

# Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de frações de própolis marrom

---

MICHELI FERLA

ORIENTADORA: PROF DR<sup>a</sup> TIANA TASCA

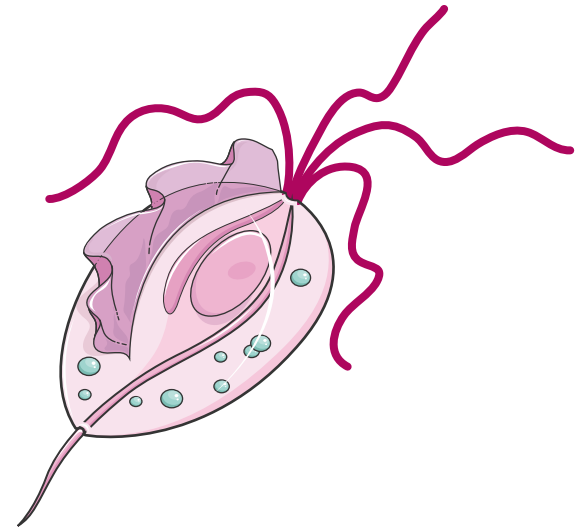
CO-ORIENTADORA: MSc GRAZIELA DE VARGAS RIGO

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2018

# INTRODUÇÃO

## *Trichomonas vaginalis*

- Agente da tricomoníase
- IST não-viral mais prevalente no mundo
- Incidência de 276 milhões de novos casos por ano
- Prevalência mais alta que clamídia, gonorreia e sífilis



# INTRODUÇÃO

## ☐ Mulheres

### ▪ Sintomas

Corrimento  
Prurido  
Dor abdominal

### ▪ Complicações

Parto prematuro  
Baixo peso  
Câncer cervical  
Doença inflamatória pélvica

## ☐ Homens

### ▪ Sintomas

Uretrite

### ▪ Complicações

Câncer prostático  
Infertilidade

## ☐ Assintomáticos

50% mulheres  
75% homens

❖ Aumento da suscetibilidade de aquisição e transmissão ao HIV



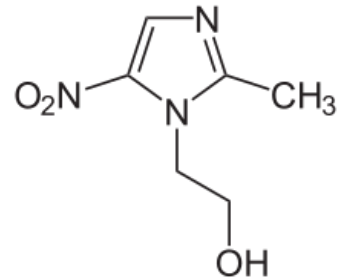
# INTRODUÇÃO

Aprovados pelo FDA  
(*Food and Drug  
Administration*)

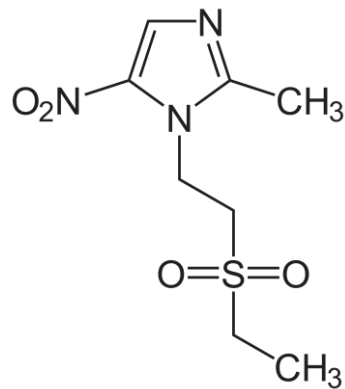
## ❑ Tratamento

5-nitroimidazol:

### ■ Metronidazol



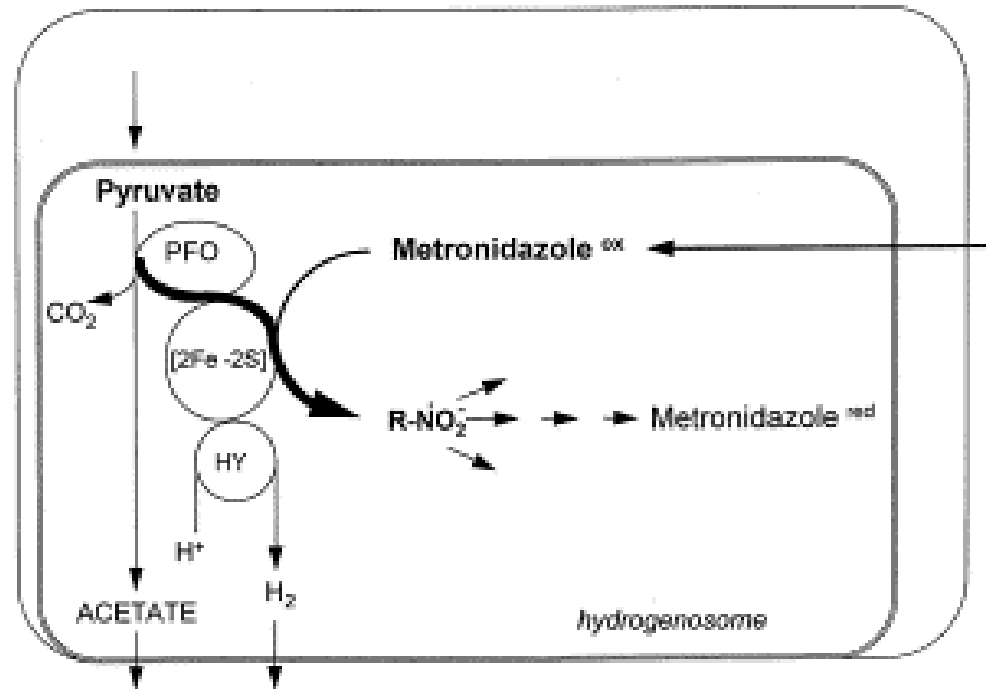
### ■ Tinidazol



# INTRODUÇÃO

## ❑ Mecanismo de ação

5-nitroimidazóis:



(Kulda, 1999)

Aprovados pelo FDA  
(*Food and Drug  
Administration*)



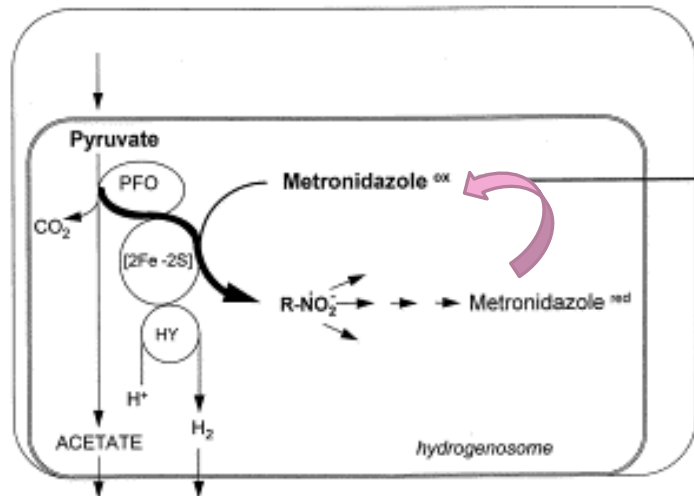
Redução enzimática  
e liberação de  
radicais livres

# INTRODUÇÃO

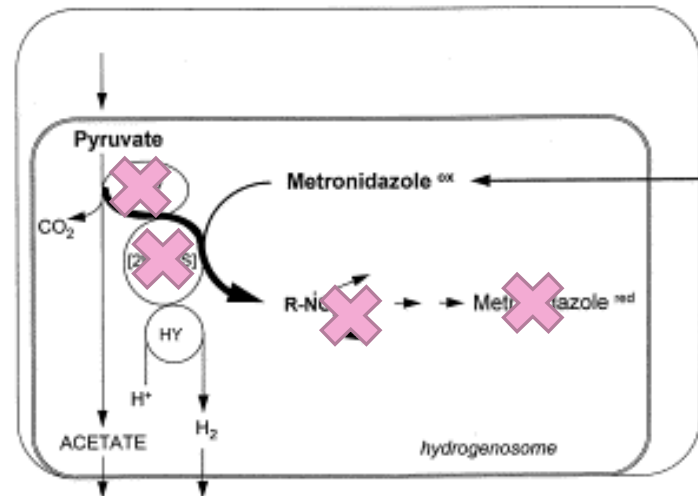
❑ Resistência

5-nitroimidazóis:

**Aeróbica**



**Anaeróbica**



**2,5 a 9,6% de resistência**

Aprovados pelo FDA  
(*Food and Drug Administration*)



Redução enzimática  
e liberação de  
radicais livres



Aumento na  
resistência

# INTRODUÇÃO

Resistência



Fator preocupante a nível saúde pública

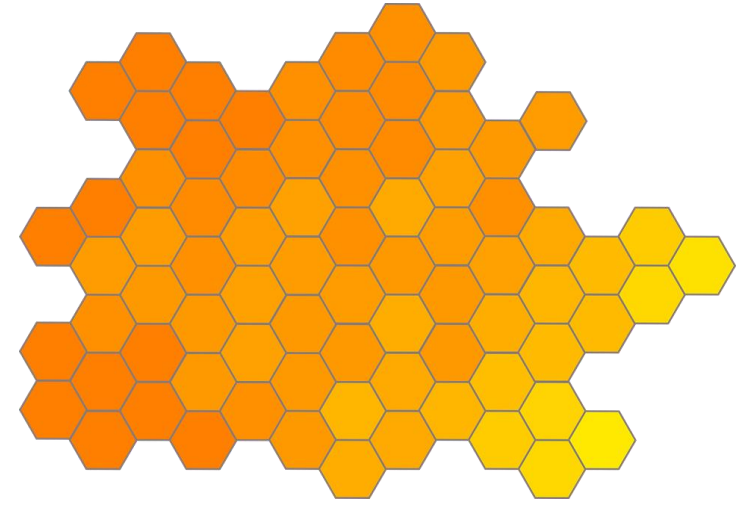
HIV ↔ Tricomoníase

750 casos novos/ano de infecção pelo HIV são facilitados pela presença de *T. vaginalis*, gerando **custos no sistema de saúde** de aproximadamente

U\$ 167 milhões por ano

# INTRODUÇÃO

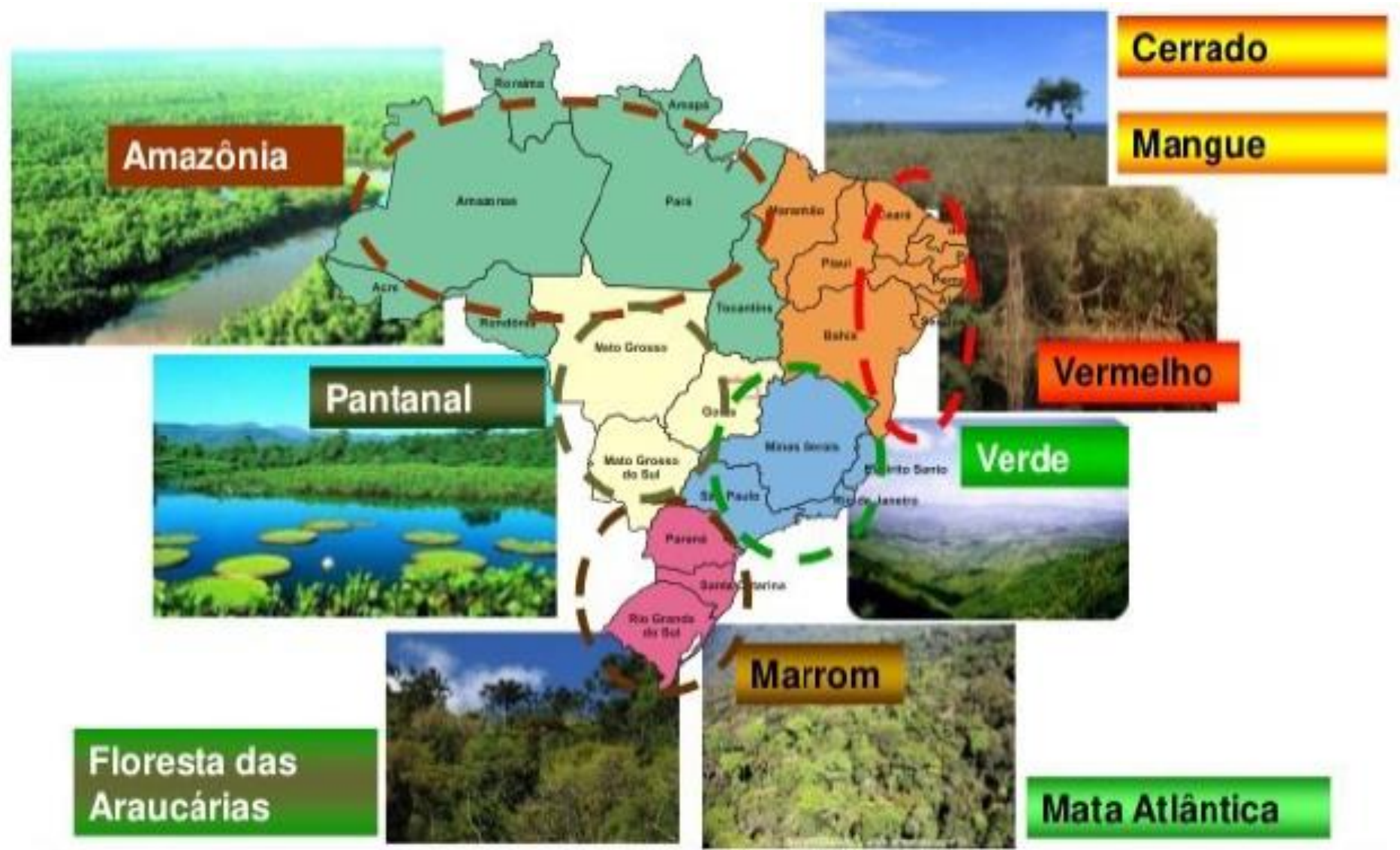
- ❑ Própolis
  - Resina produzida pelas abelhas
  - Função: selar e proteger a colmeia
  - Composição relacionada a flora de cada região
- ✓ Própolis vermelho
- ✓ Própolis verde
- ✓ Própolis marrom





# INTRODUÇÃO

□ Própolis



(Fonte: Associação Brasileira dos Apicultores de Mel)

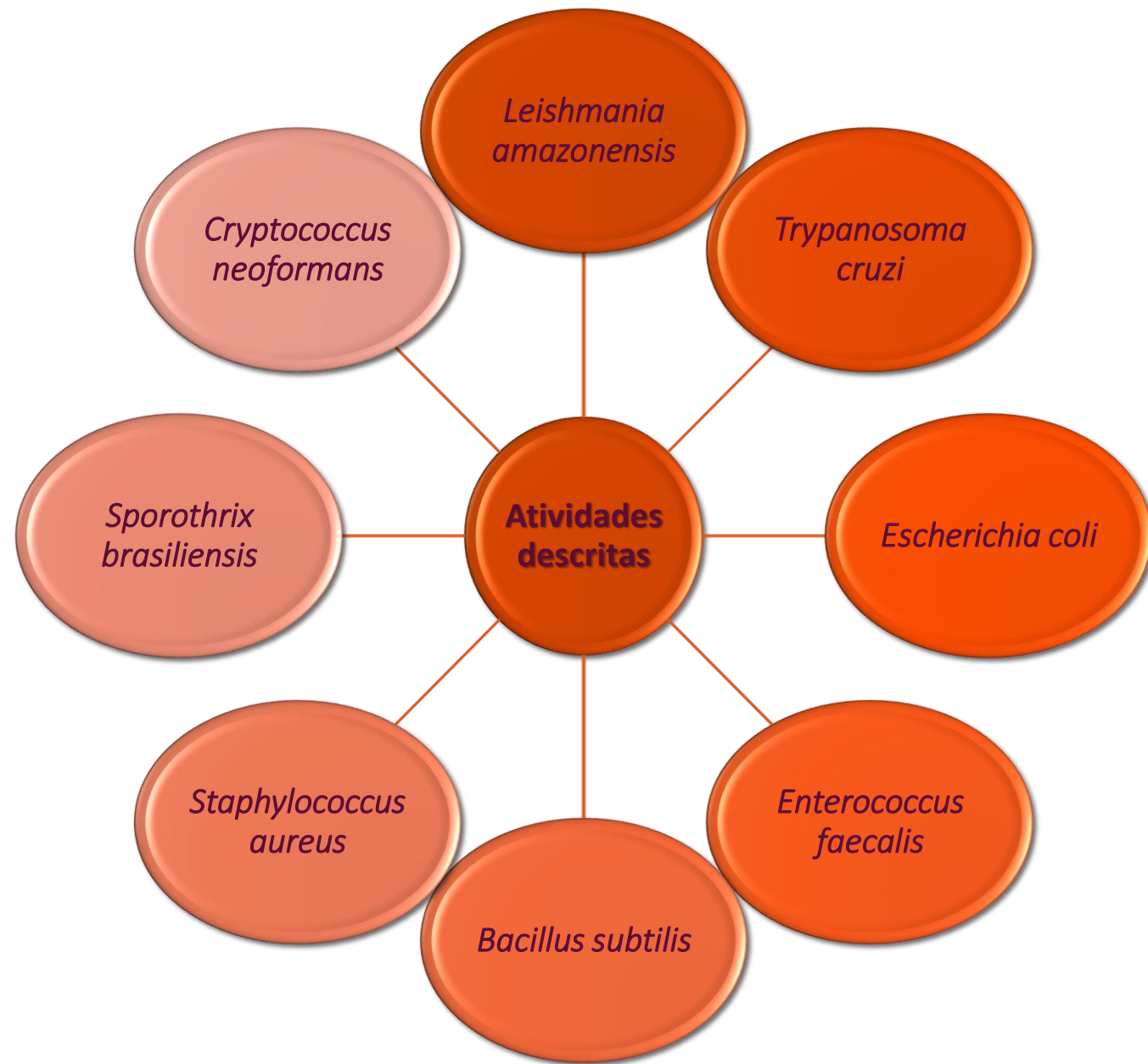
# INTRODUÇÃO

❑ Própolis marrom: 86 compostos identificados

- Ácido cumarínico
- Naringenina
- Drupanina
- Quercetina
- Kaempferol
- Ácido cinâmico
- Artepilina C
- Propol
- Ácido cafeico
- Luteonina
- Diterpeno

# INTRODUÇÃO

□ Própolis marrom





Contents lists available at ScienceDirect

## Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)



### Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*



Djaceli Sampaio de Oliveira Dembogurski<sup>a</sup>, Danielle Silva Trentin<sup>b,c</sup>, Amanda Galdi Boaretto<sup>a</sup>, Graziela Vargas Rigo<sup>d</sup>, Rodrigo Campos da Silva<sup>b</sup>, Tiana Tasca<sup>d</sup>, Alexandre José Macedo<sup>b</sup>, Carlos Alexandre Carollo<sup>a</sup>, Denise Brentan Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana (LaBDiM), Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

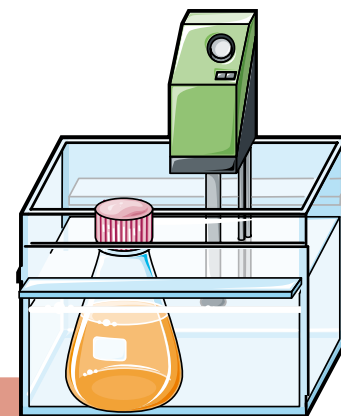
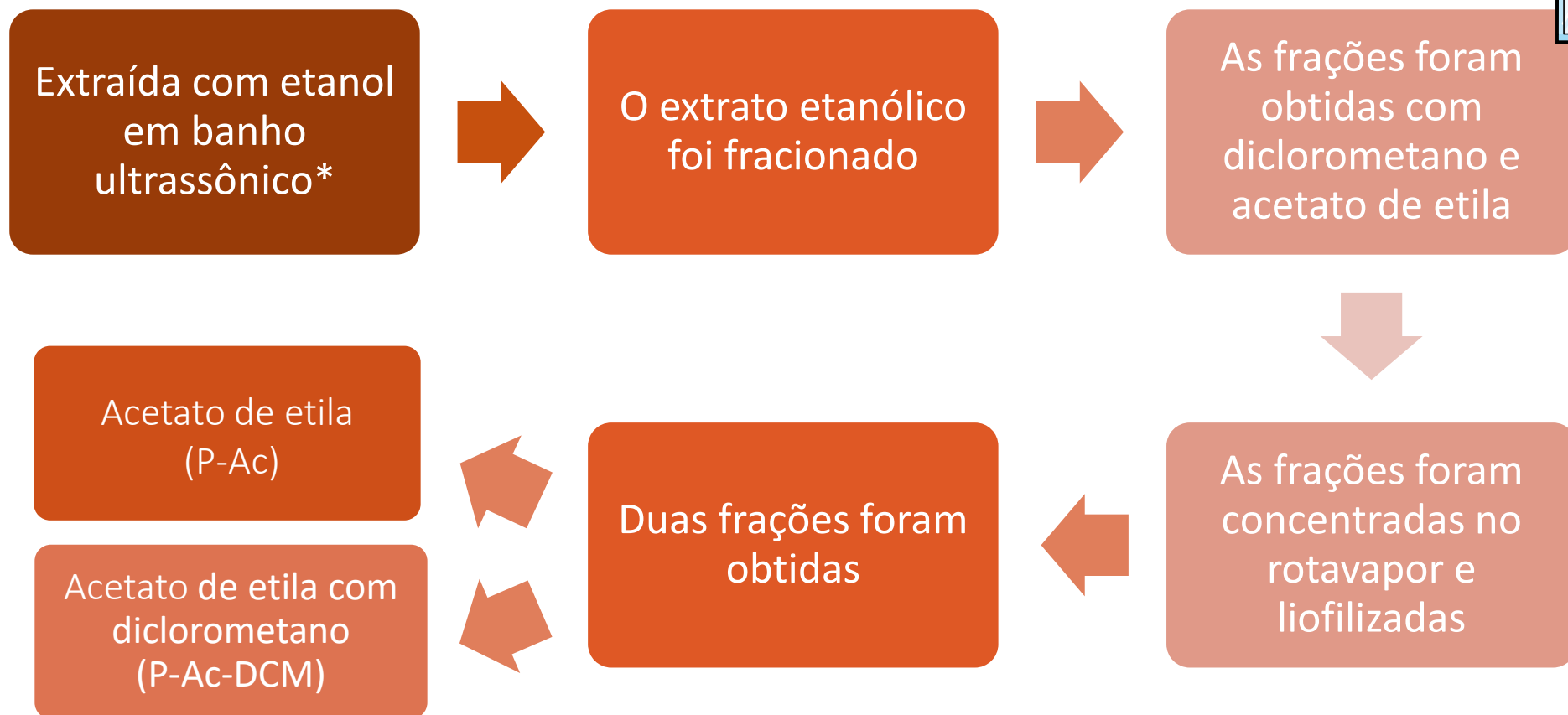
# OBJETIVO

Investigar a atividade anti-  
*Trichomonas vaginalis* de frações  
da própolis marrom



# MATERIAIS E MÉTODOS

## □ Frações da própolis marrom

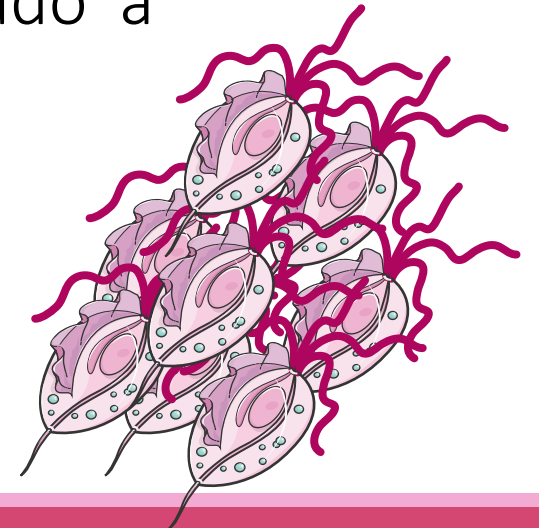


\*As amostras foram processadas como descrito em Dembogurski et al., 2018

# MATERIAIS E MÉTODOS

## ❑ Cultivo *T. vaginalis*

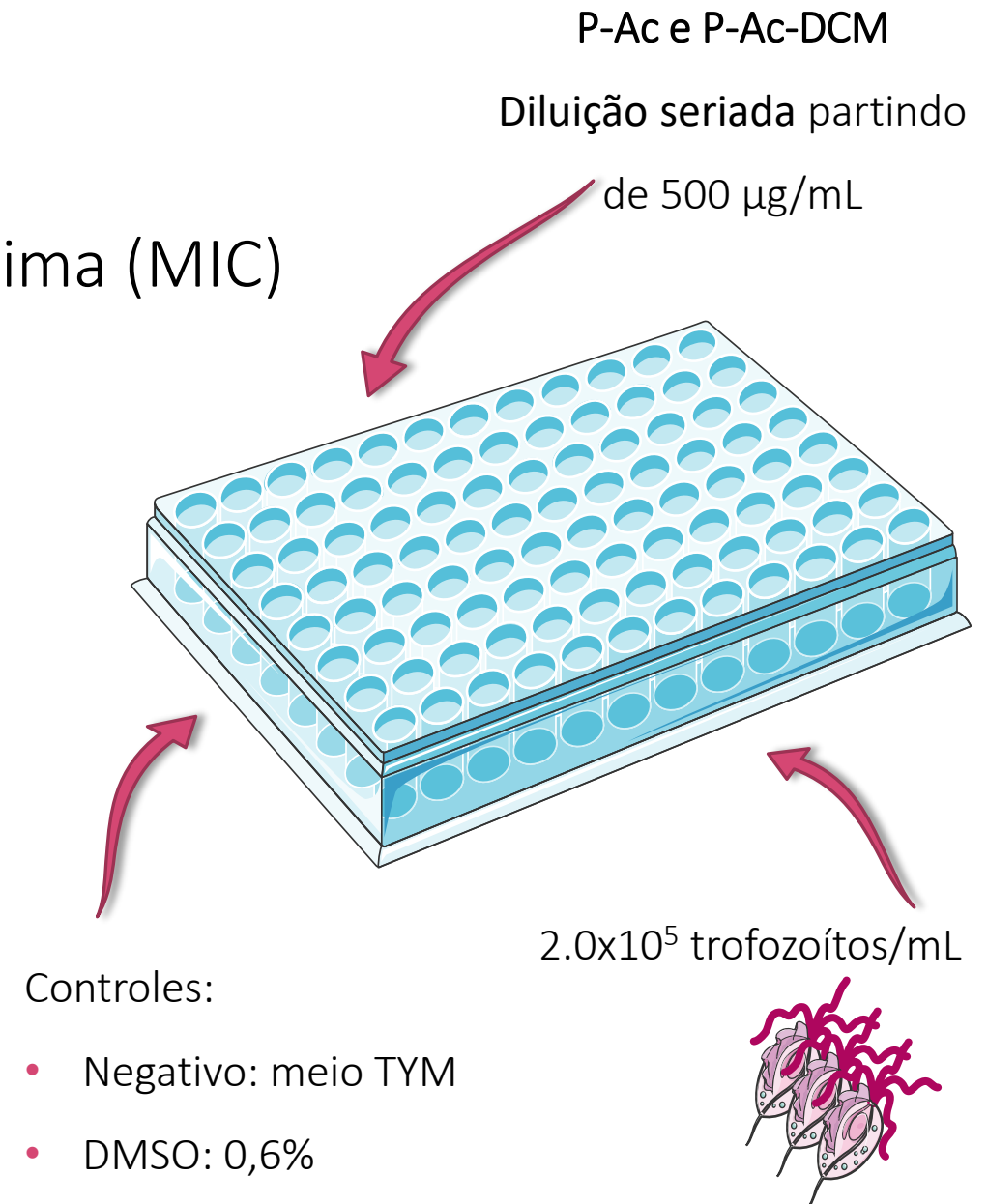
ATCC30236 cultivado em meio *trypticase-yeast extract-maltose* (TYM), pH 6,0, suplementado com soro inativado a 10% (v/v) e incubado a 37°C



# MATERIAIS E MÉTODOS

## ❑ Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

- Incubação a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>
- Após 24h contados com corante de exclusão Trypan Blue (0,2%)
- Parasitos analisados a cada 24h por 120h para confirmar a MIC e IC<sub>50</sub>





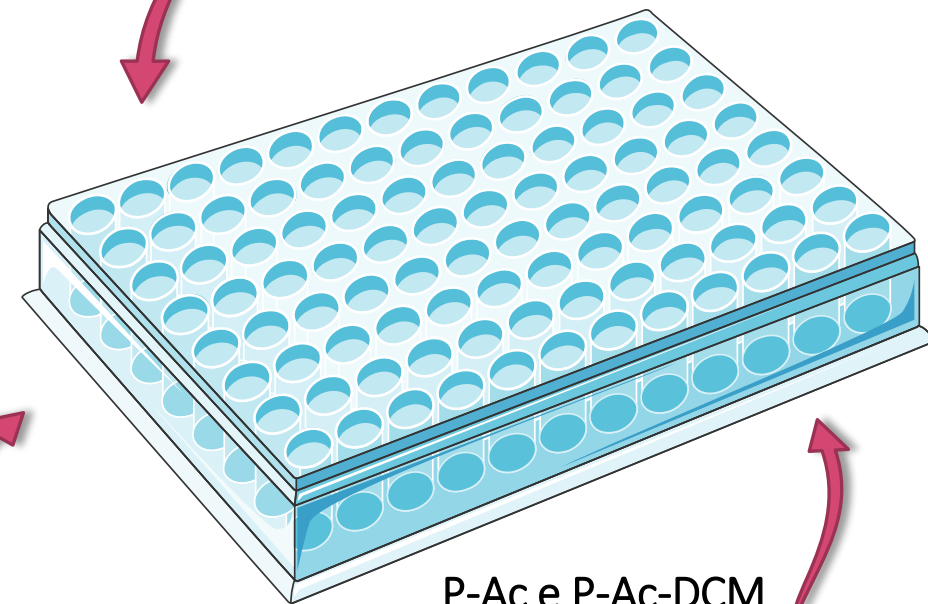
# MATERIAIS E MÉTODOS

## □ Efeito das frações P-Ac e P-Ac-DCM na citotoxicidade

- Incubadas a 37 ° C a 5% de CO<sub>2</sub>
- As placas foram incubadas durante 48h
- A viabilidade das células foi determinada pelo ensaio do MTT e lidas em 570 nm



HMVII e VERO  
1.0x10<sup>5</sup> células/poço



Controles:

- Negativo sem as frações
- Veículo (DMSO 0,6%)
- Positivo (Triton X-100 0,2%)

P-Ac e P-Ac-DCM

Diluição seriada partindo  
de 500 µg/mL

# MATERIAIS E MÉTODOS

## □ Efeito das frações P-Ac e P-Ac-DCM nos eritrócitos

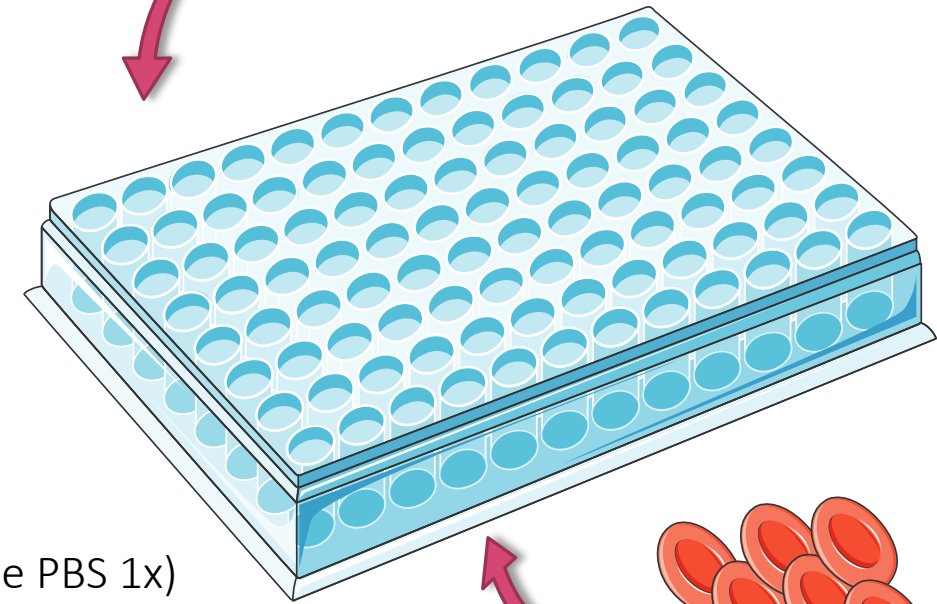
- Incubação a 37°C por 24h
- Liberação de hemoglobina foi medida no espectrofotômetro em 540 nm

Dois controles:

- Negativo (eritrócitos e PBS 1x)
- Positivo (eritrócitos e Triton X-100 0,2%)

P-Ac e P-Ac-DCM

Diluição seriada partindo  
de 500 µg/mL

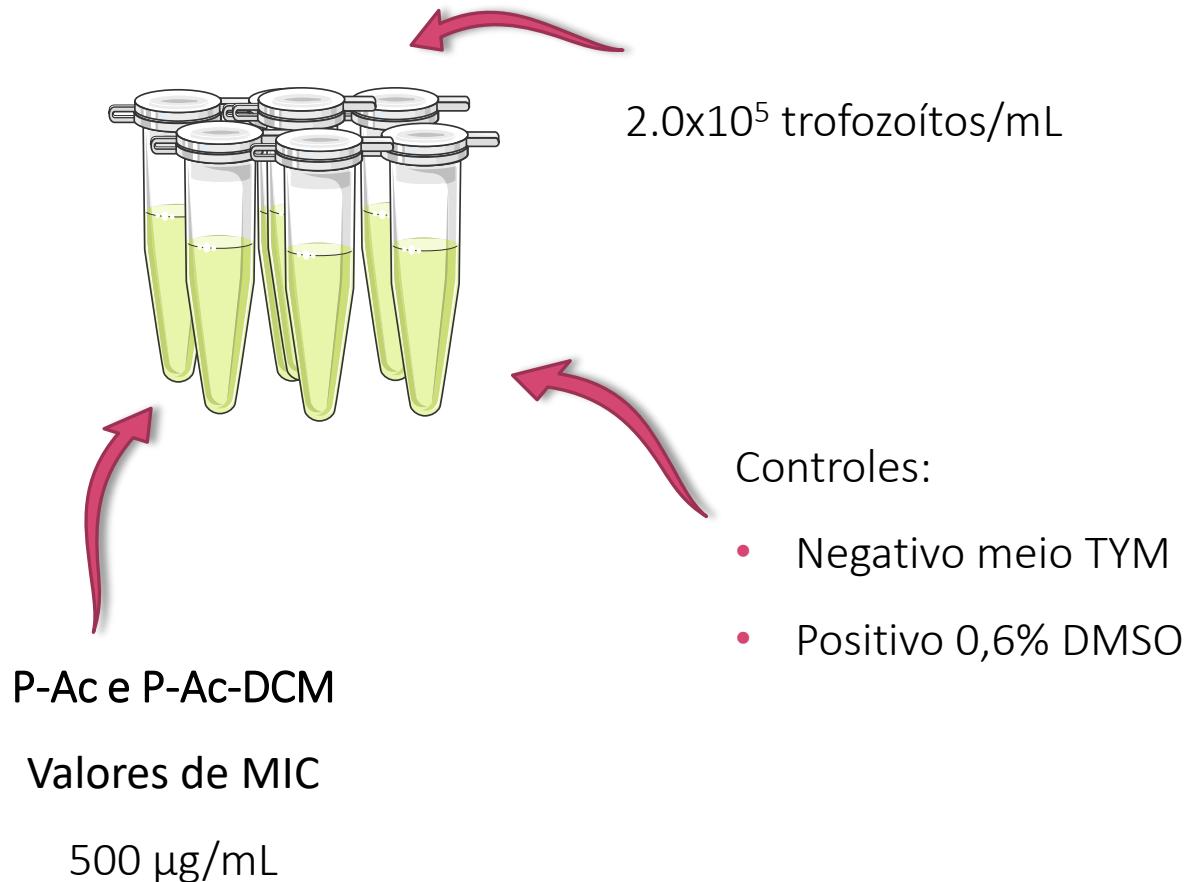


5.0x10<sup>7</sup> células/mL

Realizado conforme descrito por Kiss et al., 2010 com algumas modificações

# MATERIAIS E MÉTODOS

## □ Efeito das frações P-Ac e P-Ac-DCM na cinética de crescimento



- Incubação a 37°C
- Contagem realizada a 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120h

# MATERIAIS E MÉTODOS

## □ Análise estatística

- Experimentos realizados com 3N em triplicata
- Estatística utilizando o teste t de Student com 5% de significância
- Software GraphPad Prism foi usado para determinação de  $IC_{50}$ ,  $CC_{50}$  e  $HC_{50}$

$$SI = \frac{CC_{50} \text{ ou } HC_{50}}{IC_{50}}$$

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## ❑ Determinação concentração inibitória mínima (MIC)

- As concentrações de ambas as frações revelaram atividade anti-*T. vaginalis* com valores MIC e IC<sub>50</sub>

**Tabela 1:** Atividade anti-*T. vaginalis*, citotoxicidade contra as linhagens VERO e HMVII e hemólise das frações da própolis marrom brasileira.

		Frações	
		P-Ac	P-Ac-DCM
ATCC30236	MIC	500 µg/mL	500 µg/mL
	IC <sub>50</sub>	83 µg/mL	168 µg/mL
HMVII	CC <sub>50</sub>	224 µg/mL	250 µg/mL
	IS	2.69	1.48
VERO	CC <sub>50</sub>	261 µg/mL	338 µg/mL
	IS	3.14	2.01
Hemólise	HC <sub>50</sub>	225 µg/mL	150 µg/mL
	IS	2.70	0.89

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## ❑ Determinação concentração inibitória mínima (MIC)

Microrganismo	MIC
Anti-Leishmania	
<i>Leishmania amazonensis</i>	nd*
Anti-Trypanosoma	
<i>Trypanossoma cruzi</i>	nd*
Antibacteriana	
<i>Bacillus subtilis</i>	31.25µg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i>	500µg/mL 860µg/mL 1000mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	13.9µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	19.9µg/mL 15.62µg/mL
Antifúngica	
<i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	0.19 to 1.56 mg/mL nd*

Tabela 1: Atividade anti-*T. vaginalis*, citotoxicidade contra as linhagens VERO e HMVII e hemólise das frações da própolis marrom brasileira.

Frações			
		P-Ac	P-Ac-DCM
ATCC30236	MIC	500 µg/mL	500 µg/mL
	IC <sub>50</sub>	83 µg/mL	168 µg/mL

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## □ Efeito das frações P-Ac e P-Ac-DCM na citotoxicidade

Tabela 1: Atividade anti-*T. vaginalis*, citotoxicidade contra as linhagens VERO e HMVII e hemólise das frações da própolis marrom brasileira.

- IS > 1
- Frações são mais seletivas ao parasito

		Frações	
		P-Ac	P-Ac-DCM
ATCC30236	MIC	500 µg/mL	500 µg/mL
	IC <sub>50</sub>	83 µg/mL	168 µg/mL
HMVII	CC <sub>50</sub>	224 µg/mL	250 µg/mL
	IS	2.69	1.48
VERO	CC <sub>50</sub>	261 µg/mL	338 µg/mL
	IS	3.14	2.01
Hemólise	HC <sub>50</sub>	225 µg/mL	150 µg/mL
	IS	2.70	0.89

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## □ Efeito das frações P-Ac e P-Ac-DCM nos eritrócitos

■  $IS > 1$

■ Fração P-Ac mais seletiva ao parasito

Tabela 1: Atividade anti-*T. vaginalis*, citotoxicidade contra as linhagens VERO e HMVII e hemólise das frações da própolis marrom brasileira

		Frações	
		P-Ac	P-Ac-DCM
ATCC30236	MIC	500 µg/mL	500 µg/mL
	IC <sub>50</sub>	83 µg/mL	168 µg/mL
HMVII	CC <sub>50</sub>	224 µg/mL	250 µg/mL
	IS	2.69	1.48
VERO	CC <sub>50</sub>	261 µg/mL	338 µg/mL
	IS	3.14	2.01
Hemólise	HC <sub>50</sub>	225 µg/mL	150 µg/mL
	IS	2.70	0.89



# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## □ Efeito das frações P-Ac e P-Ac-DCM na cinética de crescimento

- Ambas as frações mostram potencial para atividade anti-*T. vaginalis*
- Após 24 horas de incubação, ambas as frações completamente inibiram a proliferação do parasito

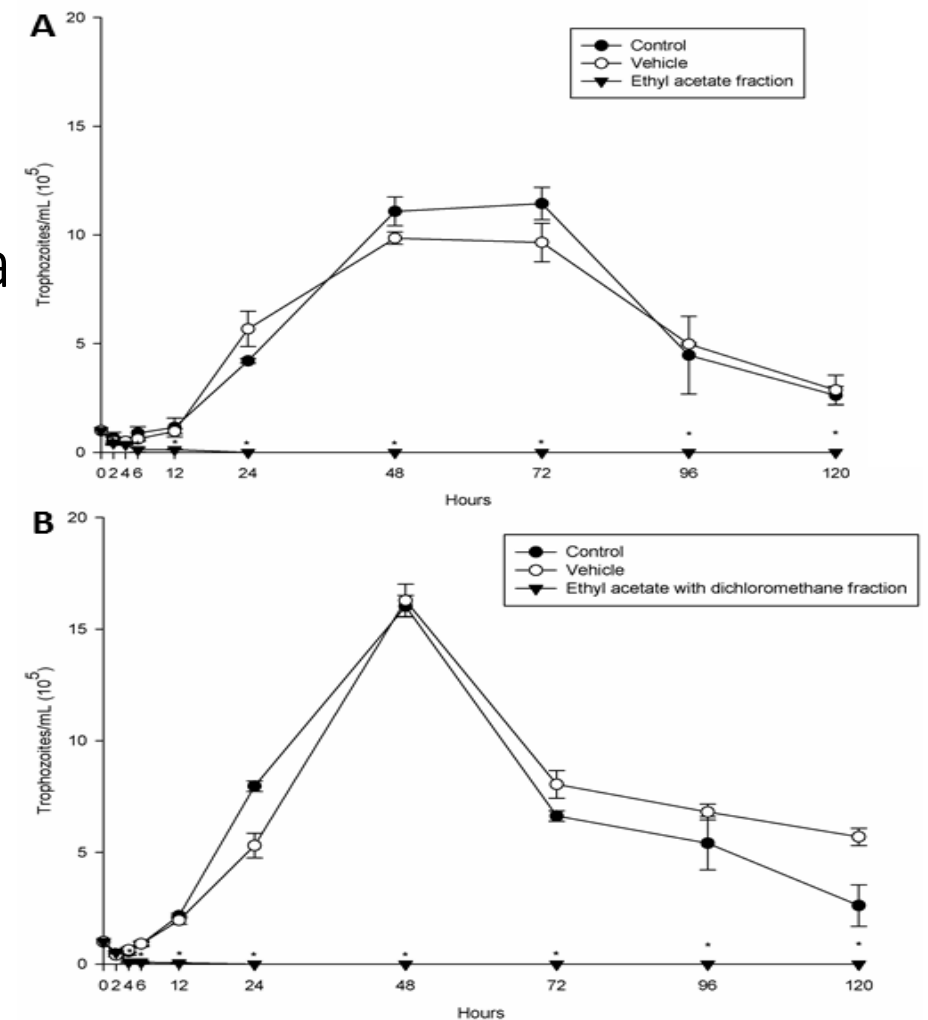
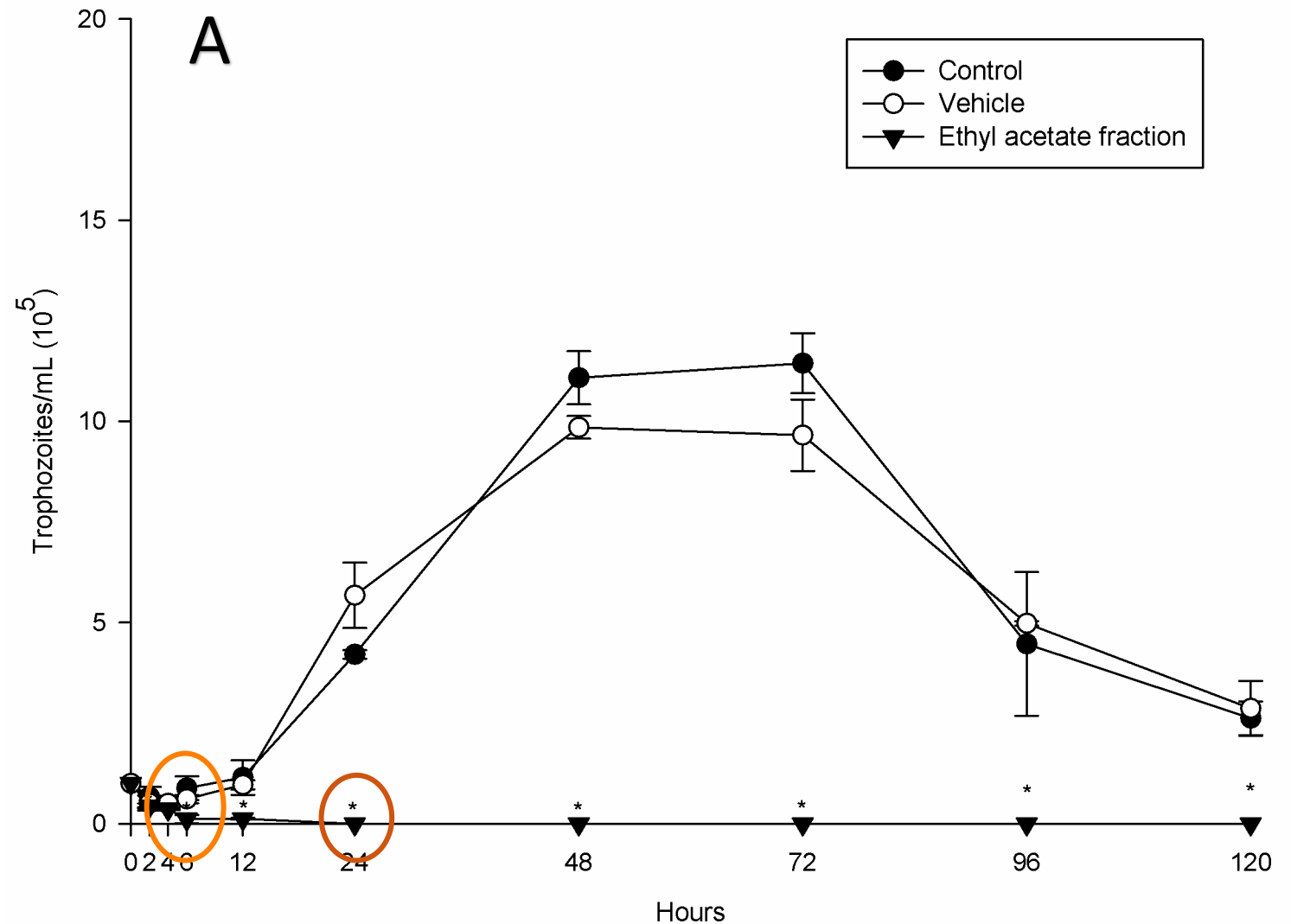


Figura 1: Efeito de P-Ac e P-Ac-DCM, frações de própolis marrom, no crescimento cinético de *T. vaginalis* ao valor da MIC, em comparação com parasitas não tratados (controle) e parasitas com DMSO a 0,6% (veículo)

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

□ Efeito da fração P-Ac  
na cinética de crescimento

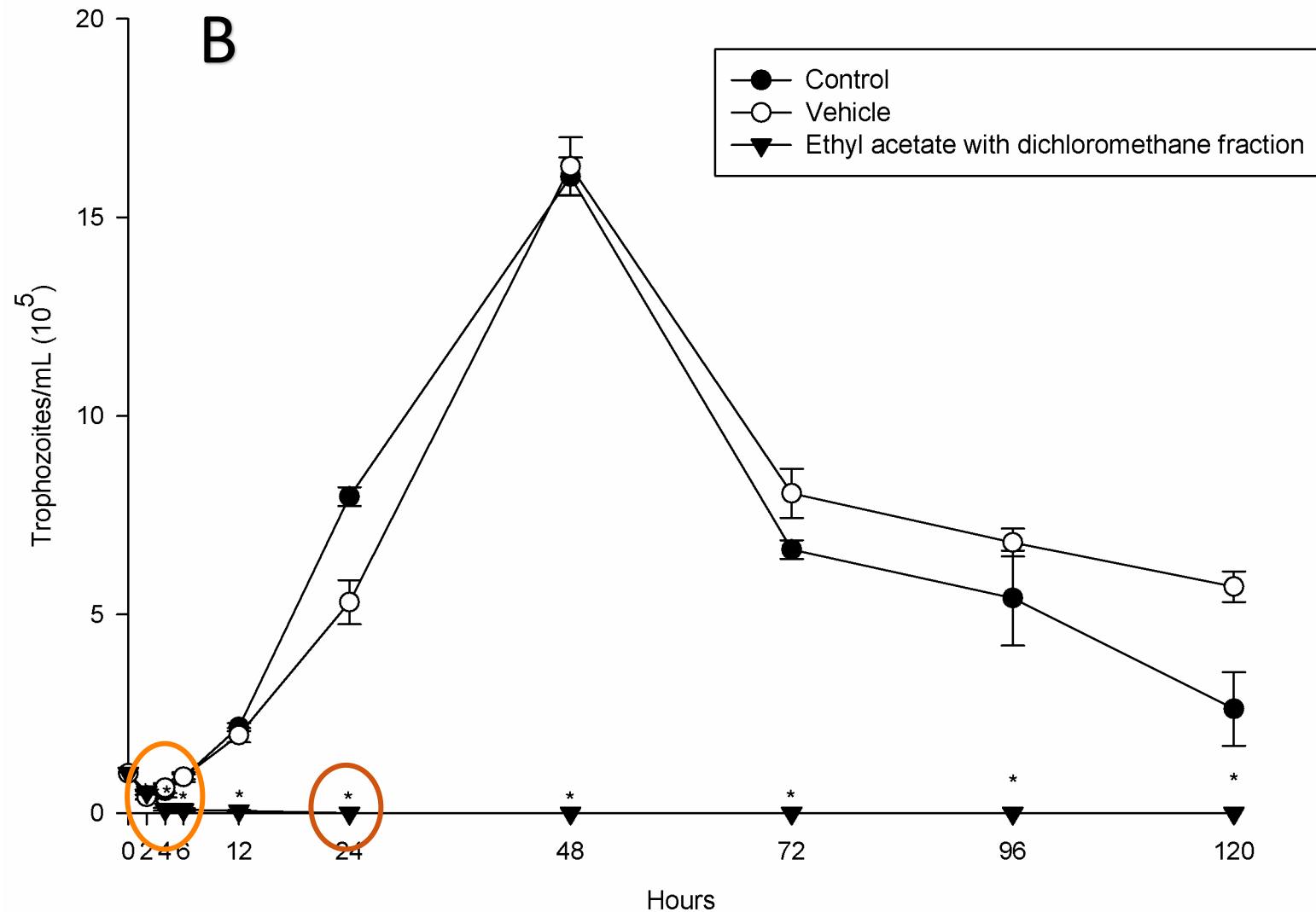
- P-Ac mostrou uma  
diferença significativa na  
proliferação em 6 horas



# RESULTADOS E DISCUSSÃO

□ Efeito da fração P-Ac-DCM na cinética de crescimento

- P-Ac-DCM mostrou uma diferença significativa na proliferação em 4 horas



# CONCLUSÃO

## □ Própolis marrom



# CONCLUSÃO



Novos estudos são necessários para comprovar o potencial da própolis marrom brasileira como agente anti-*T. vaginalis*

# Perspectivas

- ❑ Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* das moléculas isoladas a partir da própolis marrom, como Artepilina C
- ❑ Investigar os mecanismos de ação responsáveis pela atividade

# REFERÊNCIAS

- World Health Organization, Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections, 1st Edition, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008.
- A. C. Sena, W. C. Miller, M. M. Hobbs, J. R. Schwebke, P. A. Leone, H. Swygard, J. Atashili, M. S. Cohen, *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention, *Clinical infectious diseases* (2007) 13–22.
- M. Sutton, M. Sternberg, E. H. Koumans, G. McQuillan, S. Berman, L. Markowitz, The prevalence of *trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the united states, 2001–2004, *Clinical infectious diseases* 45 (10) (2007) 1319–1326.
- D. Petrin, K. Delgaty, R. Bhatt, G. Garber, Clinical and microbiological aspects of *trichomonas vaginalis*, *Clinical microbiology reviews* 11 (2) (1998) 300–317.
- R. N. Fichorova, Impact of *t. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome, *Journal of reproductive immunology* 83 (1-2) (2009) 185–189.
- R. P. Goodman, S. A. Ghabrial, R. N. Fichorova, M. L. Nibert, *Trichomonasvirus*: a new genus of protozoan viruses in the family *totiviridae*, *Archives of virology* 156 (1) (2011) 171–179.
- M.W. Lehker, J. F. Alderete, Biology of trichomonosis, *Current opinion in infectious diseases* 13 (1) (2000) 37–45.
- S. Sutcli  
e, C. Neace, N. S. Magnuson, R. Reeves, J. Alderete, Trichomonosis, a common curable sti, and prostate carcinogenesis—a proposed molecular mechanism, *PLoS pathogens* 8 (8) (2012) e1002801.
- J.-C. Noël, I. Fayt, M. R. R. Munoz, P. Simon, C. Engohan-Aloghe, High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology, *Archives of gynecology and obstetrics* 282 (5) (2010) 503–505.
- M. M. Hobbs, A. C. Se~na, Modern diagnosis of *trichomonas vaginalis* infection, *Sex Transm Infect* 89 (6) (2013) 434–438.
- K. A. Workowski, G. A. Bolan, Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015, *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* 64 (RR-03) (2015) 1.
- R. L. Dunne, A. D. Linda, P. Upcroft, P. J. O’Donoghue, J. A. Upcroft, Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *trichomonas vaginalis*, *Cell research* 13 (4) (2003) 239.
- P. de Brum Vieira, T. Tasca, W. Evan Secor, Challenges and persistent questions in the treatment of trichomoniasis, *Current topics in medicinal chemistry* 17 (11) (2017) 1249–1265.
- V. Ali, T. Nozaki, Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites, *Clinical microbiology reviews* 20 (1) (2007) 164–187.
- D. S. de Oliveira Dembogurski, D. da Silva Trentin, A. G. Boaretto, G. V. Rigo, R. C. da Silva, T. Tasca, A. J. Macedo, C. A. Carollo, D. B. Silva, Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *staphylococcus aureus* biofilm and *trichomonas vaginalis*, *Food Research International*.
- C. C. Fernandes-Silva, A. Salatino, M. L. F. Salatino, E. D. Breyer, G. Negri, Chemical profiling of six samples of brazilian propolis, *Quimica Nova* 36 (2) (2013) 237–240.
- E. T. da Cruz Almeida, M. C. D. da Silva, J. M. dos Santos Oliveira, R. U. Kamiya, R. E. dos Santos Arruda, D. A. Vieira, V. da Costa Silva, P. B. Escodro, I. D. Bas´ilio-J´unior, T. G. do Nascimento, Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with brazilian red propolis extract, *Journal of pharmaceutical analysis* 7 (5) (2017) 280–287.
- P. de Brum Vieira, R. B. Giordani, A. J. Macedo, T. Tasca, Natural and synthetic compound anti-*trichomonas vaginalis*: an update review, *Parasitology research* 114 (4) (2015) 1249–1261.

# AGRADECIMENTOS

