

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI – *T. vaginalis* DO ÓLEO ESSENCIAL DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA

ÂNGELA SENA-LOPES<sup>1</sup>; RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES<sup>2</sup>; RODRIGO BARROS DE PINHO<sup>3</sup>; MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA<sup>4</sup>; NÍCOLAS LUIZ FEIJÓ SILVA<sup>5</sup>; SIBELE BORSUK<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [angelasena@ymail.com](mailto:angelasena@ymail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [raquelneves@hotmail.com](mailto:raquelneves@hotmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [rodrigobpinho@hotmail.com](mailto:rodrigobpinho@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [marathaisos@gmail.com](mailto:marathaisos@gmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – [nicolaslfsilva@gmail.com](mailto:nicolaslfsilva@gmail.com)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – [sibeleborsuk@gmail.com](mailto:sibeleborsuk@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário do trato genitourinário e o causador da doença sexualmente transmissível (DST) não-viral mais comum no mundo. A Organização Mundial da Saúde estimou em 170 milhões os casos de tricomoníase no mundo anualmente em pessoas entre 15 e 49 anos, com a maioria ocorrendo em mulheres (WHO, 2001). O patógeno está associado a sérias consequências, incluindo complicações na gravidez e nascimento prematuro (KLEBANOFF et al., 2001), infertilidade (GOLDSTEIN et al., 1993), predisposição ao câncer cervical (VILKKI et al., 2000) e doença inflamatória pélvica (CHERPES et al., 2006). Em homens, a tricomonose é geralmente assintomática, caracterizando-os como vetores da doença (PETRIN et al., 1998). A tricomonose também é considerada um agente facilitador da transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (VAN DER POL et al., 2008).

Os fármacos de escolha para o tratamento dessa parasitose são os derivados dos 5'-nitroimidazóis, metronidazol e tinidazol, ambos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA, EUA). Embora as taxas de cura sejam expressivas, falhas no tratamento podem ser observadas e principalmente atribuídas a não adesão ao tratamento ou reinfecção, porém fatores como a pobre absorção do fármaco ou a biodisponibilidade insuficiente também são reportadas (LUMSDEN et al., 1988). Entretanto, a principal causa de insucesso no tratamento é o desenvolvimento de isolados resistentes de *T. vaginalis*.

Os produtos naturais, são fontes potenciais de moléculas bioativas. Dentre esses produtos, citamos a própolis, que tem sido utilizada há séculos na medicina popular devido às suas propriedades terapêuticas (FISCHER et al., 2008). Em 2007, foi reportada a própolis vermelha brasileira (PVB). Extratos de própolis vermelhas de diferentes regiões geográficas já demonstraram potencial utilização enquanto substância antiparasitária (OMAR et al., 2016; AIRES et al., 2007), demonstrando assim o importante potencial farmacológico da Própolis vermelha brasileira. Assim, ressalta-se que o Óleo Essencial de Própolis Vermelha Brasileira (OEPV), ainda não havia sido descrito ou avaliada sua atividade antiparasitária. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti - *T. vaginalis* do OEPV *in vitro*.

### 2. METODOLOGIA

Para avaliar a atividade tricomonocida *in vitro* do Óleo Essencial de Própolis Vermelha Brasileira (OEPV), foram utilizados isolados de *Trichomonas vaginalis*, ATCC 30236, cultivados em meio Trypticase-extrato de levedo maltose (TYM)

(DIAMOND,1957), sem ágar, pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino estéril, inativado a 56°C. Somente foram utilizadas nos ensaios, culturas que apresentaram 95% de viabilidade, comprovada através da observação da motilidade, morfologia e da exclusão por Trypan blue (0,4%), sendo consideradas vivas aquelas que apresentavam motilidade positiva e ausência de coloração pelo corante.

Os ensaios para determinar a concentração inibitória mínima (MIC), foram realizados em placas de microcultivo (96 cavidades, fundo chato - Cral®), e os parasitos na densidade inicial de  $2,0 \times 10^5$  trof/mL de TYM foram incubados com a concentração final do OEPV de 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL, junto com os controles positivo, negativo e com DMSO, à 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes em triplicata. Após 24 h, na proporção 1:1 de trofozoítos e Trypan blue (0,4%), o preparado foi contado em Câmara de Neubauer, observado em microscópio de luz (ampliada x 400) e a análise realizada pelo método de exclusão por Trypan Blue. Também foram observados parâmetros como motilidade e morfologia, sendo considerados vivos os trofozoítos que apresentavam motilidade positiva e ausência de coloração pelo corante. No momento dos ensaios o OEPV foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO). A fim de confirmar a atividade do OEPV, além dos controles negativo (somente trofozoítos) e positivo (100 µM/ml Metronidazol-Sigma Aldrich), também foi avaliado um controle com DMSO, não podendo exceder a concentração de 0,6% de DMSO em cada cavidade.

Para confirmar o MIC, foram coletadas todas as cavidades do MIC e as cavidades com concentrações acima e abaixo deste, além dos controles positivo, negativo e com DMSO. O conteúdo foi transferido para tubos de 1,5 mL tipo eppendorf e acrescido de 2 mL de meio TYM. Após, foram incubados em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24, 48, 72 e 96 h. Para confirmar o MIC, a viabilidade dos trofozoítos foi avaliada pelo método de exclusão por Trypan Blue (0,4%), além da análise da motilidade e morfologia, em cada um dos tempos citados. Após a confirmação do MIC, foi avaliado o IC<sub>50</sub> (metade da concentração máxima inibitória) nas concentrações de 500, 400, 300, 200, 100, 50 e 25 µg/mL, assim como descrito na metodologia do MIC.

A fim de investigar o efeito do OEPV no crescimento de *T. vaginalis*, uma curva de crescimento cinético foi gerada utilizando o isolado de ATCC 30236 assim como descrito na metodologia do MIC. A análise do crescimento pelo método de exclusão por Trypan Blue (0,4%) e a análise da motilidade e morfologia, foi realizada nos seguintes tempos: 1, 6, 12 e 24 h. Em todos ensaios, foram realizados pelo menos três ensaios independentes em triplicata e os resultados expressos como a percentagem de trofozoítos viáveis em comparação com os parasitos não tratados. Os dados foram submetidos à análise unidirecional da variância (ANOVA), utilizando um valor de probabilidade de p 0,05. O teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas entre as médias entre os diferentes tratamentos (SPSS software).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os dados obtidos do MIC, o OEPV demonstrou ideal atividade anti-*T. vaginalis* na concentração de 500 µg/mL, com indução de citotoxicidade completa (100% dos trofozoítos mortos). Também pode-se observar que o OEPV na concentração de 100 µg/mL, no período de exposição de 24 h, corou de azul 50% dos trofozoítos, determinando assim o IC<sub>50</sub>. Os controles negativo e com DMSO, apresentaram motilidade positiva e não coraram com Trypan blue (0,4%),

já o controle positivo corou de azul e teve motilidade negativa em todos ensaios realizados, em 24 h de exposição (Figura 1). Quando analisado a curva de crescimento cinético, o OEPV reduziu o crescimento do trofozoítos em 50% na concentração de 500 µg/mL em 12 h de exposição e induziu citotoxicidade completa em 24h (Figura 2).

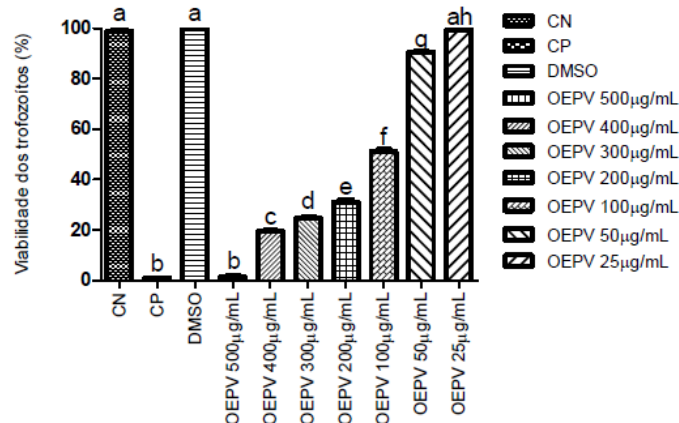


Figura 1. Avaliação da atividade anti- *T. vaginalis* do OEPV pelo ensaio de exclusão por Trypan blue (0,4%), após 24 h de exposição (MIC e IC50). Letras diferentes indicam diferença significativa, para todos  $p < 0,05$ .

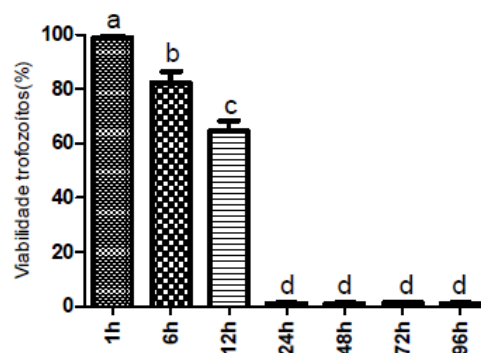


Figura 2. Curva de crescimento cinético do MIC pelo ensaio de exclusão por Trypan blue (0,4%), após 24 h de exposição. Letras diferentes indicam diferença significativa, para todos  $p < 0,05$ .

Extratos de própolis vermelhas de diferentes regiões geográficas já demonstraram potencial utilização enquanto substância antiparasitária. Recentemente foi utilizado o extrato etanólico de própolis vermelha obtido na Nigéria contra *Trypanosoma brucei*, o estudo confirmou potente atividade antiparasitária tanto em linhagens sensíveis à drogas como em linhagens resistentes (OMAR et al., 2016). Em *Leishmania amazonensis*, foram testadas quatro amostras de extratos etanólicos de própolis, duas amostras de própolis coletadas no estado brasileiro do Paraná, própolis verde, tipificado como BRG e BRPG. Própolis coletadas no estado de Minas Gerais, tipificado como BRP-1 (própolis verde) e a amostra coletada no estado de Alagoas como BRV (própolis vermelha). Todos extratos etanólicos de própolis, tanto verde quanto vermelha, foram capazes de reduzir a carga parasitária, sendo esta monitorada pela percentagem de células infectadas e o número de parasitos intracelulares (AYRES, et al. 2007). Estes estudos, demonstram o importante potencial farmacológico da Própolis vermelha brasileira. E esses resultados confirmam que o OEPV é uma fonte farmacológica importante, e assim como o extrato, pode

ser utilizado na composição de diversas formas farmacêuticas com ação antiparasitária.

#### 4. CONCLUSÕES

Podemos concluir que o OEPV apresentou atividade anti- *T. Vaginalis*. Confirmando ser uma fonte farmacológica importante, sendo necessária a realização de mais estudos a fim de investigar diferentes atividades biológicas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, C.D., MARCUCCI, M.C., GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Vol. 102 no.2, pp. 215-220, 2007
- CHERPES, T., WIESENFELD, H., MELAN, M., KANT, J.A., CONSENTINO, L.A., MEYN, L.A., HILLIER, S.L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sexually Transmitted Diseases**. v.33, p.747–752, 2006.
- DIAMOND, L.S. The establishment of various *Trichomonas* in animals and man in axenic cultures. **J Parasitol**. v.43, p. 488-490, 1957.
- FISCHER, G., HÜBNER, S.O., VARGAS, G.D., VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008
- GOLDSTEIN, F., GOLDMAN, M.B., CRAMER, D.W. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. **American Journal of Epidemiology**. v.137, p. 577–584, 1993.
- KLEBANOFF, J. C. CAREY, J. C. HAUTH et al., “Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection,” **The New England Journal of Medicine**, vol. 345, no. 7, pp. 487–493, 2001.
- LUMSDEN, W.H., ROBERTSON, D.H., HEYWORTH, R., HARRISON, C. Treatment failure in *Trichomonas vaginalis* vaginitis. **Genitourin Med**, v.64, p. 217-8, 1988.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA, EUA). **Drug Approvals and Databases**. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>. Acesso em: 08 ago. 2016.
- OMAR, R.M. K., IGOLI, J., GRAY, A. I. et al. Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. **Phytochem. Anal.** Vol. 27, pp. 107–115, 2016
- PETRIN, K. DELGATY, R. BHATT, G. GARBER, “Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*,” **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 11, no. 2, p. 300–317, 1998.
- VAN DER POL, B., KWOK, C., PIERRE-LOUIS, B., RINALDI, A., SALATA, R.A., CHEN, P.L., VAN DE WIJGERT, J., MIMI, F., MUGERWA, R., CHIPATO, T., MORRISON, C.S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **The Journal of Infectious Diseases**. v.197, p.548–554, 2008.
- VIIKKI, M., PUKKALA, E., NIEMINEN, P., HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncologica**. v.39, p.71–75, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. **Overview and Estimates**, WHO, Geneva, Switzerland, 2001.