

## **ÓLEO ESSENCIAL E NANOEMULSÃO DE CAPIM-LIMÃO (*CYMBOPOGON FLEXUOSUS*): AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E PADRÕES BIOQUÍMICOS EM CODORNAS INFECTADAS COM *TRICHOMONAS GALLINAE***

BRUNA BACCEGA<sup>1</sup>; JULIA VICTÓRIA SANTOS DE SOUZA<sup>2</sup>; FILIPE OBELAR MARTINS<sup>3</sup>, YAN WAHAST ISLABÃO<sup>4</sup>, RONYSSA DOS SANTOS RIBEIRO<sup>5</sup> CAMILA BELMONTE OLIVEIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – julia.victoriabji@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – obelar05@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – yanwahast06@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – ronyssaribeiro5742@gmail.com

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

### **1. INTRODUÇÃO**

A tricomoníase aviária, causada pelo protozoário *Trichomonas gallinæ*, acomete principalmente Columbiformes, mas também Falconiformes e Psittaciformes, provocando êmese, dispneia, emagrecimento, inchaço do papo e placas caseosas na orofaringe. Casos graves evoluem para fascite periesofágica e miosite, com maior severidade em aves jovens (GÓMEZ-MUÑOZ *et al.*, 2022). A transmissão ocorre durante a alimentação dos filhotes, água e alimentos contaminados. O tratamento é feito unicamente com o grupo de medicamentos 5'-nitroimidazóis, como o metronidazol, com relatos de resistência crescente desde a década de 1990 e está associado a efeitos adversos como neuropatias e possível carcinogenicidade (HUSSEIN *et al.*, 2011). Como alternativa terapêutica, destaca-se o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) com comprovadas atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antioxidantes (IBRAHIM & SALEM, 2013). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros bioquímicos e histológicos de codornas infectadas experimentalmente o protozoário *T. gallinæ* e tratadas com óleo essencial convencional e a nanoemulsão de *C. flexuosus*.

### **2. METODOLOGIA**

O estudo utilizou codornas (*Coturnix coturnix*) de seis semanas, com peso médio de 115 g, mantidas em ambiente climatizado ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12/12 h. As aves foram distribuídas em sete grupos ( $n = 5$ ): A (controle não infectado), B (controle infectado), C (veículo – Tween 80 0,01%), D (nanoemulsão branca – 0,88 mg/kg), E (metronidazol – 25 mg/kg), F (óleo essencial de *C. flexuosus* – 0,55 mg/kg) e G (nanoemulsão do óleo – 0,44 mg/kg) e os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de

Ética e Experimentação Animal da instituição, sob protocolo número 23110.012860/2018-81. Inicialmente, as aves foram infectadas experimentalmente por inoculação oral com  $4 \times 10^4$  trofozoítos. Após o sétimo dia de infecção, foram examinadas por 15 dias via montagem úmida e microscopia, para confirmação da infecção e o peso corporal foi registrado no início e no fim do experimento. Os tratamentos foram administrados por gavagem durante sete dias consecutivos (YOUSSEFI *et al.*, 2017). Posteriormente, as aves foram submetidas a eutanásia para coleta de amostras, soro para as análises bioquímicas (ureia, creatinina, ALT, AST e GGT) e fragmentos de tecido da cavidade oral, esôfago, fígado e rins para avaliação histológica. Os dados foram analisados por ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) seguida do teste de Tukey, utilizando GraphPad Prism 8.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo avaliou os efeitos do tratamentos do óleo essencial convencional de *C.flexuosus* (capim-limão) e sua nanoemulsão em codornas (*C. coturnix*) infectadas experimentalmente com *T. gallinae*, analisando parâmetros bioquímicos e histológicos. Os resultados das análises bioquímicos em aves infectadas, tratadas e não tratadas, não infectadas e a comparação com o metronidazol podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros Bioquímicos Após Tratamento De *Coturnix coturnix japonica* Com Óleo Essencial Livre E Nanoestruturado De *Cymbopogon flexuosus* (média ± SD)

| GRUPOS                 | URE         | CREA         | ALT/GPT      | AST/GOT     | GGT          |
|------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| Controle não infectado | 13,2 ± 3,83 | 0,86 ± 0,03  | 2 ± 0        | 8 ± 0       | 15,5 ± 13,08 |
| Controle infectado     | 14,6 ± 4,92 | 0,20 ± 0,09  | 1,6 ± 0,54   | 4,2 ± 1,09* | 30 ± 0       |
| Tween                  | 6,8 ± 2,16  | 0,68 ± 0,60  | 2,8 ± 2,04   | 8,4 ± 0,54* | 14,4 ± 12,07 |
| Metronidazol           | 12 ± 2,16   | 0,68 ± 0,14  | 1,04 ± 0,54  | 9,6 ± 0,54* | 12,6 ± 4,92  |
| Nanoemulsão branca     | 6,8 ± 1,30  | 1,04 ± 0,56* | 0,6 ± 0,54   | 7,6 ± 0,89* | 10,8 ± 0,83  |
| Óleo essencial         | 9,6 ± 1,51  | 0,77 ± 0,59  | 2,8 ± 1,095  | 4,6 ± 2,19* | 20,4 ± 15,27 |
| Nanoemulsão            | 8,2 ± 4,14  | 0,71 ± 0,05  | 10,6 ± 3,20* | 9,4 ± 1,14* | 13,2 ± 12,65 |

\*diferença estatística quando comparado ao controle não infectado

Fonte: Os autores.

O grupo infectado sem tratamento não apresentou alterações significativas nos marcadores de função renal (URE e CREA) nem hepáticos (ALT e AST), exceto por uma queda inexplicada na AST, diferindo dos achados descritos por SEDDIEK *et al.*, 2014 que relataram níveis aumentados de AST e ALT devido a invasão e dano hepático causados pelas cepas mais patogênicas de *T.gallinae* em pombos domésticos (*Columba livia*). A formulação nanocapsulada sem o princípio ativo já demonstra indícios de potencial toxicidade, causando algum

estresse renal e hepático, observado nos valores de CREA ( $1.04 \pm 0.56^*$ ) e AST/GOT ( $7.6 \pm 0.89^*$ ), o que é uma importante observação para o estudo. Nos animais infectados e tratados com o óleo essencial, foi observado que os parâmetros estão relativamente próximos da normalidade, sem alterações significativas marcadas. Este fato sugere que o óleo essencial convencional apresenta um perfil de segurança favorável nas doses avaliadas. Os animais infectados e tratados com o óleo essencial na forma nanocapsulada apresentaram alteração nos valores nas enzimas ALT/TGP ( $10.6 \pm 3.20^*$ ) e AST/GOT ( $9.4 \pm 1.41^*$ ) significativamente elevados. Estes dados poderiam indicar um efeito tóxico para o fígado quando o óleo é administrado na forma nanocapsulada.

A histologia corroborou parcialmente com os dados das análises bioquímicas. Nos fragmentos de fígado e rim não foram detectadas alterações morfológicas, embora a elevação de ALT/AST no grupo tratado com nanoemulsão sugira danos subclínicos ou funcionais ainda não visíveis. THRALL *et al.*, 2015 evidenciaram maior sensibilidade da bioquímica para detectar injúria celular inicial. No esôfago, as alterações inflamatórias foram atribuídas à infecção por *T. gallinae*, ocorreram tanto em aves infectadas não tratadas quanto nas tratadas. COLE E FRIEND (1999) relatam que cepas de virulência moderada frequentemente causam abscessos caseosos na região orofaríngea, sem lesões visíveis em outros órgãos. GIRARD *et al.*, (2014) observaram aves com lesões caseonecróticas na orofaringe e esôfago, estendendo-se pelo trato digestório superior. No presente estudo, entretanto, identificaram-se apenas alterações microscópicas no esôfago dos grupos tratados com óleo essencial e nanoemulsão de *C. flexuosus*. A tricomoníase é classicamente caracterizada por placas diftéricas branco-amareladas, caseosas, localizadas na orofaringe, esôfago, inglúvio e traqueia. Formas sistêmicas atingindo fígado e pulmão são incomuns (FORRESTER; FOSTER, 2008).

Os tratamentos testados não foram totalmente eficazes em prevenir a lesão parasitária. O óleo essencial livre demonstrou segurança bioquímica, sem alterações relevantes, mas também não impediu a inflamação esofágica. A nanoemulsão, por sua vez, levantou preocupações quanto à segurança hepática, pela elevação de enzimas séricas, embora sem confirmação histológica de dano. Oliveira *et al.*, observaram que fígados de ratos tratados com lipossomas,

sofreram as alterações histológicas na estrutura do órgão, sugerindo a capacidade das nanoestruturas de ativar macrófagos e aumentar o metabolismo e a excreção de vesículas lipídicas. O metronidazol não apresentou alterações bioquímicas significativas, sugerindo segurança, mas a histologia desse grupo não foi detalhada.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que os tratamentos com óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* e sua nanoemulsão não previnem prevenção das lesões esofágicas por *T. gallinae*. A nanoemulsão do óleo essencial mostrou uma possível toxicidade hepática exigindo ajustes de dose e formulação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLE R.A. Trichomoniasis. In: Friend M.; Franson J.C. **Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds**. U.S. Department of Interior, U.S. Geographical Survey; Washington, D.C.; USA: 1999. pp. 201–206.
- FORRESTER, D.J.; FOSTER, G.W. Trichomonosis. In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, D.B. (Eds.), **Parasitic Diseases of Wild Birds**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, p.120-153, 2009.
- GIRARD, Yvette A. et al. *Trichomonas stableri* n. sp., an agent of trichomonosis in Pacific Coast band-tailed pigeons (*Patagioenas fasciata monilis*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 1, p. 32-40, 2014.
- Gómez-Muñoz MT, Gómez-Molinero MÁ, González F, Azami-Conesa I, Bailén M, García Piqueras M, Sansano-Maestre J. Avian Oropharyngeal Trichomonosis: Treatment, Failures and Alternatives, a Systematic Review. **Microorganisms**. 2022 Nov 19;10(11):2297.
- HUSSEIN R, EL-HALABI M, GHAITH O, JURDI N, AZAR C, MANSOUR N, SHARARA AI. 2011. Severe hepatotoxicity associated with the combination of spiramycin plus metronidazole. **Arab J Gastroenterol**, 12:44– 47.
- IBRAHIM, A. N.; SALEM, D. A. Comparison of in vitro activity of metronidazole and garlic-based product (Tomex®) on *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2063-2067, 2013.
- SANTOS, P.M. de S. et al. Parasitos de aves e mamíferos silvestres em cativeiro no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 788-794, 2015.
- SCHMIDT, E.M.S.; PAULILLO, A.C.; SANTIN, E.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; OLIVEIRA, E.G. Hematological and serum chemistry values for the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): variation with sex and age. **International Journal Poultry Science**, v. 6, n.2, p. 137-139, 2007.
- SEDDIEK, Sh A. et al. The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1319-1329, 2014.
- THRALL M.A., BACKER D.C., CAMPBELL T.W., DENICOLA D., FETTMAN M.J., LASSEN E.D., Rebar A. & Weiser G. 2015. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Roca, São Paulo. 592p.
- YOUSSEFI, M. R.; TABARI, M. Abouhosseini; MOGHADAMNIA, A. A. *In vitro* and *in vivo* activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. Iranian journal of veterinary research, v. 18, n. 1, p. 25, 2017.