

CAPÍTULO 15

EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* EM *TRICHOMONAS VAGINALIS* E *TRICHOMONAS GALLINAE*

CAMILA BELMONTE OLIVEIRA¹
FILIPE OBELAR MARTINS²
MARJORIE DE GIACOMETI³
YAN WAHAST ISLABÃO⁴
ALEXIA BRAUNER DE MELLO³
YAN WAHAST ISLABÃO⁴
ADRIANE LEITES STROTHMANN⁵
SIBELE BORSUK⁶

1. Docente – Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.
2. Discente – Ciências Biológicas Bacharelado na Universidade Federal de Pelotas.
3. Discente – Doutorado em Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.
4. Discente – Mestrado em Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.
5. Discente – Mestrado em Biotecnologia na Universidade Federal de Pelotas.
6. Docente – Centro de Desenvolvimento Tecnológico na Universidade Federal de Pelotas.

Palavras-chave

Tricomonose aviária; Tricomonose; Alecrim-pimenta.

INTRODUÇÃO

As doenças causadas por parasitas do gênero *Trichomonas* sp. são de grande importância, uma vez que podem afetar diversas espécies de organismos, incluindo aves e mamíferos, como seres humanos. Essas doenças são conhecidas como tricomoníases e representam um desafio para a saúde pública (MACIEL *et al.*, 2014).

Trichomonas gallinae é o agente causador da tricomonose aviária. Uma doença cosmopolita que tem sido documentada em diversas nações, exceto na Antártida e Groenlândia. A infecção pode se manifestar durante todo o ano, mas é mais prevalente nos períodos finais da primavera, verão e outono, quando os surtos são relatados com maior frequência. Acomete diversas ordens de aves, como Columbiformes, Psittaciformes, Faconiformes e Stringiformes. Pode desenvolver lesões no aparelho digestivo superior como bico, faringe, esôfago e papo desses animais. O pombo doméstico (*Columbia livia*) é considerado o principal agente transmissor e reservatório da doença. Aves infectadas são responsáveis pela disseminação da doença nos comedouros e bebedouros, transmitindo-a diretamente. Isso permite que o parasito circule em pombais de maneira assintomática, ou seja, sem que os sinais clínicos sejam aparentes. Sua transmissão é de forma direta e após a infecção, na forma aguda da doença, o animal pode apresentar lesões na região do bico, olhos e orofaringe. Já na fase crônica, essas lesões tornam-se ulceradas e coalescem, capazes de adentrar o tecido nervoso e ósseo (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA, 2017).

A tricomoníase humana é causada pelo *Trichomonas vaginalis* e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é considerada a infecção sexualmente transmissível, não-viral, de maior prevalência mundial (ROWLEY *et al.*, 2019). Sua transmissão

ocorre principalmente através de relações sexuais sem a utilização de proteção, desta forma, o protozoário penetra na mucosa genital de seu hospedeiro e adere-se ao tecido epitelial, iniciando, assim, sua multiplicação (AQUINO *et al.*, 2020). Acomete principalmente o sistema geniturinário de mulheres. Conforme a OMS, a incidência da tricomoníase no mundo é de aproximadamente 156 milhões de casos (ROWLEY *et al.*, 2019). A determinação da epidemiologia no Brasil é desafiadora devido à subnotificação. As taxas de prevalência no país podem variar consideravelmente, situando-se entre 3,7 e 30%. Essa variação é influenciada por diversos fatores, incluindo condições socioeconômicas e situações de vulnerabilidade (HOBBS & SEÑA, 2013; DE WAAIJ *et al.*, 2017; GATTI *et al.*, 2017). Nos homens, a doença pode apresentar uma resolução espontânea, devido à eliminação mecânica do *T. vaginalis* durante a micção ou por meio de secreções prostáticas. Isso resulta em uma prevalência menor (0,6%) em comparação com as mulheres (5%) (MACIEL *et al.*, 2004; ROWLEY *et al.*, 2019; VAN GERWEN *et al.*, 2021).

De forma geral, os sintomas variam entre presença de secreção com odor fétido, prurido e dor abdominal. Em determinados casos (apenas 2% das mulheres), observa-se o sinal patognômico, *colpitis macularis* ou o cérvix com aspecto de morango, devido às lesões causadas na mucosa (PETRIN *et al.*, 1998; VAN GERWEN *et al.*, 2021).

O tratamento para ambas infecções ocorre unicamente através da utilização dos fármacos do grupo dos 5-nitroimidazóis, sendo o Metronidazol considerado o fármaco de primeira escolha (MEITES *et al.*, 2015). Contudo, atualmente, já se tem relatos de cepas de *Trichomonas vaginalis* e *Trichomonas gallinae* com resistência medicamentosa. Além disso, outro fator a ser citado são os efeitos colaterais

que o medicamento pode causar ao ser administrado, o que pode auxiliar na interrupção do tratamento (PETRIN *et al.*, 1998; GRAVES *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento dessas infecções é de grande importância, visando maior eficácia e evitando efeitos adversos aos pacientes durante o tratamento. Dessa forma, o uso de óleos essenciais é uma alternativa interessante, visto que possuem compostos ativos capazes de interagir como a membrana celular desses parasitos, promovendo alterações em sua morfologia e fisiologia, levando-os a morte (BACCEGA *et al.*, 2019; FENALTI *et al.*, 2020). O alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*), pertencente à família *Verbenaceae*, faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), por conta das suas atividades antimicrobiana, antiséptica, antifúngica e anti-helmíntica (QUEIROZ *et al.*, 2014).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficácia do óleo essencial (OE) de *Lippia origanoides*, Kunth em trofozoítos dos flagelados *Trichomonas gallinae* e de *Trichomonas vaginalis*

MÉTODO

Aquisição do óleo essencial e diluições

O OE alecrim-pimenta foi adquirido da empresa Terra Flor Aromaterapia. Para os ensaios *in vitro*, o óleo foi diluído inicialmente em cinco concentrações, 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, com a utilização dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente.

Parasitos e cultivo

Foi utilizado uma cepa de *T. vaginalis* 30236 da American Type Culture Collection (ATCC), sensível ao metronidazol (MTZ). Já para *T. gallinae*, foi utilizado um isolado clínico

mantido no Laboratório de Protozoologia e Entomologia (LaPEN), da Universidade Federal de Pelotas. Os parasitos foram cultivados em meio *trypticase-yeast extract-maltose* (TYM), sem ágar, pH 6.0 (*T. vaginalis*) e pH 7.2 (*T. gallinae*), com antibiótico (estreptomicina) e soro bovino inativado (SBI) estéril, incubados a 37 °C em condições anaeróbicas (DIAMOND, 1957).

Ensaio *in vitro* com *T. gallinae* e *T. vaginalis*

A motilidade e morfologia dos protozoários foram analisadas em microscópio óptico antes de iniciar o ensaio antiparasitário com a utilização de azul de tripano (0,4%), para assegurar que a viabilidade mínima de 95% e a fase de crescimento logarítmica fossem obtidos.

O ensaio *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia de Sena-Lopes *et al.* (2017). Para os testes foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, em cada poço foi adicionado 150 µL de meio de cultura do protozoário em densidade 2x10⁶ trofozoítos/mL e 50 µL de solução contendo as concentrações do óleo a ser testado. As placas foram incubadas a 37 °C em 5% CO₂, por 24 horas. Ao final das 24 horas, os trofozoítos foram avaliados quanto à motilidade, morfologia e viabilidade, através do ensaio de azul de tripan (0,4%). Uma alíquota (1:1, v/v), contendo os trofozoítos e azul de tripan foi analisada e contabilizada na câmara de Neubauer. Para controle negativo utilizou-se somente os trofozoítos em meio TYM, o controle positivo com MTZ (0,0000083 mg/mL), controle diluente com DMSO (0.6%) e os tratamentos com OE *Lippia origanoides* Kunth, nas concentrações iniciais de 0,3; 0,5; 1; 2,5 e 5 mg/mL, sendo realizado um rastreamento da concentração inibitória mínima (CIM) para ambas as espécies.

Posteriormente foi realizada a curva de crescimento cinético, avaliando as concentrações de CIM de cada parasito, nos tempos de 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, incubadas a 37 °C em 5% CO₂. Novamente, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços até às 24h. Em seguida, as concentrações foram transferidas para microtubos, tipo Eppendorf, sendo suplementado com 1,5 mL de TYM contendo 10% de soro bovino e estreptomicina até 96 h. Para a análise de viabilidade e motilidade dos trofozoítos foi utilizado azul de tripan. Os trofozoítos foram contabilizados em câmara de Neubauer (SENA-LOPES *et al.*, 2017).

Análise estatística

A estatística foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey para comparações múltiplas entre grupos. O valor de probabilidade utilizado foi $\leq 0,05$. Os resultados são expressos como média ($\pm$) e desvio padrão. Para determinação da IC₅₀ foi utilizado regressão não linear. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 8.0.1*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

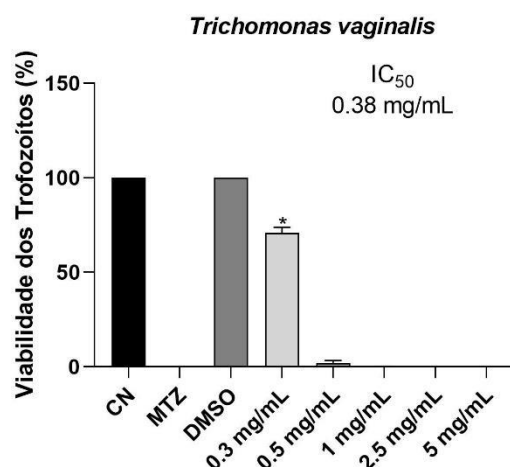
Em nosso estudo, as concentrações do OE de *L. organoides* que reduziram a viabilidade dos trofozoítos de 95% a 100% foram consideradas como tendo atividade tricomonicida.

Nos resultados demonstrados nos Gráficos 15.1 e 15.2, é possível observar que, dentre as cinco concentrações testadas de 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, para ambas as espécies de *Trichomona*, a concentração de 1 mg/mL foi 100% eficaz, portanto, é considerada a CIM. A partir disto foi possível

calcular a concentração inibitória de 50% (IC₅₀), através do teste de regressão não linear, sendo o valor da IC₅₀ para *T. vaginalis* de 0.38 mg/mL e para *T. gallinae* de 0.91 mg/mL. O controle negativo e o controle diluente não tiveram impacto na viabilidade dos trofozoítos. Por outro lado, o controle positivo com MTZ inviabilizou os protozoários.

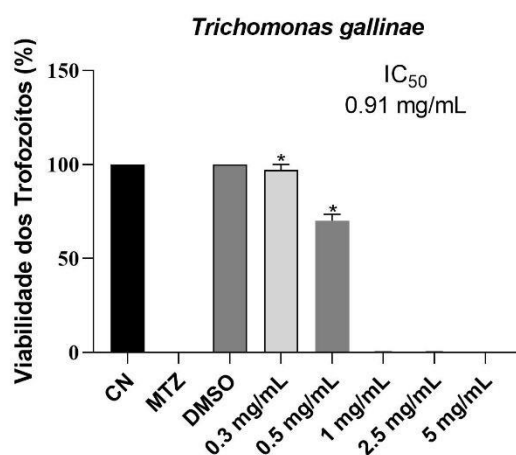
No Gráfico 15.3, da curva de crescimento cinético para *T. gallinae*, tivemos uma eficácia de até 99% na leitura em diferentes tempos. No entanto, na última leitura (96 h) houve um aumento na viabilidade dos trofozoítos (aproximadamente 11%). Ou seja, o tratamento foi eficaz na redução do número de trofozoítos viáveis nas primeiras horas, exceto em 96 h. Isso pode ter ocorrido devido a ação do OE ser limitada pelo tempo. Nos demais tempos, obtivemos inibições de: 98.6% (1 h); 98.8% (6 h); 98.5% (12 h); 99.5% (24 h); 99.7% (48 h); 98.7% (72 h) e 89.1 % (96 h).

Gráfico 15.1. Ensaio *in vitro* Anti-*Trichomonas*. CIM e IC₅₀ para atividade antiparasitária de *L. organoides* em *Trichomonas vaginalis*



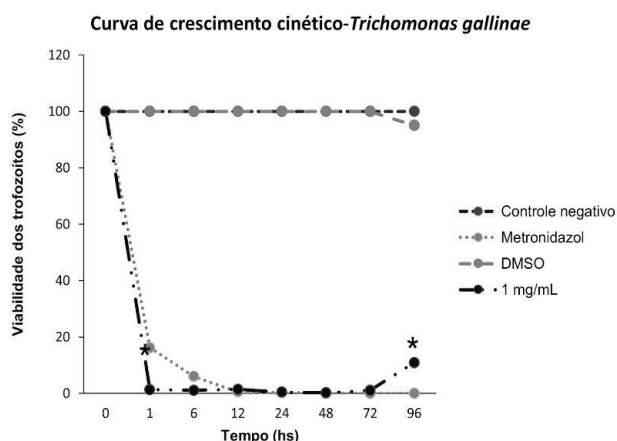
Legenda: CN (controle negativo - sem tratamento), MTZ (controle positivo), DMSO (diluente a 0,6%). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Asterisco (*) mostra diferença significativa em $P < 0,05$ em comparação com o MTZ.

Gráfico 15.2. Ensaio *in vitro* Anti-*Trichomonas*. CIM e IC₅₀ para atividade antiparasitária de *L. organoides* em *Trichomonas gallinae*



Legenda: CN (controle negativo - sem tratamento), MTZ (controle positivo), DMSO (dilúente a 0,6%). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Asteriscos mostram uma diferença significativa em $P < 0,05$ em comparação com o MTZ.

Gráfico 15.3. Curva de crescimento cinético *Trichomonas gallinae*

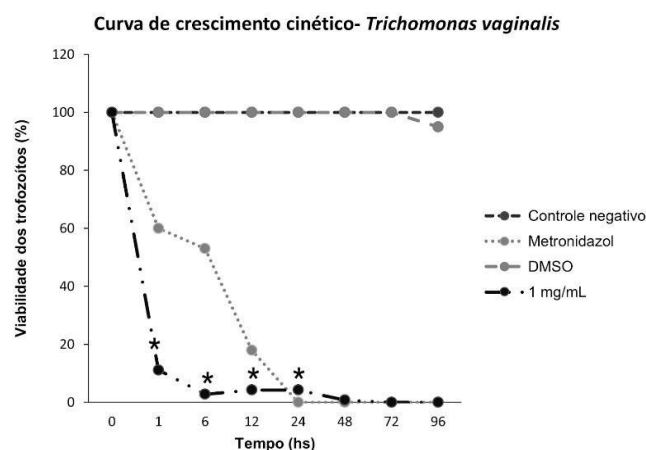


Legenda: Controle negativo (trofozoítos não tratados), MTZ (controle positivo), DMSO (dilúente a 0,6%). Não há diferenças estatísticas em comparação com o MTZ.

Já para a curva de crescimento cinético para *T. vaginalis*, apresentada no **Gráfico 15.4**, podemos observar que, durante a primeira hora de leitura, obtivemos um valor significativo de inibição, cerca de 95% de inibição e nas leituras subsequentes (6 h, 12 h, 48 h, 72 h e 96 h) os resultados foram 97%, 96%, 96%, 99, 100% e 100%, respectivamente. Diferentemente do *T.*

gallinae, não houve um crescimento de trofozoítos no último tempo, permanecendo com 100% de inibição a partir do tempo 72 h.

Gráfico 15.4. Curva de crescimento cinético *Trichomonas vaginalis*



Legenda: Controle negativo (trofozoítos não tratados), MTZ (controle positivo), DMSO (dilúente a 0,6%). Não há diferenças estatísticas em comparação com o MTZ.

É possível observar a atividade tricomonocida *in vitro* do OE de *L. organoides* Kunth, com efeito dose-dependente frente a duas espécies, *T. gallinae* e *T. vaginalis*. O OE apresentou maior atividade em *T. vaginalis*, com mortalidade de 100% dos trofozoítos a partir de 72 h, porém, mais lenta que o metronidazol, que ocorreu em 24 h.

No estudo realizado por Baldissera *et al.* (2017), que testou o óleo em *Trypanosoma evansi* e apresentou atividade contra o parasito em 24 horas nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%. Borges *et al.* (2012) avaliaram a atividade do óleo essencial de *L. organoides* contra *Trypanosoma cruzi*, onde o mesmo demonstrou efeitos positivos no controle deste parasito, apresentando IC₅₀ de 26,2 μ g/mL contra as formas epimastigotas do protozoário. Em um estudo realizado com promastigotas de *Leishmania chagasi*, verificou-se atividade promissora neste protozoário, tendo fixado o IC₉₀ em 26,74 μ g/mL, (CELIS *et al.*, 2007). Os

resultados encontrados nesses trabalhos juntamente com nossos achados, demonstram uma ampla atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Essa atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária dos óleos essenciais pode se dar por seus constituintes majoritários

e minoritários (SILVA *et al.*, 2021). A análise cromatográfica gasosa do óleo utilizado em nossa pesquisa (**Tabela 15.1**) foi emitida pela empresa fabricante, onde é possível observar os compostos majoritários e minoritários que constituem o óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Tabela 15.1. Cromatografia gasosa do óleo essencial de *Lippia origanoides*

Parâmetros	Unidade de medida	Especificação	Resultados
α -tujene	(%)	0,94-1,00	0,97
sabinene	(%)	3,32-3,82	3,46
Beta-pinene	(%)	0,35-0,41	0,36
Mircene	(%)	0,65-2,75	1,67
α -felandrene	(%)	1,88-1,98	1,91
α -terpiene	(%)	1,13-1,21	1,17
para-cimene	(%)	9,58-10,2	9,91
1-8-cineol	(%)	22,23-23,03	22,90
Alfa-terpinene	(%)	7,16-7,38	7,21
teerpin-4-ol	(%)	1,53-1,59	1,57
α -terpineol	(%)	0,78-0,86	0,80
methyl-ether-thymol	(%)	1,93-1,99	1,95
Neral	(%)	1,54-1,58	1,56
Thymol	(%)	1,07-1,27	1,13
Carvacrol	(%)	25,79-27,09	26,55
thymol acetate	(%)	0,40-0,54	0,47
Beta-elemenol	(%)	0,41-0,45	0,43
(E)-caryophyllene	(%)	2,50-2,64	2,58
α -humulene	(%)	1,73-1,83	1,79
amorfa-4-7-(11)-dieno	(%)	0,37-0,39	0,38
Caryofiene oxide	(%)	1,49-1,59	1,57

Ao analisar a **Tabela 15.1**, é possível observar que o composto majoritário do OE utilizado neste estudo, é o carvacrol, que está presente em diversos gêneros de plantas aromáticas, como *Origanum*, *Thymus*, *Coridothymus*, *Thymbra*, *Satureja* e *Lippia* (BASER, 2008). O carvacrol e outros monoterpênicos são conhecidos por ser lipofílicos, desta forma, podem facilmente atravessar a membrana celular de vários organismos, causando sérios danos estruturais e funcionais, o que leva a perda do conteúdo citoplasmático e consequente inibição da cadeia respiratória. Um dos danos estruturais é a desestabilização da bicamada fosfolipídica, o que altera a permeabilidade das membranas externas e internas da mitocôndria de eucariotos, o que gera efeitos apoptóticos (WINK, 2008; MONZOTE *et al.*, 2014; GREAY & HAMMER, 2015). Sendo assim, sugere-se que o possível mecanismo ação do óleo de *Lippia origanoides* nas duas espécies de *Trichomonas* utilizadas neste estudo ocorra através dos danos que

o composto majoritário deste óleo causa na membrana dos parasitos.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, é possível concluir que o óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth apresentou atividade tricomonicida nos valores de CIM encontrado em nossos testes contra *Trichomonas gallinae* e *Trichomonas vaginalis*. Mesmo com os resultados satisfatórios deste estudo, no qual observamos inibições de 99 a 100% em diferentes tempos e concentrações, mais testes são necessários para validar o uso deste óleo como um possível tratamento para tricomoníase humana e tricomonose aviária, como testes citotóxicos, genotóxicos, antioxidantes e *in vivo*, a fim de compreender de forma efetiva o mecanismo de ação do óleo e comprovar se pode se tornar uma alternativa possível para o tratamento destas parasitoses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUINO, M.F.K. *et al.* *Trichomonas vaginalis*. Trends in Parasitology, v. 36, p. 646, 2020.
- BACCEGA, B. *et al.* Free essential oils and nanostructured on *Trichomonas gallinae* trophozoites. *Disciplinarum Scientia - Naturais e Tecnológicas*, v. 20, p. 337, 2019.
- BALDISSERA, M.D. *et al.* Trypanocidal action of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* essential oils against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. *Journal Parasitic Disease*, v. 41, p. 345, 2017.
- BASER, K.H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, p. 3106, 2008.
- BORGES, A.R. *et al.* Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, v. 132, p. 123, 2012.
- CELIS, C. N. *et al.* Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientia et Technica*, v. 13, p. 103, 2007.
- DE WAAIJ, D.J. *et al.* Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection and protozoan load in South African women: a cross-sectional study. *BMJ Open*, v. 7, 2017.
- DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology*, v. 43, p. 488, 1957.
- FENALTI, J.M. *et al.* Evaluation of inhibitory and antioxidant activities of free essential oils and nanoemulsions on *Trichomonas vaginalis*. *Disciplinarum Scientia - Naturais e Tecnológicas*, v. 21, p. 139, 2020.
- FORRESTER, D.J. & FOSTER, G.W. Trichomonosis. In: ATKINSON, C.T. *et al.*, editors. *Parasitic diseases of wild birds*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.
- GATTI, F.A. *et al.* The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. *PLoSOne*, v. 12, 2017.
- GRAVES, K.J. *et al.* A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, v. 147, p. 1383, 2020.
- GREAY, S.J. & HAMMER, K.A. Desenvolvimentos recentes na bioatividade de mono e diterpenos: anticâncer e atividade antimicrobiana. *Phytochemistry Reviews*, v. 14, 2015.
- HOBBS, M.M. & SEÑA, A.C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89, p. 434, 2013.
- MACIEL, G.P. *et al.* Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, 2004.
- MEITES, E. *et al.* A review of evidence-based care of symptomatic trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, p. S837, 2015.
- MONZOTE, L. *et al.* Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e principais componentes: atividade contra *Leishmania*, suas mitocôndrias e outros microrganismos. *Parasitologia Experimental*, v. 136, p. 20, 2014.
- PETRIN, D. *et al.* Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 300, 1998.
- QUEIROZ, M.R.A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 16, p. 737, 2014.
- ROWLEY, J. *et al.* Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 97, p. 548, 2019.
- SENA-LOPES *et al.* Antiparasitic activity of 1, 3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 89, p. 284, 2017.
- SILVA, R.S. *et al.* Componentes majoritários de óleos essenciais, partes usadas e fenofases de *Lippia alba*: uma revisão. *International Journal of Development Research*, v. 11, p. 44556, 2021.
- SILVA, T.E.S. Estudo da prevalência e do impacto da tricomonose em aves silvestres [dissertação]. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2017.
- VAN GERWEN, O.T. *et al.* Epidemiology, natural history, diagnosis, and treatment of *Trichomonas vaginalis* in men. *Clinical Infectious Diseases*, v. 73, p. 1119, 2021.
- WINK, M. Vantagem evolutiva e modos moleculares de ação de misturas multicomponentes usadas em fitoterápicos. *Metabolismo Atual de Drogas*, v. 9, p. 996, 2008.