

ATIVIDADE ANTI-*TRICHOMONAS VAGINALIS* DO EXTRATO DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM* OBTIDO POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO E DE SEUS COMPOSTOS ISOLADOS

Simone Tasca Cargin¹; Patrícia Brum Vieira³; Samuel Cibulski⁵; Jarbas Montanha⁵; Paulo Roehe⁵; Eduardo Cassel²; Rubem Vargas²; Geraldo A. De Carli⁴; Gilsane Lino von Poser¹; Tiana Tasca³

¹Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, UFRGS, E-mail:simonetc@gmail.com; ²Laboratório de Operações Unitárias, Faculdade de Engenharia, PUCRS; ³Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS; ⁴Instituto de Geriatria e Gerontologia, PUCRS; ⁵Laboratório de Virologia, ICBS, UFRGS.

Resumo - *Trichomonas vaginalis* é o protozoário responsável pelo tricomonose, doença não viral sexualmente transmissível mais comum no mundo. Isolados resistentes aos fármacos de escolha para tratamento, metronidazol e tinidazol, já foram descritos. Além disso, estes fármacos podem gerar efeitos colaterais desagradáveis nos pacientes. No sentido de melhorar a terapia da tricomonose, este trabalho tem o propósito de avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* do extrato de *Hypericum polyanthemum* obtido por fluido supercrítico (CO₂) e de seus compostos isolados (benzopiranos HP1, HP2, HP3 e uliginosina B). Para isso, realizaram-se ensaios quali e quantitativos anti-*T. vaginalis*, utilizando o isolado ATCC 30236. Foram feitos testes de citotoxicidade em eritrócitos e em células de mamíferos (VERO), e ensaio de liberação de LDH para verificar mecanismo de ação das substâncias. Tanto o extrato quanto as substâncias isoladas apresentaram atividade anti-*T. vaginalis*. As substâncias isoladas mataram mais da metade dos trofozoítos na concentração de 250 µg/mL, já o extrato, matou 100% dos trofozoítos na concentração de 325 µg/mL. Os compostos não provocam lise de eritrócitos, mas apresentaram alta liberação de LDH, sugerindo seletividade no rompimento de membrana dos parasitos. O extrato e o composto HP2 apresentaram-se altamente citotóxicos para células de mamíferos, sendo então, HP1, HP3 e uliginosina B os compostos que podem servir como protótipos de novas moléculas com baixa toxicidade e alta atividade antiprotozoária.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, *Hypericum*, efeito citotóxico.

Introdução

Trichomonas vaginalis é um protozoário que parasita o trato urogenital humano e causa a tricomonose, doença não viral sexualmente transmitida (DST) mais comum no mundo, que afeta 170 milhões de pessoas por ano (WHO, 2001). Estudos têm mostrado muitas complicações relacionadas a esta doença, como: infertilidade (Goldstein et al., 1993) e câncer cervical (Viikki et al., 2000). Metronidazol e tinidazol são os únicos fármacos recomendados pelo FDA para o tratamento desta DST, porém, além de gerar sérios efeitos colaterais, isolados resistentes a estes fármacos já tem sido descritos (Grossman e Galask 1990, Sobel et al.1999). Visando melhorar a terapia da infecção causada por *T. vaginalis*, produtos naturais podem ser fontes ou protótipos de novos fármacos com alta atividade antiprotozoária e baixa toxicidade. Plantas do gênero *Hypericum* são bastante conhecidas na medicina tradicional, sendo *H. perforatum* L. o mais estudado. No Sul do Brasil, este gênero é representado por cerca de 20 espécies, entre elas, destaca-se *H. polyanthemum*, que possui como metabólitos em extrato lipofílico um derivado de floroglucinol, uliginosina B e três

benzopiranos: HP1, HP2 e HP3. Com o intuito de obter maiores teores destes metabólitos, foi proposta, em trabalho prévio, uma nova metodologia de extração, utilizando fluido supercrítico (CO₂) (Cargin et al., 2010), o qual além de ser mais seletivo na extração de compostos lipofílicos, possui inúmeras vantagens quando comparado às técnicas convencionais. Considerando a prevalência e relevância da tricomonose, bem como os problemas relacionados à utilização dos fármacos de escolha, torna-se relevante a pesquisa de novos agentes antiprotozoários, que sejam pouco citotóxicos, e conseqüentemente, gerem poucos efeitos adversos. Neste sentido, testou-se a atividade anti-*T. vaginalis* de uma fração de extrato obtido por fluido supercrítico e dos metabólitos majoritários isolados de *H. polyanthemum*: uliginosina B, HP1, HP2 e HP3.

Materiais e Métodos

Material vegetal, extração com fluido supercrítico, quantificação e isolamento dos metabólitos secundários: As partes aéreas de *H. polyanthemum* foram coletadas em Caçapava do Sul, RS, em outubro de 2009. Para este estudo, utilizou-se a fração obtida por fluido supercrítico a 50°C e 150 bar, o qual foi submetido a quantificação por CLAE, apresentando valores de HP1, HP2, HP3 e uliginosina B iguais a 141,3; 117,5; 102,6 e 352,5 mg/g de extrato, respectivamente. O isolamento dos metabólitos foi realizado através de cromatografia em coluna, seguido de purificação por cromatografia em camada delgada preparativa, e a pureza confirmada por CLAE. **Cultura de *Trichomonas vaginalis*:** Neste estudo, utilizou-se o isolado ATCC 30236, sensível ao metronidazol. Os parasitos foram cultivados anaerobicamente in vitro em meio trypticase–yeast extract–maltose (TYM), pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino e incubados a 37 °C (Diamond 1957). Culturas com mais de 95% de trofozoítos exibindo motilidade e morfologia normal foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em meio TYM. **Ensaio qualitativo e quantitativo de suscetibilidade:** Para avaliar a atividade anti- *T. vaginalis* das amostras, realizou-se um ensaio qualitativo em placa de 96 poços. Para cada amostra foram feitas diluições ao meio, variando de 1,3 a 0,162 mg/mL para o extrato, e de 250 a 31,25 µg/mL para as substâncias isoladas. Cada poço possui um volume final de 200 µL, contendo 5x10⁴ trofozoítos/mL. Após 24 h de incubação, a placa foi visualizada em microscópio invertido, observando-se a viabilidade celular. Para o extrato, a viabilidade foi quantificada através do ensaio da rezasurina (Duarte et al., 2009). Os ensaios quantitativos estão sendo realizados em eppendorf, utilizando-se 3 concentrações das substâncias isoladas a partir do resultado do ensaio qualitativo. Foram utilizados 5x10⁴ trofozoítos/mL em um volume final de 1 mL, incubados por 24 h, e a contagem realizada utilizando câmara de Thoma. **Ensaio de Hemólise:** Ensaio visando verificar a ação das substâncias sobre a membrana de eritrócitos. Para isso, foi utilizado o método descrito por Gauthier et al. (2009) com algumas modificações. Sangue tipo O⁺ foi coletado com solução de Alsever (1:1), e após tratamento, ressuspensionado em tampão PBS, obtendo-se uma suspensão de eritrócitos a 1%. A esta suspensão, adicionou-se cada uma das substâncias, em triplicata, na concentração de 125 µg/mL. Após 1 h no homogeneizador, o sobrenadante das amostras foi lido em espectrofotômetro (540 nm). A porcentagem de hemólise causada pelas amostras foi comparada com o controle, 100% de hemólise, provocado por uma saponina comercial. **Determinação de liberação de LDH:** A fim de verificar o mecanismo de ação das substâncias, avaliou-se a ação das mesmas sobre a membrana plasmática dos trofozoítos. O rompimento da membrana foi analisado através da liberação de LDH no meio de incubação. As amostras, em triplicata, na concentração de 125 µg/mL foram incubadas com 10 µL de inibidor de protease e 5x10⁴ trofozoítos/mL por 24 h a 37°C. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente no sobrenadante, em 500 nm, usando o kit Labtest. A

atividade da enzima LDH em cada amostra foi comparada com o 100% de atividade de LDH liberada por lise total de parasitos. **Citotoxicidade em células VERO:** Para avaliar a toxicidade do extrato e das substâncias isoladas sobre células de mamíferos, utilizou-se o ensaio MTT (Mosmann, 1983). Para cada poço da placa de 96 poços utilizou-se uma densidade celular de 4×10^4 células/mL, que foram tratadas com extrato nas concentrações de 0,325; 0,162 e 0,081 mg/mL, e com as substâncias isoladas nas concentrações de 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL, por 24 h. A seguir, adicionou-se solução de MTT (5mg/mL), e após 3 h de reação, DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A viabilidade celular foi avaliada colorimetricamente, em 550nm (Anthos 2020).

Resultados e Discussão

No ensaio da resazurina, o extrato de *H. polyanthemum* obtido por extração com fluido supercrítico apresentou uma concentração inibitória mínima (MIC) de 325 µg/mL frente a trofozoítos de *T. vaginalis*. Porém, mostrou-se altamente citotóxico para as células de mamíferos, apresentando na MIC em torno de 13% de viabilidade celular. No ensaio qualitativo, os metabólitos isolados nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL reduziam de forma significativa viabilidade dos trofozoítos. Os ensaios quantitativos estão sendo realizados, confirmando esta redução de viabilidade, que é de pelo menos, mais da metade dos trofozoítos. HP1, HP3 e uliginosina B não se mostraram citotóxicos nestas concentrações para as células de mamíferos, apresentando de 70 a 99% de viabilidade celular. Já o composto HP2, embora apresente atividade anti-*T. vaginalis*, mostrou-se altamente citotóxico. Nenhuma das substâncias testadas causou hemólise de eritrócitos, e todas apresentaram valores de mais de 90% de liberação de LDH. Estes dados sugerem que os compostos apresentam-se seletivos no rompimento de membranas, rompendo apenas a membrana plasmática dos parasitos.

Conclusões

O extrato obtido por fluido supercrítico de *H. polyanthemum* e seus compostos isolados apresentam atividade citotóxica frente a trofozoítos de *T. vaginalis*. Embora a atividade antiprotozoária das substâncias testadas não seja muito pronunciada, a ausência de lise de eritrócitos e de citotoxicidade frente a células de mamíferos são indícios que estas moléculas, principalmente HP1, HP3 e uliginosina B, podem ser utilizadas como protótipos de novas moléculas com alta atividade antiprotozoária e baixa toxicidade.

Apoio

CNPq, Capes e Fapergs.

Referências

- Cargnin ST; Nunes, JM; Haas JS; et al. Supercritical fluid extraction and HPLC determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. Journal of Chromatography B, 878: 83–87, 2010
- Diamond LS. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. Journal of Parasitology 43: 488–490, 1957
- Duarte M, Giordani RB, De Carli GA, et al. A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. Experimental Parasitology 123: 195–198, 2009

Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, et al. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semisynthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 2002–2008, 2009

Goldstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology* 137: 577-584, 1993

Grossman JH, Galask RP. Persistent vaginitis caused by metronidazole resistant trichomonas. *Obstetrics Gynecology* 76: 521–522, 1990

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63, 1983

Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis-an emerging problem. *The New England Journal of Medicine* 341: 292–293, 1999

World Health Organization - Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. In: WHO, Geneva, pp 27–29, 2001

Viikki M, Pukkala E, Nieminen P, Hakama M. Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica* 39:71-75, 2000