

ATIVIDADE *IN VITRO* DE 3,7-DIMETHYL-2,6-OCTADIENAL CONTRA TROFOZOÍTOS DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

JULIANA MONTELLI FENALTI¹; BRUNA BACCEGA²; PÂMELA MARTINS
DUTRA³; TALLYSON NOGUEIRA BARBOSA⁴; SIBELE BORSUK⁵; CAMILA
BELMONTE OLIVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – jufenalti@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – dutra_pamela@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – tallyson_n_b@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – sibele@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – camilabelmontevet@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 276 milhões de novos casos de *Trichomonas vaginalis* (TV) são estimados a cada ano, e essa infecção excede o número de casos de clamídia, gonorréia e sífilis (OMS, 2012). Destacando a importância desse patógeno como um problema de saúde pública, esse parasito pode aumentar o risco de adquirir e transmitir o vírus da imunodeficiência humana (HIV), além dos riscos de complicações na gravidez (SERWIN et al., 2013).

O tratamento desta infecção é realizado com o fármaco metronidazol (MTZ), primeiro medicamento reconhecido e suas propriedades biológicas variam de atividades antiparasitárias, antibacterianas a anticâncer (DUA'Y et al., 2015). Casos refratários de TV e resistência clínica ao MTZ foram relatados desde 1962 (KLEBANOFF et al., 2001).

Uma revisão atualizada de vários estudos que avaliam a eficácia de plantas e seus derivados contra TV, mostrou atividade potencial e resultados promissores, sendo produtos naturais uma alternativa para o tratamento da tricomoníase (VIEIRA et al., 2015). Citral (3, 7-dimetil-2, 6-octadienal) é um monoterpeno natural, sendo uma mistura de dois isômeros compostos, alfa-citral (geranial) e beta-citral (neral) (KAKARLA et al., 2009). As condições ambientais e as influências geográficas influenciam diretamente na composição do óleo essencial, no entanto o capim-limão é homogêneo e independente da origem, o citral é sempre o principal constituinte das espécies de *Cymbopogon* (OLAYEMI et al., 2018).

Neste contexto, tendo em vista a busca de novos agentes a partir dos recursos naturais, a atividade antiparasitária do óleo essencial de capim-limão e a resistência desenvolvida por algumas linhagens de TV, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti- *T. vaginalis* do citral, o principal composto de *Cymbopogon* sp. Este teste foi realizado para a atividade *in vitro* contra TV isolado ATCC 30236 (American Type Culture Collection, ATCC) e também foi avaliado em comparação com o metronidazol.

2. METODOLOGIA

O isolado *T. vaginalis* 30236, suscetível ao MTZ, foi utilizado neste estudo. Os trofozoítos foram cultivados *in vitro* em um meio de tripticase-levedura-maltose (TYM) sem ágar (pH 6,0), suplementado com soro bovino estéril inativado por calor a 10% e 5 mg/mL de estreptomicina, incubado a 37°C (DIAMOND, 1957). A atividade anti- *T. vaginalis*, IC₅₀ (metade da concentração inibitória máxima), CIM (concentração inibitória mínima) e ensaio de crescimento cinético foram realizados seguindo a metodologia de Sena-Lopes et al., 2018. Inicialmente, para os ensaios anti- *T. vaginalis*, foram utilizadas culturas com viabilidade igual ou superior a 95%. A atividade do citral foi rastreada *in vitro* contra *T. vaginalis* em placas de microtitulação de 96. Um volume de 150 µL de solução de trofozoítos foi semeada a uma densidade inicial de $2,6 \times 10^5$ trofozoítos/mL e incubadas com 50 µL de uma solução contendo TYM médio e citral a concentrações de 100 µM, 80 µM, 60 µM, 40 µM e 20 µM previamente diluídos em DMSO (0,6%) (SANTIN et al., 2009). Três controles foram aplicados em cada ensaio: um controle negativo contendo apenas trofozoítos, um controle DMSO de 0,6% e um controle positivo contendo 100 µM de Metronidazol (MTZ). As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 24h. Depois disso, a motilidade e morfologia dos trofozoítos foram contadas em uma câmara de Neubauer e analisadas por microscopia óptica, enquanto a viabilidade foi avaliada através da exclusão do corante azul de tripano (0,4%) na proporção de 1:1. O MIC, bem como os controles, foram inoculados em meio TYM a 37°C com 5% de CO₂. Os trofozoítos foram contados em uma câmara Neubauer a cada 24 horas durante 96 h e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de exclusão de corante azul de tripano (0,4%). Uma curva de crescimento cinético foi estabelecida para obter um perfil mais preciso da atividade citral contra *T.vaginalis*. A viabilidade dos trofozoítos foi observada por microscopia óptica após incubação na respectiva concentração inibitória mínima. Os testes foram realizados de forma independente em triplicata e os resultados foram expressos como a percentagem de trofozoítos viáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de anti- *T. vaginalis* de atividade citral mostrou que a concentração de 80 µM, 60 µM e 40 µM não reduziu todos trofozoítos (99,1%, 94,1% e 74,7%, respectivamente), mas não mostrou diferença estatística significativa do medicamento padrão (controle positivo). Na concentração de 100 µM mostrou atividade potencial, como foi observado pelo CIM e foi capaz de reduzir a 100% de viabilidade, sem mostrar diferença estatística significativa quando comparado com MTZ. O IC₅₀ valor foi determinado a 40 µM, inviabilizando 44% dos trofozoítos, mostrando diferença estatística quando comparado com MTZ. Não foram observadas diferenças significativas no grupo controle DMSO 0,6% entre o controle negativo (meio TYM e trofozoítos) (Figura 1).

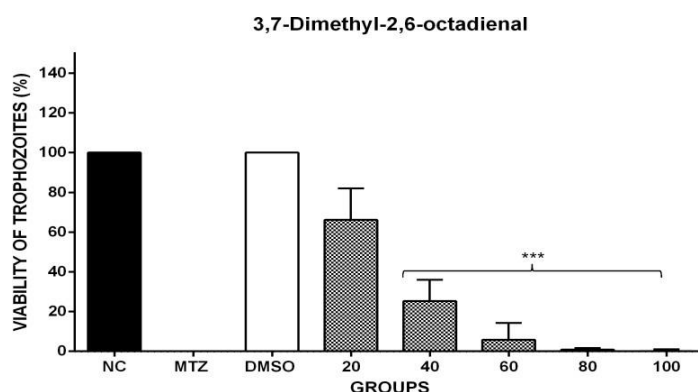


Figura 1- Atividade antiparasitária do citral (3,7-dimetil-2, 6-octadienal) contra *Trichomonas vaginalis* após 24 horas de exposição (20 μ M / mL, 40 μ M / mL, 60 μ M / mL, 80 μ M / mL e 100 μ M / mL). O * indica diferenças estatísticas em relação aos grupos por ANOVA de uma via seguida pelos testes post hoc de Tukey (p <0,05).

A curva cinética mostrou que após uma hora de tempo de exposição pelo citral em 100 μ M, houve redução dos trofozoítos viáveis. Após 6h, metade dos trofozoítos não eram mais viáveis, e em 12h o tratamento atingiu 100% de inativação. Após o mesmo tempo foi observado que o MTZ apresentava trofozoítos viáveis, promovendo a inativação dos mesmos somente em 24 horas.

As espécies de *Cymbopogon* possuem diversas atividades biológicas conhecidas há muito tempo, como antiprotozoário, antibacteriano e antifúngico, atribuídos ao composto majoritário citral (MAMELLO et al., 2016).

O presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos do citral contra *T. vaginalis*. O composto citral foi efetivo nas concentrações superiores a 40 μ M, quando comparado ao MTZ. O mecanismo responsável pela atividade antiprotozoária detectada em nosso estudo ainda é inexplicável, sugere-se que o composto causa danos à membrana celular, altera a integridade e a permeabilidade da membrana, como foi observado em ensaios antifúngicos (ALVINO LEITE et al., 2014). Os OE são lipofílicos, o que contribui para a fácil entrada na membrana celular, interagindo com polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, sendo o primeiro mecanismo de ação, causando a morte celular devido à perda de íons e conteúdos celulares (RAUT E KARUPPAYIL, 2014).

Nossos dados estão de acordo com os encontrados na literatura, apontando os efeitos anti-protozoários do citral, que podem ser responsáveis por alterações na morfologia do parasito, causadas pela ruptura da membrana plasmática, interferindo no processo de divisão celular e promovendo a desintegração do parasito (SANTIN et al., 2009).

A potencial atividade inibitória do citral observada contra *T. vaginalis* em nosso estudo também foi detectada contra *Acinetobacter baumannii*, sendo uma alternativa contra infecções promovidas por cepas resistentes a medicamentos (ADUKWU et al. 2016). Estudos têm demonstrado mecanismo de resistência semelhante entre os únicos medicamentos reconhecidos, o metronidazol e o tinidazol, portanto, novas alternativas são necessárias para promover a eficácia terapêutica contra esses protozoários, como a utilização de compostos bioativos de plantas medicinais, como o citral, são uma fonte promissora para o tratamento da tricomoniase (SMITH et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

Com base nos dados experimentais, este estudo evidencia a capacidade do citral de inibir a proliferação de trofozoítos de *T. vaginalis*. O Citral possui propriedades promissoras para o tratamento dessa IST, sendo necessário mais estudos, a fim de identificar seu mecanismo de ação no protozoário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADUKWU, E. C; BOWLWS, M.; JONES, E. V.; BONE, H. 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.

DIAMOND, L.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.

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

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J.C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM E.A.; HEINE, R.P.; WAPNER, R.J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MODOVINIK M.; SIBAI, B. M.; VAN DORSTEN, J.P.; DOMBROWSKI, M.P.; O'SULLIVAN, M.J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J.M. 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.

LEITE, M. C. A.; BERREZA, A. P. B.; SOUSA, J. P.; GUERRA, F. Q. S.; LIMA, E. O. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2014, 2014.

MAMELLO, S.; GILBERT, M.; PEDRO, C. P.; SOARES, M. O.; MACHADO, M. Cytotoxicity Effects and Mechanisms of Action of *Cymbopogon citratus* Essential Oils Against Pathogens. **EC Pharmacology and Toxicology**, v. 2, n 6, p. 251-262, 2016.

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.

VIEIRA, P. B.; GIORDANI, R. B.; MECEDO, A. J. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology research**, Alemanha, v. 114, n. 4, p. 1249-1261, 2015.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

SANTIN, M. R. 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.

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

SMITH, J. D.; CUDMORE, S. L.; GARBER, G. E. Diagnosis and Treatment of Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* Infection. In: Antimicrobial Drug Resistance. **Springer**, Suíça, v. 2, p. 1277-1291, 2017.