. Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6247-6255, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de consentimento Livre Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Investigadores responsáveis: Mirian Pinheiro Bruni/ Carolina C. dos Santos/Juliana Fenalti

OBJETIVO DA PESQUISA

Nossos objetivos são avaliar a presença da tricomoníase nas mulheres HIV soropositivas e soronegativas e a capacidade inibitória *in vitro* (quer dizer testada em laboratório) de compostos naturais contra o agente causador da tricomoníase em pacientes atendidas no Ambulatório de Ginecologia da FAMED – UFPel. Esta infecção é considerada uma doença sexualmente transmissível – DST (que é transmitida através da relação sexual) e o causador é o protozoário *Trichomonas vaginalis*. Esta doença provoca sintomas como corrimento intenso, mau cheiro e coceira na vagina, além de facilitar a infecção por outras bactérias, fungos e vírus.

PROCEDIMENTOS

A pesquisa consta de coleta de secreção vaginal durante seu exame de rotina, pelo profissional habilitado da ginecologia, não sendo necessárias coletas extras. Coletaremos duas amostras de sua secreção vaginal: uma através de uma espátula e outra através de um swab (cotonete). Com essas amostras, faremos alguns exames no microscópio, imediatamente após a coleta e posteriormente utilizaremos outra técnica com maior capacidade de detecção desta infecção: a cultura. Realizaremos essa técnica no Laboratório de Parasitologia da UFPel, e o resultado do exame se positivo, será comunicado a equipe médica do ambulatório de ginecologia, para que seja realizado o tratamento. Após realizado o diagnóstico e fornecido à equipe médica, as amostras positivas para o agente causador da infecção serão armazenadas, para serem isoladas e cultivadas para que possamos realizar dois estudos em laboratório: o primeiro sobre a capacidade de produtos naturais em combater o crescimento do agente responsável pela infecção (*T. vaginalis*) utilizando óleos essenciais livres e nanoestruturados (gotículas de tamanho nanométrico capaz de atingir de forma mais eficiente o alvo de ação e promover menores efeitos colaterais do que os causados pelo tratamento convencional) de Capim-limão (*Cymbopogon citratus*), Eucalipto (*Eucalyptus*), Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Manjerição (*Ocimum basilicum*); o segundo estudo, identificará a nível de espécie através de técnicas de genética qual a cepa está causando a infecção e se apresenta maior ou menor potencial patogênico. A amostra colhida não será enviada para outros laboratórios e não será usada para propósitos comerciais, sendo descartada no final do estudo. Qualquer outro uso destas amostras não será realizado sem nova aprovação pelo órgão responsável, ou seja, o Comitê de Ética da UFPel. Você também deve autorizar a análise de seu prontuário médico. Nenhuma outra pesquisa será realizada sem que você seja contatada e dê seu consentimento por escrito. Todos os resultados, dados pessoais

e demais informações serão rigorosamente mantidos em sigilo e as participantes mantidas em anonimato. Cabe informar, que a coleta desse material, é um procedimento necessário para avaliar seus órgãos ginecológicos, entretanto, apesar não afetar a sua saúde, você poderá sentir algum desconforto durante ou após o exame, como dor em baixo ventre e/ou cólica abdominal passageira. Para tentar diminuir estes problemas o estudo contará apenas de profissionais treinados e habilitados para execução deste exame. Este tipo de procedimento não costuma acarretar nenhum tipo de dano, mas, caso isso ocorra, o projeto se compromete de fornecer assistência médica integral gratuita bem como fica garantido o seu direito à indenização devido a possíveis danos decorrentes da sua participação nesta pesquisa.

BENEFÍCIOS

É uma doença que pode ser tratada e curada com o uso do medicamento Metronidazol oral (comprimido) ou vaginal (creme), mas para isso precisamos investigar melhor a presença desta parasitose, evitando futuras resistências ao medicamento usado e também para que possamos estudar novas alternativas de terapia para esta infecção. Sua participação será muito importante para avanços científicos, trazendo benefícios para a sociedade, uma vez que não são conhecidos esses dados em nossa região.

ALTERNATIVAS PARA A PARTICIPAÇÃO

Sua participação nesse estudo é voluntária. Caso você não queira participar, continuará a receber o melhor tratamento nesse serviço. Você é livre para retirar o seu consentimento a qualquer hora. Caso você se recuse a participar isso não afetará seu tratamento atual ou futuro, de qualquer forma.

CUSTOS E COMPENSAÇÕES

Você não pagará nada para participar desse estudo. Você não será pago por estar no estudo. Caso você apresente esta infecção, e não foi tratada no momento da consulta, devido à ausência de sintomas, você será informada para receber seu tratamento, extensivo ao seu parceiro. Se o comparecimento ao serviço não for caracterizado como consulta médica de rotina o gasto com transporte será ressarcido.

CONFIDENCIALIDADE

Este estudo envolve informações confidenciais, ou seja, ninguém além dos pesquisadores terá acesso ao seu nome e informações particulares. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais. O seu nome não será dado para ninguém além dos profissionais do Ambulatório de Ginecologia da UFPel. Cada participante terá um número codificado que a representará em qualquer análise de dados, sem menção de seu nome ou informações que permitam identificá-la, como endereço e telefone. Este código será também utilizado no caso do envio de suas informações e/ou do material coletado para outro local que não o Laboratório de Parasitologia da UFPel. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você. As amostras consideradas positivas que utilizaremos no estudo serão identificadas com uma etiqueta com código (código referente ao número da amostra), específico para cada participante, mas sem nenhuma menção ao seu nome ou outras informações pessoais que possam permitir sua identificação ou que

as amostras sejam ligadas a sua pessoa. Em resumo, os dados individuais de cada participante, resultados de exames e testes, bem como do prontuário serão totalmente confidenciais, acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, com a total confidencialidade dos achados do estudo, as participantes estão protegidas de qualquer tipo de discriminação ou preconceito.

PERGUNTAS OU PROBLEMAS

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, contatar a pesquisadora Mirian Pinheiro Bruni, Carolina Santos ou Juliana Fenalti no Laboratório de Parasitologia – UFPel (53-3275-7398). Também é possível contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/UFPel que avalia protocolos de pesquisa envolvendo seres humanos, e aprovou este estudo: Endereço: Rua Prof Araújo, 473 sala 201 - Pelotas/RS - Telefone: 3284.4900 ramal 312 - Contato: cep.famed@gmail.com Horário de funcionamento: 8:00 - 12:00h. Ressaltamos que este estudo somente poderá ser suspenso após anuência do Comitê de Ética acima mencionado, o qual aprovou este estudo, a menos que o encerramento se dê por razões de segurança. Neste caso, o estudo poderá ser descontinuado sem prévia avaliação do CEP.

CONSENTIMENTO

Agora gostaríamos de lhe convidar para fazer parte do estudo. Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você VOLUNTARIAMENTE concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo. É importante lembrar que a entrevistadora deve lhe entregar uma cópia deste documento!

- Número de identificação da paciente para este estudo: _____
- Nome da paciente: _____

Favor confirmar os itens abaixo:

- () A paciente foi informada sobre o estudo acima.
- () A paciente teve a oportunidade de considerar a informação, fazer perguntas e estas serem respondidas satisfatoriamente.
- () A paciente compreendeu a finalidade do estudo.
- () A paciente compreendeu que toda a informação coletada no estudo será realizada na confiança e que, se for apresentada ou publicada, todos seus dados pessoais serão removidos.
- () A paciente confirma que estará participando neste estudo de acordo com seu livre arbítrio e compreende que pode se retirar dele a qualquer hora e por qualquer razão, sem ter seus cuidados médicos ou direitos legais afetados.
- () 1 cópia para o paciente e 1 cópia para o investigador.
- () As páginas anteriores deste Termo de Compromisso Livre e Esclarecido devem estar rubricadas.

Eu concordo em participar no estudo acima

Nome da paciente _____

Assinatura _____

Data ____/____/____

Nome do investigador que toma o consentimento _____

Assinatura _____

Data ____/____/____

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O participante compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento.

ASSINATURA DO INVESTIGADOR: _____

ANEXOS

ANEXO A

Acta Parasitologica

Evaluation in vitro of anti *Trichomonas vaginalis* and antioxidant activities of free and nanostructured essential oils

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ACTP-D-19-00265	
Full Title:	Evaluation in vitro of anti <i>Trichomonas vaginalis</i> and antioxidant activities of free and nanostructured essential oils	
Article Type:	Original Paper	
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	mrs Juliana Fenalti
Abstract:	Introduction: Trichomoniasis, infection caused by <i>Trichomonas vaginalis</i> is the most common non-viral sexually transmitted infection worldwide. Due to the resistance showed by Metronidazole (MTZ), standard drug, this study aimed to evaluate the efficacy of <i>Cymbopogon flexuosus</i> (lemongrass), <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalyptus) and <i>Ocimum basilicum</i> (basil) free Essential oils (EOs) and nanostructured besides antioxidant activities against <i>T. vaginalis</i>. Materials and Methods: Free Eos and nanostructured were tested for in vitro activity against <i>Trichomonas vaginalis</i>; trophozoites were treated with different concentrations (ranging from 0.25% to 1.5%) in order to establish the MIC and IC50 values. Oxidative stress was also evaluated by measuring lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) detection. Results: The MIC observed to lemongrass was 264 µg/mL to free oil 132 µg/mL to nanoemulsion and to basil was 324 µg/mL to free oil and 432 µg/mL to nanoemulsions, was observed significant antiparasitic activities in 12 and 24 hours exposure, respectively, inhibiting 100% of trophozoites, and showed better results when compared with metronidazole. Antioxidant activity was also observed in these oils, either in free or nanostructures forms were able to reduce the lipid peroxidation. Conclusions: EOs were more effective than standard drug, MTZ, and in association with nanoemulsions, a novel nanocarrier that combine advantages of enhance the activity of the compound that is carrying besides developing a new biologically active natural drugs with lowest and non-toxic concentration, becoming a promising alternative to the treatment of trichomoniasis.	
Corresponding Author:	Juliana Fenalti Universidade Federal de Pelotas Pelotas, RS BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pelotas	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Juliana Fenalti	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Juliana Fenalti Bruna BACCEGA Raquel NEVES Mirian BRUNI Alexia MELLO Yan W. ISLABÃO Samanta GÜNDEL Maiara VELHO Samanta GODOI	

ANEXO B

Manuscript Details

Manuscript number	MOLBIO_2019_94
Title	Evaluation in vitro of anti <i>Trichomonas vaginalis</i> activity, cytotoxicity and antioxidant effects of citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal) major compound of the <i>Cymbopogon</i> species essential oil
Article type	Research Paper

Abstract

The increasing of *Trichomonas vaginalis* resistance to the single class of drug recognized, 5-nitroimidazoles, encourage the research to new agents against this most common major non-viral sexually transmitted infection worldwide. Natural products have been an important source of new options therapeutic against trichomoniasis, in front of this, this study aimed to evaluated the anti-*T. vaginalis* activity of citral (3,7-dimethyl-2, 6-octadienal). Citral is the main constituent of *Cymbopogon* species essential oil, popularly known as lemongrass and with a range of biological activities recognized. Our results showed that citral MIC (minimal inhibitory concentration) 100 μ M /mL inhibit the growth of *T. vaginalis* trophozoites in 12 h of exposure and affect by 50% after 24 h about 40 μ M /mL (IC50/24h). Further, the determination of nitric oxide (NO) levels showed that citral possess an antioxidant activity and the role of this reactive specie at the inviolabilization of trophozoites should be evaluated. Molecular docking experiment was also carried out, showing weak interaction with evaluated proteins TvTrxR, TvPNP and TvMGL. The present study offers new possibilities for the search of potential no-nitroimidazole drugs candidate as an additional option for the treatment of trichomoniasis.

Keywords fitotherapy; natural products; sexually transmitted infection; trichomoniasis; docking

Taxonomy Drug Resistance, Hydrogenosomes

Corresponding Author Juliana Fenalti

Order of Authors Juliana Fenalti, Bruna Baccega, Alexia Mello, Filipe Obelar, Yan Islabão, Paloma Birmann, Angela Casaril, Tallyson Barbosa, Angela Sena-Lopes, Francielle Monteiro, Lucielli Savegnago, Sibeles Borsuk, Silvia Hübner, Nara Amélia Farias, Camila Oliveira

Suggested reviewers Fabiane Anjos Gatti, Daniela Ramos, ALINE OURIQUE

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

cover letter Fenalti.docx [Cover Letter]

HIGHLIGHTS Fenalti_citral.docx [Highlights]

FENALTI et al_citral_Tvaginalis.docx [Manuscript File]

Figure 1.tif [Figure]

Figure 2..tiff [Figure]

Figure 3.tiff [Figure]

Figure 4.tiff [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request

ANEXO C**PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITE DE ÉTICA (CEP_2927741)**

Aprovado sob o número: 873.180, Emenda: 1.838.829

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Prevalência de Trichomonas vaginalis em mulheres HIV positivas no sul do Brasil

Pesquisador: Mirian Pinheiro Bruni

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 36385214.7.0000.5317

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pelotas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.927.741

Apresentação do Projeto:

Trichomonas vaginalis é um protozoário, anaeróbico facultativo, que se multiplica por fissão binária longitudinal. Este parasito é o agente etiológico da tricomoníase, uma doença sexualmente transmissível não viral, mais comum no mundo. A forma de transmissão da doença é por via sexual e devido a infecção não ser de notificação compulsória, as taxas de prevalência da doença são subestimadas. É mais prevalente em mulheres do que em homens, e se localiza no trato gênito de ambos os sexos. As manifestações clínicas da doença incluem uma gama de sinais e sintomas que variam de um estado de inflamação grave e irritação, com descarga vaginal clara ou purulenta, com odor fétido, até um estado de portador assintomático.

No homem, a infecção é assintomática na maioria dos casos. Entretanto, pode apresentar uretrite com fluxo leitoso ou purulento e discreto prurido na uretra. Nos portadores assintomáticos, o protozoário está presente na uretra, podendo ainda encontrar-se na próstata. O diagnóstico é feito através da coleta de secreção vaginal e observação do parasito em exame microscópico direto, ou em material corado para citologia, no entanto, essas técnicas são pouco sensíveis, podendo ocorrer muitos casos falso-negativos. O método de cultura é o padrão-ouro para o diagnóstico porque é simples de interpretar e requer somente 300 a 500 tricomonas/ml de inóculo para iniciar o crescimento.

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.927.741

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar a prevalência de *Trichomonas vaginalis* em mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia da FAMED- UFPEL na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, e sua relação com a infecção pelo vírus HIV.

Objetivos Secundários:

- Analisar a frequência de infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV positivas e negativas;
- Relacionar o diagnóstico da infecção com os níveis de linfócitos T CD4 das pacientes HIV positivas;
- Comparar a sensibilidade e especificidade de diferentes técnicas de diagnóstico utilizados na detecção do parasito;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Cabe informar, que a coleta desse material durante a consulta ginecológica, é um procedimento necessário para avaliar seus órgãos ginecológicos, entretanto, apesar não afetar a sua saúde, você poderá sentir algum desconforto durante ou após o exame, como dor em baixo ventre e/ou cólica abdominal passageira. Para tentar diminuir estes problemas o estudo contará apenas de profissionais treinados e habilitados para execução deste exame. Este tipo de procedimento não costuma acarretar nenhum tipo de dano, mas, caso isso ocorra, o projeto se compromete de fornecer assistência médica integral gratuita e indenização proporcional.

Benefícios:

É uma doença que pode ser tratada e curada com o uso do medicamento Metronidazol oral (comprimido) ou vaginal (creme), mas para isso precisamos investigar melhor a presença desta parasitose, evitando futuras resistências ao medicamento usado e também para que possamos comparar esses dois grupos de pacientes. A participação das pacientes nesse estudo será muito importante para avanços científicos, trazendo

benefícios para a sociedade, uma vez que não são conhecidos esses dados em nossa região.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda de um projeto já aprovado pelo CEP/FAMED. Os pesquisadores receberam uma doação de óleos essenciais na apresentação de nanopartículas para que sejam

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

**UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS**



Continuação do Parecer: 2.927.741

realizados estudos de sensibilidade frente a novas opções de tratamento para o trichomonas vaginalis. Por isso foi elaborado outro TCLE e o adendo para autorização de coletas.

A amostra é formada por todas as pacientes que estiverem presentes no ambulatório de Ginecologia, pelo motivo de terem marcado consulta anteriormente no ambulatório da FAMED, a partir do período de setembro de 2014, até que se atinja uma população de 500 mulheres, sendo 200 HIV positivas e 300 negativas.

As entrevistas serão feitas pelo pesquisador, e ocorrerão por ocasião da coleta de amostras para o exame laboratorial. As pacientes infectadas por T. vaginalis serão tratadas pela equipe médica, e todas as pacientes que participarem do estudo receberão informação, através de material educativo, sobre a tricomoníase e sua relação com a AIDS, assim como explicações relativas à enfermidade diagnosticada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Recomendações:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_857536_E2.pdf	17/09/2018 12:21:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_2016_sem_marcacoes.docx	17/09/2018 12:12:03	Mirian Pinheiro Bruni	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	adendo_nanoparticulas_tricho.docx	17/09/2018 11:56:42	Mirian Pinheiro Bruni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2018.docx	17/09/2018 11:48:00	Mirian Pinheiro Bruni	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_873180.pdf	20/04/2016 19:48:53	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto mirian0001.pdf	18/09/2014		Aceito

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.927.741

Folha de Rosto	folha de rosto mirian0001.pdf	20:22:21		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto digitalizada.pdf	03/09/2014 13:08:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 30 de Setembro de 2018

Assinado por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador(a))

Endereço: Av Duque de Caxias 250
Bairro: Fragata **CEP:** 96.030-001
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com