

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Tese

Tricomoníase aviária: eficácia de óleos essenciais e nanoemulsões *in vitro* e *in vivo*

Bruna Baccega

Pelotas, 2021

Bruna Baccega

Tricomoníase aviária: eficácia de óleos essenciais e nanoemulsões *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Camila B. Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nara A. da R. Farias

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B116t Baccega, Bruna

Tricomoniase aviária : eficácia de óleos essenciais e nanoemulsões *in vitro* e *in vivo* / Bruna Baccega ; Camila Belmonte Oliveira, orientadora ; Nara Amélia da Rosa Farias, coorientadora. — Pelotas, 2021.

195 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Aves. 2. Antioxidante. 3. Citotoxicidade. 4. Fitoterapia. 5. Nanotecnologia. I. Oliveira, Camila Belmonte, orient. II. Farias, Nara Amélia da Rosa, coorient. III. Título.

CDD : 636.5089696

À minha família e amigos pelo apoio e incentivo.

À minha avó Maria (*in memoriam*).

Dedico

Agradecimentos

À meus Pais Bruno César Baccega e Inajara de Fátima Fruet Baccega, pessoas maravilhosas das quais me orgulho muito, e que com extrema dedicação nunca mediram esforços para que eu alcançasse este objetivo. Amo vocês.

Ao meu irmão, Jandyr Baccega Neto, pessoa que só veio para somar ainda mais na minha vida. Te amo muito!

Ao Maurício, com amor, pelo permanente incentivo e preocupação com que sempre acompanhou este meu trabalho. Agradeço ainda a paciência e amor demonstrados nos meus momentos ruins, e principalmente, pelo incentivo e ajuda quando foi necessário, sempre estando do meu lado para o que der e vier.

Aos meus avós, Tios e Tias, primos e primas pelos conselhos e carinhos cedidos durante toda minha vida.

Aos meus amigos de fé, principalmente a Andréia, Cibele e o Pedro, que se não fossem eles, não estaria aqui, aos amigos desde a faculdade, que sempre não mediram esforços para me ajudar nas difíceis etapas que percorri, tanto na vida profissional quanto na vida pessoal.

Aos amigos, professores e técnicos de laboratório da Pós-graduação, pela ajuda, conselhos e orientações a mim oferecidos.

Aos colegas de laboratório, Alexia, Carolina, Filipe, Juliana e Yan, que nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse necessário, independente do horário e do dia que fosse agradecer-lhes os momentos, por vezes, magníficos, que passámos. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e a alegria que por vezes se instalava. A professora Élvia Vianna, agradeço o apoio durante esses anos que estive com você.

Aos colegas e amigos de outros laboratórios, em especial, Raquel Neves, Talysson Barbosa, Paloma Birmann, Angela Casaril, Márcia Raquel, Franciele Liz e Maria Antonieta Machado, agradeço a colaboração.

A Profa. Dra. Aline Ourique por todo apoio, logística e disponibilidade em contribuir com nosso trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Camila Belmonte Oliveira, a oportunidade de tê-la como orientadora de Doutorado. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência. Você é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Todos que trabalham contigo admiram sua dedicação e amor ao trabalho, a pesquisa com os alunos e orientados. Enfim, vai muito além do que o dever impõe. Preocupada não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano. Aprendemos a trabalhar em grupo, a respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir. Seus orientados sabem que sempre terão uma amiga e um lugar onde encontrarão apoio e palavras de sabedoria. Muitíssimo obrigada!!! E que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade.

À minha coorientadora Profa. Dra. Nara Amélia da Rosa Farias, por me receber como aluna de mestrado e doutorado no seu laboratório. Obrigada pela confiança no meu trabalho, pelo respeito, por me ensinar, pela compreensão e pelos sábios conselhos sempre que a procurei para conversar, sempre me mostrando que eu era capaz e tinha condições de ir até o final. Eu realmente aprendi muito com você. Muitíssimo obrigada!!! E que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia e ao apoio financeiro da CAPES e FAPERGS, possibilitando a execução do projeto.

Muito Obrigada

Aprender é como remar contra a correnteza:

se para se retrocede.

(Edward Britten)

Resumo

Baccega, Bruna. Tricomoníase aviária: eficácia de óleos essenciais e nanoemulsões *in vitro* e *in vivo*. 2021. 1995f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A tricomoníase aviária é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trichomonas gallinae*. Este parasito acomete mais comumente filhotes, podendo ser responsável por surtos da doença em populações de aves. O tratamento para essa enfermidade é realizado com o metronidazol (MTZ). A utilização de óleos essenciais (OEs) de plantas representa uma fonte de potenciais princípios ativos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de óleos essenciais e nanoemulsões em atividade *in vitro* e *in vivo* sobre trofozoítos de *T. gallinae*. Para avaliar a susceptibilidade dos óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e manjerição (*Ocimum basilicum*) e suas respectivas nanoemulsões, foram utilizadas placas estéreis de 96 poços para incubar os trofozoítos com diferentes concentrações (de óleo ou trofozoíto?). Os parasitos foram semeados em uma densidade inicial de 1×10^6 trofozoítos/mL e incubados com os óleos e nanoemulsões. Quatro controles foram realizados: a) apenas os trofozoítos (controle negativo), b) trofozoítos mais metronidazol 100 μ M (como controle positivo, c) trofozoítos mais o veículo para solubilização dos derivados (Tween 0,01%) e d) nanoemulsão branca. Para a verificação da viabilidade dos trofozoítos foi observado a motilidade, morfologia e exclusão por corante Azul de Tripán (0,4%). A análise dos dados obtidos na triagem dos compostos mostrou que 1,5% de OE de *O. basilicum* e 1,25% de nanoemulsão reduziram em 100% a viabilidade dos trofozoítos em relação ao controle negativo. OE *E. globulus* nanoemulsão 1,5% e 2 % o óleo essencial. Os controles CN (meio de cultura e trofozoítos), TW (tween 0,01%) e NB (nanoemulsão branca) exibiram motilidade positiva e coloração negativa com azul de tripan, enquanto o controle MTZ reduziu a viabilidade do parasito em 100% após 24 horas de exposição. Os dados obtidos neste estudo indicam que os OEs e as nanoemulsões podem contribuir como agentes efetivos no controle das infecções por *T. gallinae*. O ensaio *in vitro* e *in vivo*, foi realizado com o óleo essencial (OE-CL) e nanoemulsão (N-CL) de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*). Os ensaios *in vitro* foram feitos com 1×10^6 trofozoítos/mL e OE-CL e N-CL nas concentrações: 110, 220, 330, 440, 550, 660, 770 e 880 μ g/ml e quatro controles: CN (meio de cultura e trofozoítos), MTZ (trofozoítos

mais 800 µg/ml de metronidazol), TW (trofozoítos mais veículos usados para solubilização de derivados (0,01% Tween) e NB (nanoemulsão em branco 880 µg/ml). O ensaio *in vivo* foi feito em 35 codornas (*Coturnix coturnix*) infectadas experimentalmente 4×10^4 trofozoítos mg/kg, foram divididos em sete grupos (n = 5): A (controle - saudável), B (controle infectado), C (controle TW 0,01%), D (NB 0,88 mg/kg), E (droga MTZ 25 mg/kg, F (OE-CL a 0,55 mg/kg) e G (N-CL a 0,44 mg/kg) e foram tratadas durante 7 dias consecutivos. O teste *in vitro* mostrou que as concentrações de OE-CL (550 µg/ml) e N-CL (440 µg/ml) reduziram a viabilidade dos trofozoítos em 100%. No teste *in vivo*, o tratamento com OE-CL foi eficaz no 4º dia de tratamento e o N-CL após o 3º dia, e o MTZ na concentração terapêutica foi eficaz no 7º dia. Para avaliar a citotoxicidade, atividade antioxidante e antiparasitária *in vitro* do citral (3,7-Dimetil-2,6-octadienal) e do geraniol (trans-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol), compostos majoritários do capim-limão, os ensaios *in vitro* foram realizados com 1×10^6 trofozoítos/mL e citral e geraniol nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µM, e quatro controles: CN (meio de cultura e trofozoítos), MTZ (trofozoítos mais 100 µM de metronidazol), TW (trofozoítos mais veículos usados para solubilização de derivados (0,01% Tween). No teste de citotoxicidade o citral promoveu a determinação de espécies reativas (ROS) e os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mostraram que o citral e o geraniol têm um antioxidante. A fim de mensurar o efeito *in vivo* do contato do óleo essencial e nanoemulsão de *Cymbopogon flexuosus* em codornas positivas, sobre determinação de parâmetros de estresse oxidativo, foram realizadas análise histológica de órgãos como fígado, rim e mucosas do sistema digestivo e análises bioquímicas. Os testes realizados para determinar os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e Superóxido dismutase (SOD) mostrou que óleo e a nanoemulsão possuem atividade antioxidante. Não foram observadas alterações histológicas nas aves infectadas na cavidade oral, fígado e rins, porém, apresentaram lesões no esôfago. Os dados obtidos neste estudo indicam que os OEs e as nanoemulsões podem contribuir como agentes efetivos no controle das infecções, também evidenciam o *C. flexuosus* como um potente agente anti-trichomonal natural e eficaz contra *T. gallinae*.

Palavras-chave: aves, antioxidante, citotoxicidade, fitoterapia, nanotecnologia.

Abstract

Baccega, Bruna. Avian trichomoniasis: effectiveness of essential oils and nanoemulsions *in vitro* and *in vivo*. 2021. 195f. Thesis (Doctor in Biological Sciences) – Postgraduate Program in Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Avian trichomoniasis is a parasitic disease caused by the protozoan *Trichomonas gallinae*. This parasite most commonly affects chicks and may be responsible for disease outbreaks in bird populations. The treatment for this disease is carried out with metronidazole (MTZ). The use of essential oils (EOs) from plants represents a source of potential active principles. In this context, this study aimed to evaluate the effectiveness of essential oils and nanoemulsions through *in vitro* and *in vivo* activities on *T. gallinae* trophozoites. To evaluate the susceptibility of essential oils of Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) and Basil (*Ocimum basilicum*) and their respective nanoemulsions, sterile 96-well-plates were used to incubate the trophozoites with different concentrations. The parasites were seed at an initial density of 1×10^6 trophozoites/mL and incubated with the oils and nanoemulsions. Four controls were performed: a) trophozoites only (negative control), b) trophozoites plus 100 μ M metronidazole (as a positive control) c) trophozoites plus the vehicle for solubilization of derivatives (0.01% Tween) and d) white nanoemulsion. To verify the viability of trophozoites, it was observed the motility, morphology and exclusion by Tripan Blue dye (0.4%). The data obtained by analysis of screening compounds showed that 1.5% of *O. basilicum* EO and 1.25% of nanoemulsion reduces 100% of trophozoite viability when compared to the negative control. EO *E. globulus* nanoemulsion 1.5% and 2% essential oil. Controls CN (negative control), TW (tween 0.01%) and NB (blank nanoemulsion) exhibited positive motility and negative staining with trypan blue, while the MTZ control reduced parasite viability by 100% after 24 hours of exposure. The data obtained in this study indicate that EOs and nanoemulsions can contribute as effective agents in the control of *T. gallinae* infections. *In vitro* and *in vivo* assay were realized with essential oil (EO-CL) and nanoemulsion (N-CL) of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *In vitro* assays were performed with 1×10^6 trophozoites/mL and EO-CL and N-CL at concentrations: 110, 220, 330, 440, 550, 660, 770 and 880 μ g/ml and four controls: CN (culture medium and trophozoites), MTZ (trophozoites plus 800 μ g/ml of metronidazole), TW (trophozoites plus vehicles used for solubilization of derivatives (0.01% Tween) and NB

(nanoemulsion blank 880 µg/ml). *In vivo* assay was carried out on 35 quails (*Coturnix coturnix*) experimentally infected with 4×10^4 trophozoites mg/kg and were divided into seven groups (n = 5): A (control - healthy), B (infected control), C (control TW 0.01%), D (NB 0.88 mg/kg), E (MTZ drug 25 mg/kg, F (OE-CL at 0.55 mg/kg) and G (N-CL at 0.44 mg/kg) and were treated for 7 consecutive days. *In vitro* test showed that concentrations of OE-CL (550 µg/ml) and N-CL (440 µg/ml) reduces 100% the of trophozoites viability. At *in vivo* test, OE-CL was effective on the 4th day of treatment and N-CL after the 3rd day, and MTZ at the therapeutic concentration was effective on the 7th day. To evaluate the *in vitro* cytotoxicity, antioxidant and antiparasitic activity of citral (3,7-Dimethyl-2,6-octadienal) and geraniol (trans-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol), majority compounds present in lemongrass, the *in vitro* assays were performed with 1×10^6 trophozoites/mL and citral and geraniol at concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 µM, and four controls: CN (culture medium and trophozoites), MTZ (trophozoites plus 100 µM metronidazole), TW (trophozoites plus vehicles used for solubilization of derivatives (0.01% Tween). In the cytotoxicity test, citral have promoted the determination of reactive oxygen species (ROS) and the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) showed that citral and geraniol have an antioxidant activity. *In vitro* test showed that concentrations of citral (60 µM) and geraniol (50 µM) reduced 100% of trophozoites viability. In the cytotoxicity test, geraniol did not cause effects and damage to VERO cells in 24 hours of time-dependent treatment, when compared to the control, the determination of the levels of ROS and TBARS showed that citral and geraniol have an antioxidant activity. The molecular docking experiment demonstrated that there may be a potential for citral and geraniol to inhibit a hydrogen of some crucial enzyme for the survival of *T. gallinae*. In order to measure the *in vivo* effect of essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* in positive quails, through determination of oxidative stress parameters, histological analysis of organs such as liver, kidney and digestive system mucosa and biochemical analyzes were performed. The tests realized to determine the levels of ROS, TBARS and Superoxide dismutase (SOD), showed that EOs and nanoemulsion has antioxidant activity. No histological changes were observed in birds infected in the oral cavity, liver and kidneys, however, they presented lesions in the esophagus.. The data obtained in this study indicate that EOs and nanoemulsions can contribute as effective agents in the control of infections, also showing *C. flexuosus* as a potent natural and effective anti-trichomonal agent against *T. gallinae*.

Keywords: birds, antioxidants, cytotoxicity, herbal medicine, nanotechnology.

Lista de Figuras

Figura 1	Morfologia <i>T. gallinae</i> .	30
Figura 2	Representação esquemática de <i>T. gallinae</i> na forma trofozoíto (a) e na forma de pseudocisto (b)	30
Figura 3	Morfologia dos trofozoítos de <i>T. gallinae</i> observada por microscopia eletrônica de varredura.	31
Figura 4	Distribuição geográfica de <i>Trichomonas gallinae</i> .	32
Figura 5	Esquema ilustrativo das vias de transmissão da tricomonose	34
Figura 6	Capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)	45
Figura 7	Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> .	47
Figura 8	Estrutura química do geranial e neral (citrал), componentes majoritários do óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	47
Figura 9	Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	49
Figura 10	Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	52

Lista de Tabelas Artigo 1

Table 1	Physical-chemical characterization of nanoemulsions.	62
Table 2	Anti-trichomonas activity in culture media of the formulations: essential oils and nanoemulsions in <i>Ocimum basilicum</i> and <i>Eucalyptus globulus</i> at concentrations of 0,25- 2%, as controls: CN (negative control), MTZ (metronidazole), TW (tween 80%) and NB (Blank nanoemulsion). The analyzes were evaluated at 24 hours post-treatment. The columns indicate the groups and * indicate the statistical difference when compared to the MTZ control by Tukey's test ($P < 0.05$).	62
Table 3	Time of death of <i>Trichomonas gallinae</i> after treatment with negative control group, metronidazole, tween 80, blank nanoemulsion, essential oil and nanoemulsion basil and eucalyptus, in the period of 0, 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h.	63

Lista de Tabelas Artigo 2

Table 1	Physical-chemical characterization of N-CL	88
---------	--	----

Lista de Tabelas Artigo 3

Table 1	Best docking results according to PLIP analysis of the residues involved in hydrophobic and hydrogen bonding.	127
Tabela 2	Predicted binding sites for ligands in COACH server and those described in UNIPROT, ranked by best prediction.	127
Tabela 3	Ligand binding affinity (kcal/mol) of the best results (pose 1) of different binding sites tested with Autodock Vina.	127
Tabela 4	Best docking results according to PLIP analysis of the residues involved in hydrophobic and hydrogen bonding.	127

Lista de Tabelas Artigo 4

Tabela 1	Parâmetros bioquímicos após tratamento de <i>Coturnix coturnix</i> com óleo essencial livre e nanoestruturado de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (média $\pm$ SD).	133
----------	--	-----

Lista de Figuras Artigo 2

- Figure 1 Phylogenetic analysis of the relationship based in ITS-1 rDNA 89
sequences between *Trichomonas gallinae*, *T. bixi*, *T. canistomae*,
T. tenax, *T. stableri* and *T. vaginalis*. Maximum likelihood tree (24
sequences and 336 sites). Bootstrap support (BS) was calculated
for each branch using Mega X. *Histomonas meleagris* was the
outgroup. Star indicates our isolate.
- Figure 2 Phylogenetic analysis of the relationship based in SSU rDNA 18S 90
sequences between *Trichomonas gallinae*, *T. bixi*, *T. canistomae*,
T. tenax, *T. stableri* and *T. vaginalis*. Neighbour-Joining tree (24
sequences and 336 sites). Bootstrap support (BS) was calculated
for each branch using Mega X. *Histomonas meleagris* was the
outgroup. Star indicates our isolate.
- Figure 3 Anti-trichomonas activity in culture medium of the formulations: 91
OE-CL and N-CL their respective at concentrations of 110 µg/mL
to 880 µg/ml, as controls: CN (negative control), MTZ
(metronidazole 880 µg/ml), (tween 0.01%) and NB (blank
nanoemulsion 880 µg/ml). The analyses were done at 24 hr post-
treatment. The columns indicate the groups and ***indicates the
statistical difference when compared to the MTZ control by
Tukey's test ($p < 0.05$).
- Figure 4 Death time of *T. gallinae* after treatment with negative control 92
group, blank nanoemulsion control, OE-CL and N-CL, in the
period of 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hr.
- Figure 5 Death time of *T. gallinae* after treatment with the control groups 92
and treatment groups with the standard drug, as well as, the OE-
CL and N-CL in the period of 0.1. 2. 3. 4. 5. 6. 7 days.

Lista de Figuras Artigo 3

- Figure 1 Anti-Trichomonas activity in culture medium of the formulation of the major compounds (citral and geraniol) at concentrations from 10 to 100 μ M, as controls: NC (negative control), MTZ (metronidazole 100 μ M), DMSO (diluent 0.6%). The analyses were evaluated 24 hours after treatment. The columns indicate the groups and * indicate the statistical difference when compared to the MTZ control by the Tukey test ($P < 0.05$). 122
- Figure 2 Time of death of *Trichomonas gallinae* after treatment with the control groups, treatment groups with the standard drug, as well as citral and geraniol in the period of 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h. 124
- Figure 3 Lipid peroxidation levels immediately of exposure to citral (60 μ M) (A), and to geraniol (50 μ M) (C), and after 24 h of exposure to citral (60 μ M) (B) and geraniol (50 μ M) (D). Nos gráficos também estão expressos os grupos, Control (untreated trophozoites), DMSO (vehicle), MTZ (metronidazole at 100 μ M). Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n= 3-4). * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ when compared with control group. 125
- Figure 4 Reactive species levels immediately of exposure to citral (60 μ M) (A), and to geraniol (50 μ M) (B), and after 24 h of exposure to citral (60 μ M) (C) and geraniol (50 μ M) (D). Control (untreated trophozoites), DMSO (vehicle), MTZ (metronidazole at 0,171 μ g/mL). Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n= 3-4). * $P < 0.05$ when compared with control group. 126

Lista de Figuras Artigo 4

- Figure 1 1- esôfago. Animal controle. Ácinos mucosos (*). Ducto glandular (seta). Luz do órgão (L). HE. 100X. 2- esôfago. Animal inoculado com trofozoítos. Infiltrado inflamatório focal de células mononucleares em ácino mucoso (cabeça de seta). Ácinos mucosos (*). Ducto glandular (seta). Luz do órgão (L). HE. 100X. 3- esôfago. Animal inoculado com trofozoítos e tratado com óleo 135

essencial. Extensa área de infiltrado inflamatório de células mononucleares (cabeça de seta). Ácinos mucosos (*). Luz do órgão (L). HE. 100X. 4- esôfago. Animal inoculado com trofozoítos e tratado com nanoemulsão óleo essencial. Área focalmente extensiva de infiltrado inflamatório de células mononucleares em ácinos mucosos. Luz do órgão (L). Ácinos mucosos (*). HE. 100X.

Figure 2 Níveis de espécies reativas (TBARS, ROS, SOD) em exposição ao 137
 óleo essencial *Cymbopogon flexuosus* (0,090 µg/ml), e nanoemulsão em fígado, rim e plasma de codornas positivas para *Trichomonas gallinae*. Controle negativo (trofozoítos não tratados), CS (controle sadio), TW (veículo 0.01%), MTZ (metronidazol 25mg/kg), NB (nanoemulsão branca 0,88 mg/kg) OE (óleo essencial *Cymbopogon flexuosus* 0,55 mg/kg) e NANO (nanoemulsão *Cymbopogon flexuosus* 0,44 mg/kg). Os dados são expressos como média ± SEM (n = 5). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle.

Lista de Abreviaturas

ALT Alanina Aminotransferase

AST Aspartato Aminotransferase

BLASTp- Basic Local Alignment Search Tool

CREA Creatinina

DCF Fluorescent dichlorofluorescein

DCF-DA Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate

DMSO Dimetilsulfóxido

GGT Gama glutamil transferase

HE hematoxilina-eosina

IC₅₀ Metade da Concentração Inibitória Máxima

IgA Imunoglobulina A

MIC Minimum Inhibitory Concentration

MTT (3-(4,5) -dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio)

MTZ Metronidazol

NB Blank nanoemulsion

NC controle negativo

N-CL Namoesulsion lemon grass

OE Óleo essencial

OE-CL Essential oil lemon grass

OEs Essential oils

RMSD Root mean square deviation

ROS Reactive species

SBA Adult bovine serum

SDS Dodecyl sulfate

SOD Superóxido dismutase

TBARS Substâncias reativas ao ácido 2- tiobarbitúrico

TW Tween

TYM trypticase–yeast extract–maltose

UFN Universidade Franciscana

U Units

URE Ureia

Sumário

1	Introdução.....	23
2	Objetivos.....	26
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivos Específicos.....	26
3	Revisão de Literatura.....	28
3.1	História	28
3.2	Classificação taxonômica	28
3.3	Morfologia.....	29
3.4	Distribuição.....	31
3.5	Epidemiologia.....	32
3.6	Transmissão.....	33
3.7	Patologia.....	34
3.8	Sinais clínicos.....	35
3.9	Diagnóstico.....	36
3.10	Imunidade.....	37
3.11	Impacto na saúde dos animais domésticos.....	38
3.12	Impacto na população silvestres.....	38
3.13	Tratamento.....	39
3.14	Controle.....	41
3.15	Óleos essenciais livres	41
3.16	Óleos essenciais nanoestruturados.....	43
3.17	Óleos essenciais com atividade anti- <i>trichomonas</i>	44

3.18	Óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	44
3.19	Óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	48
3.20	Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	51
4	Artigos.....	53
4.1	Artigo 1.....	54
	Abstract.....	55
	Resumo	56
	Introduction.....	56
	Material and Methods.....	57
	Results	61
	Discussion	64
	Conclusion.....	68
	References.....	69
4.2	Artigo 2.....	75
	Abstract	76
	Introduction.....	77
	Material and Methods	77
	Results	80
	Discussion	81
	References	83
4.3	Artigo 3	93
	Abstract	97
	Introduction.....	96

	Material and Methods.....	98
	Results	102
	Discussion.....	105
	References.....	110
4.4	Artigo 4.....	128
	Resumo	129
	Introdução	130
	Material e Métodos	131
	Resultados.....	132
	Discussão.....	138
	Conclusão.....	140
	Referências	141
5	Conclusões gerais	146
	Referências Bibliográficas	158
	Anexos.....	192
	Anexo I.....	193
	Anexo II.....	194
	Anexo III.....	195

Introdução

Trichomonas gallinae (RIVOLTA, 1878) é um protozoário flagelado, que parasita uma ampla variedade de aves, sendo *Columba livia* (pombo doméstico) seu hospedeiro primário (STABLER, 1951; LOCKE & JAMES, 1962).

O parasito está localizado no aparelho digestivo superior e, ocasionalmente, no trato respiratório de uma grande variedade de aves, principalmente na ordem Columbiformes e Falconiformes (BOAL *et al.*, 1998; ROUFFAER *et al.*, 2014). Porém, alguns são capazes de atingir as vísceras e o sistema nervoso central (BONDURANT & HONIGBERG, 1994). A tricomoníase aviária manifesta-se geralmente como uma lesão no trato digestivo anterior das aves afetadas. As lesões variam de infecções leves, muitas vezes subclínicas, até inflamação grave, que pode ser aguda e fatal, devido à obstrução do lúmen do esôfago (GERHOLD *et al.*, 2007).

Surtos da doença resultaram em ampla mortalidade, principalmente em populações reprodutoras (ROBINSON *et al.*, 2010; LAWSON *et al.*, 2011). A frequência da infecção e a mortalidade em pombos podem variar de 30 a 100% (TASCA & DE CARLI, 2006). Esse protozoário flagelado, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo observados na Inglaterra (COOPER & PETTY, 1988), África do Sul (PEPLER & OTTLE, 1992), Austrália (MCKEON *et al.*, 1997), Estados Unidos (ROSENFELD *et al.*, 2002), Alemanha (KRONE *et al.*, 2005) e Brasil (TASCA & DE CARLI, 1999). Além disso, gera impactos na economia da avicultura, especialmente na criação e reprodução de pombos e aves de caça (STOCKDALE *et al.*, 2015) e pode causar declínio em populações aviárias na natureza (LAWSON *et al.*, 2018).

Os fármacos de escolha para o tratamento da tricomoníase são os nitroimidazóis. Entretanto, cada vez mais se tem observado um crescente interesse na investigação de plantas como fontes de compostos capazes de diminuir os efeitos negativos de substâncias oxidantes, radicais livres e micro-organismos (bactérias, vírus, parasitos), que causam prejuízos tanto para a indústria, agricultura e para a saúde humana.

Entre os compostos de origem vegetal, destacam-se os óleos essenciais, extraídos a partir de folhas e ramos vegetativos, sendo utilizados por suas propriedades medicianais, reconhecidos há décadas. As atividades medicinais - antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-protozoária e anti-inflamatória, tem sido reportada (CARSON *et al.*, 2006; HAMMER *et al.*, 2006).

Pesquisas com novas moléculas e novos métodos de tratamento tem sido incentivada, destacando-se o uso de óleos essenciais, sendo muito promissor no Brasil, devido à grande diversidade vegetal existente (CARVALHO, 2005; KLEIN *et al.*, 2009). Tem-se observado grande atividade antiparasitária dos óleos voláteis em teste *in vitro*, tornando-se substâncias potenciais para o desenvolvimento de novas drogas (Tabari *et al.*, 2017, Youseffi *et al.*, 2017).

Dentre as plantas que podem ter potencial terapêutico estão: o manjeriço (*Ocimum basilicum*) uma planta perene, pertencente à família Lamiaceae que possui atividade repelente, fungicida, a no antiespasmódico, anti-inflamatório e calmante (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2000; PADILHA *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006).

Segundo Liu *et al.* (2008) e Kumar *et al.* (2012) O óleo de eucalipto apresenta diversas propriedades de bioativos com efeitos antioxidantes, antimicrobianos, inseticidas, antibacterianos e fungicidas foram observados para óleos essenciais produzidos por eucalipto

O capim-limão apresenta um grande uso popular no Brasil, como sedativo, sudorífero, carminativo, diurético, antipirético e antirreumático. Também é utilizado de forma caseira para combater afecções das vias respiratórias e digestivas (FIGUEIREDO & DELACHIAVE, 2002).

Em sua composição química, o citral é o seu constituinte principal, seguido por outros compostos, como o mirceno (COSTA *et al.*, 2005). O citral, constituinte majoritário do óleo desta planta, é citado por vários autores, devido a suas atividades germicidas, repelentes de insetos, (MARTINS *et al.*, 2002). ação antifúngicas e bacterianas (NAIK *et al.*, 2010 ; SHI *et al.*, 2017).

Associada à produção de compostos, está a nanotecnologia que vem sendo empregada em diversas áreas, inclusive na biologia e medicina humana e veterinária (RIBOLDI, 2009; FURLANETTO, 2011). Esta tecnologia tem como objetivos a prevenção, o diagnóstico, e o tratamento de enfermidades dos seres vivos,

desenvolvimento novos sistemas de liberação de fármacos em sítios específicos e elementos de diagnóstico, biosensores e técnicas (VILLAFUERTE-ROBLES, 2008).

O uso de sistemas nanoestruturados tem o potencial de liberar o fármaco em alvos específicos fornecendo inúmeras vantagens, tais como: a solubilidade aumentada, a resistência às enzimas gástricas, o controle de liberação ou vetorização de agentes ativos (ZANETTI-RAMOS & RACZYNSKI-PASA, 2008). O desenvolvimento nano tecnológico de novas formulações visa corrigir problemas inerentes às propriedades físico-químicas de muitas moléculas terapêuticas que possuem baixa solubilidade, baixa permeabilidade na parede do epitélio intestinal, suscetibilidade à degradação enzimática e não enzimática melhorando a biodistribuição e metabolização dos fármacos (DEVALA PAULY *et al.*, 2007).

Na área farmacêutica, o processo de encapsulamento é utilizado principalmente para aumentar a estabilidade de uma droga ou para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos de ação no organismo humano (RÉ, 2000).

Dessa forma, o objetivo deste projeto é avaliar óleos essenciais de manjerição, capim-limão e eucalipto, como novos compostos não citotóxicos e farmacologicamente ativos *in vivo* e *in vitro* sobre *T. gallinae*, a partir de óleos essenciais nanoestruturados.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais e nanoemulsões sobre o flagelado *Trichomonas gallinae*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade tricomonicida dos óleos essenciais e nanoemulsões de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) e *Ocimum basilicum* (manjerição), em diferentes concentrações, determinando a concentração inibitória mínima (MIC) e a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀);
- Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) contra *T. gallinae*, com a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀);
- Confirmar a posição filogenética do isolado de *T. gallinae* em relação a outros membros do grupo;
- Avaliar a atividade tricomonicida do composto majoritário citral e geraniol sobre *T. galinae* em diferentes concentrações com a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀);
- Avaliar a atividade antioxidante do citral e do geraniol *in vitro* através da detecção dos níveis de óxido nítrico, TBARS e ROS sobre o flagelado *Trichomonas gallinae*;
- Investigar a força de ligação do citral e geraniol às proteínas presentes no *Trichomonas gallinae* através do docking molecular;

- Avaliar a citotoxicidade do composto citral e geraniol em cultivo de células VERO.
- Verificar a patogenicidade dos produtos testados para o hospedeiro, através de análise histológica de órgãos como fígado, rim e mucosas do sistema digestivo, análises bioquímicas, estresse oxidativo TBARS, ROS, SOD.

3. Revisão bibliográfica

3.1 História

A tricomoníase é a mais antiga enfermidade da vida selvagem que se encontra documentada. Alguns anos antes da descoberta do agente etiológico, já existiam descrições de lesões em aves de rapina. (FORRESTER & FOSTER, 2009). Porém, o agente etiológico só foi descoberto em 1878, por Rivolta, que descreveu o organismo retirado do trato digestivo superior e do fígado, de pombos (*Columba livia*). Inicialmente foram chamados de *Cercomonas gallinae* e *Cercomonas hepaticum*, respectivamente. Segundo Forrester e Foster (2009) após estudos sobre a classificação do parasito, foram reconhecidos como *Trichomonas gallinae* (SILVA *et al.*, 2017).

3.2 Classificações taxonômicas

, *Trichomonas gallinae* é um organismo eucariota, pertence ao Reino Protista, Filo Parabasalia, Classe Trichomonadea, Ordem Trichomonadida, Família Trichomonadidae, Gênero *Trichomonas* e Espécie *T. gallinae* (Fig. 1) (URQUHART *et al.*, 1996; GASPAR DA SILVA *et al.*, 2007; CEPICKA *et al.* 2010).

A classificação do Filo Protozoa é bastante complexa e assenta essencialmente nas diferenças básicas na estrutura e ciclo evolutivo dos principais sub-filos (URQUHART *et al.*, 1996; CEPICKA *et al.* 2010; SILVA *et al.*, 2017).

Reino Protista

Filo Parabasalia

Classe Trichomonadea

Ordem Trichomonadida

Família Trichomonadidae

Gênero *Trichomonas*

Espécie *Trichomonas gallinae*

3.3 Morfologia

O protozoário flagelado *T. gallinae*, apresenta a forma trofozoíta elipsoidal alongada, medindo de 12,5 a 20,0 μM . O trofozoíto na sua porção anterior apresenta quatro flagelos, originados do complexo citossomal. Estes flagelos servem, principalmente, para a locomoção do protozoário (URQUHART ET. AL., 1996; FORRESTER & FOSTER, 2009). Sua membrana ondulante possui bordas livres e é delimitada por um flagelo recorrente, sendo a estrutura responsável pela locomoção do parasito, juntamente com os flagelos. Seu axóstilo apresenta uma estrutura mais rígida, atravessando longitudinalmente o parasito, até a extremidade posterior. O parasito não apresenta mitocôndrias e os hidrogenossomos são as organelas responsáveis pela sua energia. Seu núcleo pode apresentar-se oval ou elipsóide, com grânulos de cromatina distribuídos uniformemente com a presença de um único nucléolo (BONDURANT & HONIBERG, 1994; DE CARLI et al., 2004, SILVA *et al.*, 2017) (Figura 2A). Nos últimos anos, veem sendo descrito na literatura outro estágio do protozoário, conhecido como pseudocisto (Fig. 2B e 3) (FORRESTER & FOSTER, 2009). Estes se comportam como uma forma resistente as condições que o seu meio ambiente oferece, como mudanças de temperatura, stress, falta alimento, desidratação (FORRESTER & FOSTER, 2009).

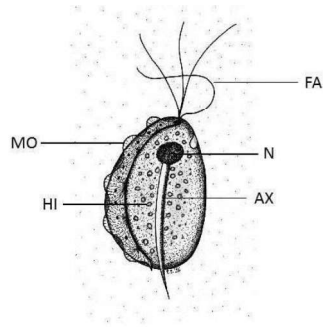


Figura 1- Morfologia *T. gallinae*. FA (flagelo anterior), N (núcleo), MO (membrana ondulante), AX (axóstilo), HI (hidrogenossomos).

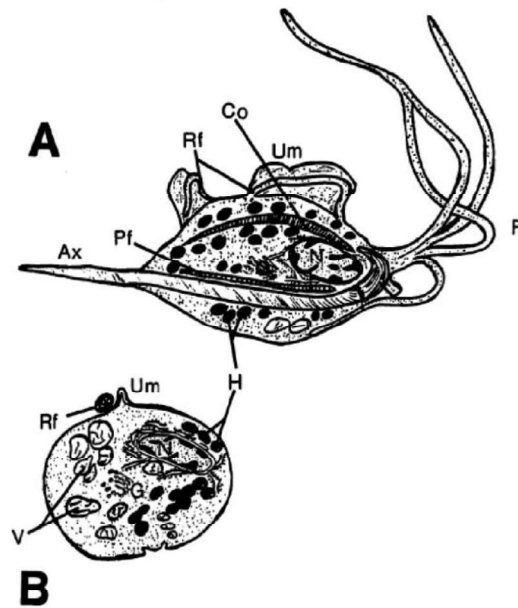


Figura 2— Representação esquemática de *Trichomonas gallinae* na forma trofozoíta (A) e na forma de pseudocisto (B). Ax – axóstilo, Co – costa; F – flagelos anteriores; H – hidrogenossomos (grânulos para costais e paraxostilares); Pf – filamento parabasal; Rf – flagelo recorrente; Um – membrana ondulante; V – vacúolos ligados à membrana.

Fonte: KIETZMANN (1988).

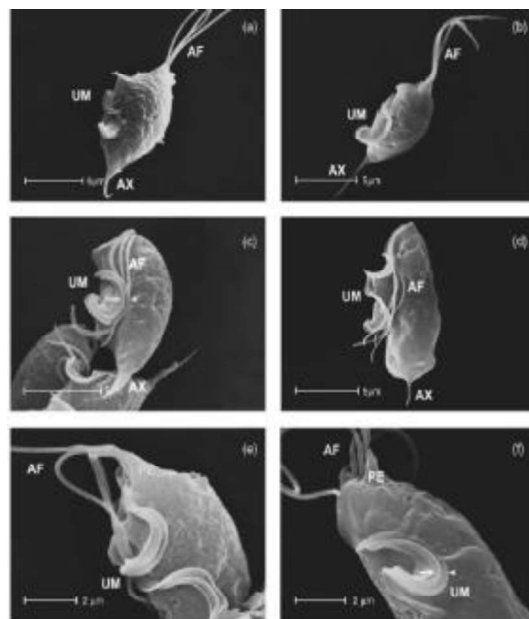


Figura 3- Morfologia dos trofozoítos de *T. gallinae* observada por microscopia eletrônica de varredura. Trofozoítos de *T. gallinae* (AF: flagelo anterior, UM: membrana ondulante, AX: axóstilo, PE pelta). As partes (C) e (F) mostram o filamento acessório e o flagelo recorrente.

Fonte :TASCA E DE CARLI, 2003.

3.4 Distribuição

A tricomonose aviária possui distribuição cosmopolita, não ocorrendo na Antártica e Groenlândia. Sabe-se que ocorre em animais em cativeiro e animais silvestres, e que a sua distribuição está relacionada com *Columba livia*, reservatório da doença (BUNBURY *et al.*, 2007; FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017) (Fig. 5)

Trichomonas gallinae parasito comum encontrado em amplas variedades de aves, como: pombos, pardais, cardeais, codornas, papagaios, pássaros domésticos, galinhas, perus, sendo que em perus. Sendo um grande causador de perdas econômicas (BONDURANT E HONIGBERG, 1994; SILVA *et al.*, 2017).

A infecção pode ocorrer em qualquer época do ano, mas a maioria dos surtos é descrita no fim da primavera, durante o verão e outono (BUNBURY *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2017).

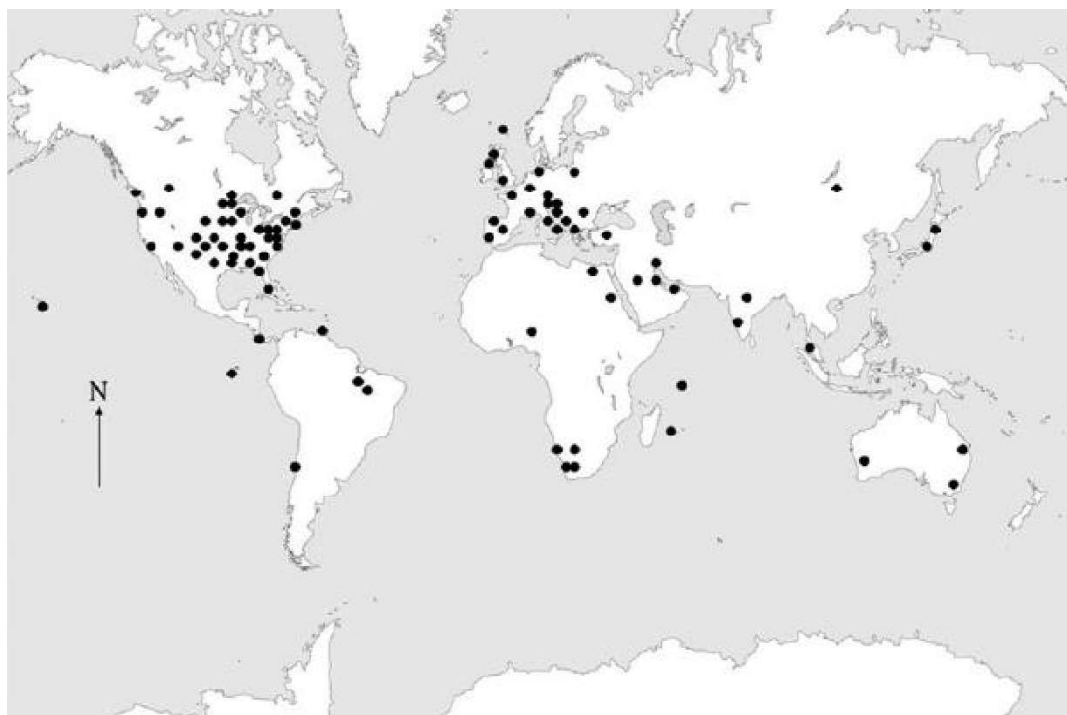


Figura 4- Distribuição geográfica de *Trichomonas gallinae*. Os pontos indicam áreas onde foram descritas infecções, tanto em aves de cativeiro como em aves de vida livre

Fonte: FORRESTER & FOSTER, 2009.

3.5 Epidemiologia

A tricomonose ocorre de forma comum nos Columbiformes e em aves de rapina, sobretudo nos falconídeos e outras aves ornitófas (SANSANO *et al.*, 2007). Na literatura há relatos que ocorrem em espécies de Columbiformes, Falconiformes, Strigiformes, Psittaciformes, Passeriformes, Galiformes, Gruiformes e Anseriformes (BUNBURY *et al.*, 2007; FORRESTER & FOSTER, 2009; SANSANO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2017).

As aves infectadas disseminam-no nos comedouros e bebedouros de forma direta (SILVA, 2017). Considerando que *Columba livia* é o reservatório do parasita, este afeta, principalmente, aves jovens e pode ser fatal nos quatro a 18 dias após a infecção (COLE, 1999; TASCA & DE CARLI, 2006; SILVA *et al.*, 2017).

A cada ano tem-se observado um aumento do número de animais parasitados, abrangendo Columbiformes, aves de rapina, fringílídeos, entre outros (SANSANO *et al.*, 2007). Estes dados tornam-se preocupantes na medida em que serão necessárias mais investigações para se concluir se o parasita está a adaptar-se a outras espécies ou

se, neste momento, existem estirpes, não identificadas, específicas de hospedeiro (SILVA *et al.*, 2017).

3.6 Transmissão

O ciclo de vida do protozoário é direto (COOPER, 2002). A transmissão direta entre aves adultas e crias ocorre principalmente durante a alimentação, sobretudo por regurgitação, através dos comportamentos de corte, por contato direto entre animais infectados e sãos durante a alimentação, por ingestão de água contaminada e através de fômites como, por exemplo, instrumentos utilizados para a alimentação e bebedouros ou mesmo pela ingestão de aves mortas infectadas, no caso de aves ornitófagas (Figura 6) (FORRESTER & FOSTER, 2009; COLE, 1999; COOPER, 2002). O surgimento, a extensão e a gravidade da doença dependem, não só da estirpe do parasita, como também, da idade e do sistema imunitário do indivíduo, ou seja, animais imunocomprometidos são mais suscetíveis a desenvolver a doença (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

O período de incubação é de quatro a 14 dias e o parasita consegue sobreviver, pelo menos, cinco dias em alimentos, normalmente em grãos e carcaças de aves mortas, entre 20 minutos a várias horas na água, sendo extremamente sensível ao calor e à desidratação (COLE, 1999; SILVA *et al.*, 2017).

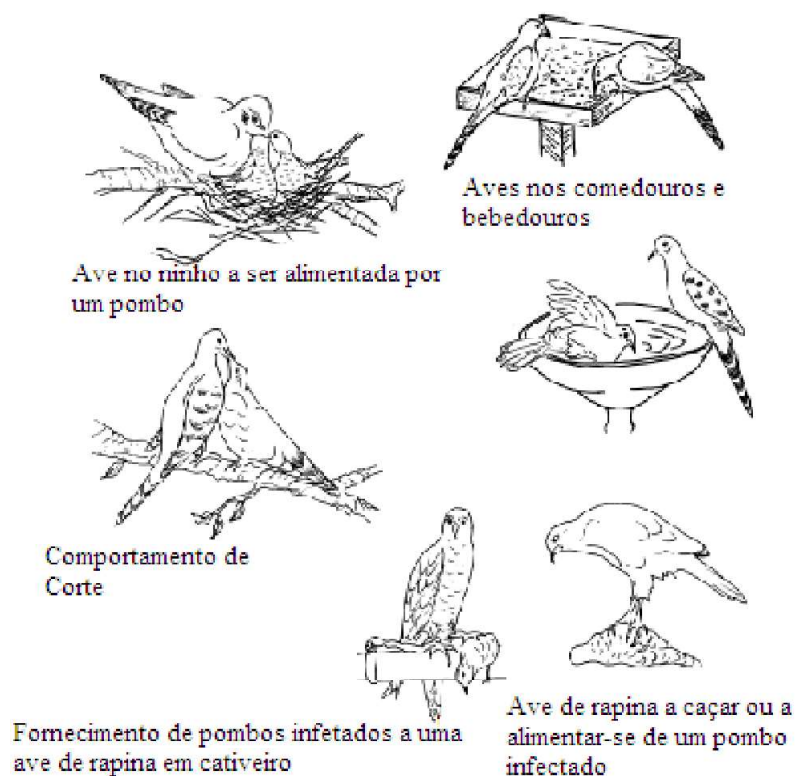


Figura 5- Esquema ilustrativo das vias de transmissão da tricomonose

Fonte: FORRESTER & FOSTER, 2009).

3.7 Patologia

Uma vez infectada a ave pode permanecer com a infecção por um período longo de até dois anos (BONDURANT E HONIGBERG, 1994). Os sítios de lesões mais comuns por este protozoário flagelado são: boca, faringe, esôfago e o papo. Porém, a maioria dos isolados não abandona o trato digestivo superior (SILVA *et al.*, 2017).

O parasito, inicialmente, provoca a formação de úlceras de cor branca, úmidas, com a presença de exsudato na mucosa. Quando as lesões se apresentam de forma crônica, se tornam amareladas, maiores, o parasita pode penetrar nos olhos, crânio, atingir o sistema circulatório, causando necrose no fígado, baço, pâncreas, coração, sacos aéreos e pulmões (BONDURANT E HONIGBERG, 1994; SILVA *et al.*, 2017).

A virulência dos isolados de *T. gallinae* pode variar e a expressão deste patógeno depende do estado imunológico do seu hospedeiro (BONDURANT E HONIGBERG, 1994; SILVA *et al.*, 2017).

Infeções com estirpes menos patogênicas resultam em hipersialia e alguma inflamação da cavidade oral e garganta, contrastando com as infecções provocadas por

estirpes mais virulentas. Algumas estirpes extremamente virulentas causam lesões apenas no crânio, pescoço e papo, mas outras são capazes de invadir órgãos internos como o fígado, pulmões e sacos aéreos, pericárdio e pâncreas através da circulação sanguínea (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

Em casos graves, a morte pode ocorrer em até quatro dias após a infecção. A progressão da doença foi descrita da seguinte forma: as lesões, inicialmente, podem ser pequenas e ruborizadas (*flush*), podendo desenvolver mais tarde projeções no seu centro que coalescem formando massas grandes e caseosas na cavidade oral e/ou na região faríngea (FORRESTER & FOSTER, 2009). Estas massas podem bloquear completamente a passagem de alimento levando a uma emaciação do indivíduo e morte por inanição. No entanto, a morte pode ocorrer também como resultado de uma falência respiratória, caso a lesão esteja a bloquear a traqueia ou por disfunção hepática se os organismos invadirem o fígado (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

Os pulmões e outros órgãos podem ser afetados se a infecção for devido a uma estirpe altamente virulenta. Os fatores inerentes ao hospedeiro (espécie, idade, estado imunitário), podem ser mais assertivos na determinação de quais os órgãos são serão afetados com a doença, do que as características inerentes ao agente etiológico. Por exemplo, a estirpe JB de *Trichomonas gallinae*, altamente patogênica, invade o fígado dos pombos-das-rochas (*Columba livia*); por sua vez a mesma estirpe, quando infeta outras espécies como a Rola-carpideira (*Zenaida macroura*) invade preferencialmente os pulmões (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

Foram estudadas as alterações histopatológicas associadas a infecções por estirpes altamente virulentas de *Trichomonas gallinae*, estirpes JB e a Eiberg, em Pombos-das-rochas, tendo sido concluído que o tempo requerido para que os parasitas atingissem o fígado e causasse a morte seria entre três a dez dias após infecção, para a estirpe JB e entre sete a 17 dias após infecção para a estirpe Eiberg (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017). Durante o estudo, algumas aves morreram entre o quinto e o décimo dia após a infecção. A resposta patológica dos Pombos-das-rochas, infetados com a estirpe JB, foi descrita como uma inflamação purulenta. Mais tarde, concluiu-se que estes indivíduos morreram devido a uma destruição hepática massiva (FORRESTER & FOSTER, 2009. ; SILVA *et al.*, 2017).

3.8 Sinais clínicos

As aves infectadas apresentam uma grande variedade de sintomas, devido ao *T. gallinae*. Contudo, algumas se destacam como: apatia, salivação em excesso, dificuldades em fechar o bico, respiração ofegante, dificuldades para se alimentar e beber água, diarreia, odor fétido no bico e inchaço do papo. Essas aves geralmente morrem devido à sufocação devido ao bloqueio da lesão na traqueia (TASCA E DE CARLI, 2006). Os principais sinais clínicos estão relacionados com lesões orais que impedem ou impossibilitam a alimentação e, por vezes, a respiração, influenciando no ganho de peso, ausência de *grooming* causando um mau estado da plumagem (FORRESTER & FOSTER, 2009; ; SILVA *et al.*, 2017).

Em fases mais agudas pode-se observar o desenvolvimento de lesões do tipo proliferativas, por vezes caseosas e/ou fibras necróticas da orofaringe e do aparelho digestivo superior das aves, em especial do papo e esôfago, podendo também, localizar-se ao redor do bico e olhos, conferindo à face um aspecto inchado (COLE, 1999). Por vezes, associado a estes sinais, pode ocorrer hipersíalia (FORRESTER & FOSTER, 2009; ; SILVA *et al.*, 2017).

Os indivíduos afetados podem, no entanto, apresentar sinais inespecíficos como depressão, diarreia, anorexia, dispneia, disfagia e regurgitação resultantes da formação de placas no trato digestivo superior ou mesmo, inflamações do papo (FORZÁN *et al.*, 2010; SILVA 2017).

Numa fase crônica da doença estas lesões podem infiltrar-se no crânio e ossos do bico, atingindo o encéfalo e eventualmente, atingir as vísceras como o fígado, baço, pâncreas, coração, pulmões e sacos aéreos, provocando necrose nesses locais (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

3.9 Diagnóstico

O diagnóstico para este parasito, não é tão fácil devido a semelhança entre às lesões por tricomoniase e as lesões causadas por outros parasitos. Portanto, o diagnóstico definitivo ocorre através da identificação do parasito, via microscópio ou através do meio de cultura (SAUMOR *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2017).

Para a coleta do material são utilizados *swab*, o qual é introduzido na garganta do animal. O material coletado deve ser imediatamente imerso em solução de cloreto de sódio glicosada e observada a fresco, entre lâmina e lamínula, e o restante do material

coletado deve ser inoculado em meio de cultura TYM (*trypticase-yeast extract-maltose*) (DIAMOND, 1957; SILVA *et al.*, 2017).

È feito apenas o exame direto? Identificação morfológica através da citologia? Contagem dos flagelos? Sobre a inoculação: qual tempo, temperatura? Repiques?

A identificação definitiva do parasita é conseguida através da amplificação do seu DNA, por PCR (FORRESTER & FOSTER, 2009), limitada pelo escasso conhecimento genético do parasita. Alguns autores desenvolveram outras técnicas laboratoriais para identificação do parasita, tal como a hibridação *in-situ*, no entanto esta técnica não consegue diferenciar *Histomonas meleagridis* de *Trichomonas gallinae* e *TetraTrichomonas gallinarum* (LIEBHART *et al.*, 2006; MOSTEGL *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2017).

3.10 Imunidade

As aves infectadas com estirpes moderadamente virulentas e avirulentas de *T. gallinae* têm uma forte proteção contra os efeitos patológicos de uma infecção subsequente por uma estirpe virulenta (FORRESTER & FOSTER, 2009). Esta imunidade está associada tanto a componente humoral como celular. A fagocitose dos parasitas parece ser suficiente para deter a doença em infecções primárias que envolvem estirpes avirulentas ou moderadamente virulentas, mas o mesmo não se verifica quando a infeção é mediada por estirpes extremamente virulentas. O papel exato da fagocitose em aves imunes não é conhecido (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017). Os anticorpos podem ser mais importantes e têm demonstrado que conferem proteção. Foi demonstrado, ainda, que a imunoglobulina A (IgA), encontrada no leite de pombo, é, também, transferida para a circulação sanguínea das aves jovens, provavelmente por pinocitose. Pensa-se que a IgA pode representar um papel importante na transferência da imunidade para *T. gallinae*, mas tal hipótese ainda não foi investigada (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

Estudos experimentais, que envolveram a indução da resistência à infecção subcutânea com *T. gallinae*, conduzidos em ratos de laboratório, resultaram em confirmações adicionais de que ocorre proteção imunitária (WARREN *et al.*, 1961).

WARREN *et al.* (1961) concluíram que ocorreu proteção imunitária total face à infeção com *Trichomonas gallinae* em 50% dos animais testados.

STABLER (1954) referiu que a imunidade diminui gradualmente após o término da infecção, mas não publicou dados para comprovar esta citação (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

Pouco foi publicado sobre a imunidade para além do que os autores supracitados investigaram e publicaram; no entanto, existem estudos sobre organismos da mesma família, tais como *Tritrichomonas foetus* em gado bovino e *Trichomonas vaginalis* em humanos, que podem oferecer novas perspectivas em relação aos aspectos imunológicos e da infecção em relação à doença em questão (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

3.11 Impacto na saúde dos animais

Não existem dados referentes a tricomonose e/ou infecções com *Trichomonas gallinae* em aves de capoeira. No entanto, ocasionalmente, são observadas tais infecções em perus e galinhas, sendo que, nos perus, são, ainda, mais raras (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

Existem, também, alguns registos de infecções em Psitacíformes mantidos como animais de cativeiro, pensando-se que possam ter sido originadas a partir de Pombos-das-rochas ou outros Columbiformes (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

3.12 Impacto na população silvestre

A tricomonose tem um efeito negativo no hospedeiro, mas, tal como muitas doenças que afetam populações silvestres, o impacto a nível da população é difícil de medir (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

Estima-se que a razão pela qual a população de aves silvestres é afetada pela tricomonose seja pela concentração destes animais em comedouros/bebedouros, também frequentados pelos animais que transportam a doença, principalmente Columbiformes, especialmente a Rola-turca (*Streptopelia decaocto*). Outra explicação possível para este aumento de tricomonose é o aumento do número de Columbiformes em áreas urbanas e suburbanas, havendo, possivelmente, uma disseminação da tricomonose nesses locais (SILVA *et al.*, 2017).

Pombos-torcazes comuns (*Columba palumbus*) infectados com uma estirpe não patogênica de *T. gallinae* não apresentavam lesões, mas apresentavam níveis baixos de massa corporal e reservas de gordura (VILLANÚA *et. al.*, 2006). Os autores concluíram que, embora não sendo fatal para estes indivíduos, esses efeitos poderiam levar a uma elevada suscetibilidade à predação ou outras doenças e, consequentemente, exercer um impacto negativo na população. Adicionalmente, os autores afirmaram que o aumento da suscetibilidade de indivíduos infectados à predação iria tornar-se um risco elevado de exposição das aves de rapina à infecção por *T. gallinae* (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

O efeito da tricomonose em populações de Falcões peregrinos (*Falco peregrinus*), que se alimentavam de Columbiformes, foi avaliado, tendo sido concluído que, apesar de existir evidência que alguns falcões e outras aves de rapina estavam infectados com a doença, o impacto na população era negligenciável (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

3.13 Tratamento

Nos dias atuais, o tratamento somente é viável em pássaros de cativeiros. Onde os fármacos utilizados requerem administração de uso oral forçado, ou na água e alimentação.

Os medicamentos anti-protozoários utilizados são o dimetridazol, metronidazol, sulfato de cobre, compostos de amônia, carnidazol e amino nitrotiazol.

O dimetridazol pode ser tóxico para as aves (FORRESTER & FOSTER, 2009), tendo este efeito sido notado pela redução no número de populações de frangos e perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*), no estudo acima descrito (VILLANÚA *et. al.*, 2006). Em contraste, o carnidazol, o ronidazol e o dimetridazol foram utilizados, com sucesso limitado, no tratamento de uma subpopulação de Pombos-cor-de-rosa (*Columba mayeri*), nas ilhas Maurícias, aumentando com sucesso a sobrevivência de recém-nascidos, juvenis e adultos (FORRESTER & FOSTER, 2009). Neste programa de recuperação para os Pombos-cor-de-rosa (*Columba mayeri*), nas ilhas Maurícias, concluiu-se que a sobrevivência dos recém-nascidos aumentava, até 30 dias, quando tratados com Carnidazol (FORRESTER & FOSTER, 2009); no entanto, o tratamento

não tinha o mesmo efeito na sobrevivência até aos 150 dias de vida (SILVA *et al.*, 2017).

O tratamento mais eficaz consiste em administrar fármacos do grupo dos nitroimidazóis, sendo que os mais utilizados são o metronidazol, o dimetridazol e o carnidazol. O metronidazol é o mais utilizado devido à sua elevada eficácia e maior margem de segurança e ao ser administrado em doses mais baixas que os outros fármacos. Este dado é importante visto que há muitos casos de intoxicações medicamentosas (SILVA *et al.*, 2017)

O metronidazol é utilizado com uma concentração de 0,5%, sendo que é administrada a dose de 25mg/pombo por via subcutânea, uma vez por dia durante cinco dias; o dimetridazol é utilizado com uma concentração de 40% sendo administrado a uma dosagem de 1g/L na água de bebida durante cinco dias, seguido por 0,5g/L na água de bebida por mais dez dias. O ronidazol é administrado com a concentração de 1% na dose de 4g/L na água e bebida durante 12 dias e o carnidazol é utilizado administrando a dose de 10mg/pombo por via oral, uma única vez (LUMEIJ & ZWIJNENBERG, 1990; FORRESTER & FOSTER, 2009). O dimetridazol tem sido utilizado com sucesso na água de bebida para tratar pombos-das-rochas, enquanto o metronidazol e o carnidazol têm sido utilizados em aves de rapina (FORRESTER & FOSTER, 2009). No entanto, existem falhas terapêuticas devido a resistências aos nitroimidazóis documentadas em pombos, devido à utilização dos fármacos como prevenção da doença (LUMEIJ & ZWIJNENBERG, 1990). Em casos de infeção com baixa carga parasitária, normalmente, não se recomenda tratamento, porque se pensa que estas estirpes de baixa patogenicidade conferem alguma defesa imunitária contra a infeção por estirpes mais patogénicas (SILVA *et al.*, 2017).

Vários compostos sintéticos demonstraram evidência de atividade potente contra *T. gallinae*, bem como baixa toxicidade para o hospedeiro e podem ser boas alternativas aos nitroimidazóis, quando existe resistência a estes fármacos (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

O habitat das aves deve ser monitorizado, caso sejam aves de cativeiro; para, além disso, é importante saber o estado das aves infectadas, instituir quarentena e evitar a entrada de aves de vida livre, principalmente pombos, que se presume terem estado em contato com outros pombos (SILVA *et al.*, 2017).

A fim de determinar a eficácia do tratamento, deve-se realizar, novamente, pesquisa da presença do parasita. Este passo é bastante útil para aferir se o tratamento

está a ser suficiente ou não; caso não esteja a ser eficaz, pode decidir-se um aumento da dose do fármaco em questão no tratamento inicial ou mesmo prolongar a duração do tratamento (SILVA *et al.*, 2017).

É de realçar que a tricomonose pode não causar doença por si só mas, ao deprimir o sistema imunitário do hospedeiro, predispõe para o aparecimento de outras doenças, por tanto, não é incomum haver patologias concomitantes com a tricomonose. Do mesmo modo, outras patologias podem predispor ao aparecimento da tricomonose (FORRESTER & FOSTER, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

3.14 Controle

Para o controle da tricomonose, as fontes de infecção devem ser eliminadas. Em cativeiros, deve-se eliminar aves infectadas e aves adultas cuja sua prole se tornou infectada. Também, faz-se necessário manter a água dos bebedouros sempre fresca (BUTCHER, 2003), juntamente com a desinfecção dos recipientes de água e grãos.

3.15 Óleos essenciais

A crescente procura por plantas medicinais, aromáticas e condimentares, é observada em diversos países devido à tendência dos consumidores em utilizar, preferencialmente, produtos farmacêuticos e alimentícios de origem natural (SANTOS, *et al.*, 2011; MARTINAZZO *et al.*, 2007).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. Sua composição química é determinada por fatores genéticos, entretanto, outros fatores podem ocasionar alterações expressivas na produção dos metabólitos secundários. Dentre estes fatores, podem-se destacar as interações planta/ microrganismos, planta/ insetos e planta/ planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita (MORAIS, 2009; PAULUS *et al.*, 2013, Silva 2017).

O mercado de fitoterápicos foi avaliado em US\$12,4 bilhões ao ano, representando 5% do mercado mundial de produtos farmacêuticos. No Brasil, as

espécies medicinais mais cultivadas e comercializadas não são nativas e grande parte foi trazida pelos imigrantes, como o capim-limão (*Cymbopogon citratus*), o manjeriço (*Ocimum* spp.), a camomila (*Chamomilla recutita*), dentre outros (AMARAL *et al.*, 1999; SIMÕES *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais são produtos naturais de plantas que possuem um grande potencial para combater o uso dos fungicidas sintéticos, pois apresentam propriedades antifúngicas, antibacterianas e inseticidas (FENG & ZHENG, 2007; KNAAK & FIUZA, 2010; LEE *et al.*, 2008), além de serem menos perigosos aos seres humanos, em comparação aos produtos sintéticos, e menos tóxicos ao meio ambiente, devido à volatilização de seus compostos (SATISH *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2006). Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis, constituídos de compostos oxigenados e hidrocarbonetos, como os sesquiterpenos e monoterpenos, sendo esses últimos predominantes e sua composição pode variar entre as espécies de plantas (NERIO *et al.*, 2010; PRABUSEENIVASAN *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2007). Os terpenóides e compostos fenólicos são os responsáveis pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais, que possuem seu mecanismo de ação associado ao caráter lipofílico dos compostos, os quais se acumulam nas membranas, havendo perda de energia pelas células microbianas. Nesse contexto, a exploração dos óleos essenciais forma um dos grupos de compostos naturais com maior potencial para o desenvolvimento de produtos para controlar doenças de plantas (FENG & ZHENG, 2007; KNAAK & FIUZA, 2010).

Os óleos essenciais podem ser definidos como material volátil presente em plantas, geralmente com odores e fragrâncias características (SERAFINI *et al.*, 2001). Óleos essenciais constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (SIMÕES & SPITZER 1999), cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos, dentre outros, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário.

São encontrados nos órgãos das plantas, nos aparelhos secretores e estão associados a várias funções relacionadas à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, tendo então um papel fundamental na sua defesa contra os microrganismos e predadores, assim como na atração de insetos e outros agentes fecundantes (HUET, 1991). A volatilidade e a insolubilidade dos óleos essenciais em água e a solubilidade em solventes orgânicos permitem caracterizá-los e promover o seu isolamento.

Apresentam-se sob a forma de líquidos oleosos, de aroma agradável e intenso, mas existem também os de aroma desagradáveis e ainda inodoros (COSTA, 1994).

3.16 Óleos essenciais nanoestruturados

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem provocado revolução na ciência e na tecnologia nos seus mais diversos setores, devido ao potencial de aplicação e ao desenvolvimento tecnológico por ela ocasionado (DURÁN *et al.*, 2006). Essa nova ciência, tem caráter multidisciplinar e vem sendo aplicada nas mais diversas áreas da pesquisa científica (TOMA, 2005).

No que se refere a nanotecnologia podemos citar a área da saúde como uma das que mais vem sendo beneficiada com os avanços das pesquisas. Os sistemas nanoestruturados estão revolucionando a forma como os fármacos são liberados, direcionados aos sítios de ação, diminuindo os efeitos colaterais, e aumentando a biodisponibilidade, e o contato do medicamento com o sítio específico (HU *et al.*, 2011).

Nano é derivado da palavra grega que significa anão, e este termo deu origem a unidade de medida, o nanômetro, e que deu nome a essa tecnologia e equivale à bilionésima parte de 1 metro ($1 \text{ nm} = 1/1.000.000.000 \text{ m}$). Os produtos nanométricos que possuem dimensões medindo 100 nm são chamados na literatura científica mundial de nanoparticulados e segundo o *Food and Drug Administration* - FDA, nanopartículas são as “partículas com dimensões menores que $1 \mu\text{m}$ que exibem propriedades não reconhecidas em partículas maiores” (SCOTT & CHEN, 2012).

A nanotecnologia pode interferir em quase todos os tipos de materiais, sejam eles naturais ou sintéticos, de modo a formar nanoblocos tais como: nanopartículas, nanocompósitos, nanoesferas, nanotubos, nanofibras que além de apresentar novas propriedades pela escala, apresentam maior desempenho nos produtos resultantes. Do ponto de vista tecnológico, essas nanoestruturas podem ser trabalhadas quimicamente pela modificação de suas superfícies como a utilização de polímeros, ampliando ainda mais o campo de suas aplicações (DURAN *et al.*, 2006, peres 2015).

Entre os diferentes nanomateriais que vêm sendo estudados, podemos destacar as nanocápsulas (NC) e as nanoemulsões (NE). As NC podem ser definidas, basicamente, por um sistema vesicular, que apresenta um núcleo líquido rodeado por

uma membrana polimérica. As NC podem conter a molécula ativa, confinada no núcleo ou adsorvido na membrana polimérica, na forma líquida, sólida ou uma dispersão molecular, lipofílico, hidrofílico ou uma mistura dos dois, de acordo com as matérias primas e o método de preparação utilizado (CHIANG *et al.*, 2014).

As NE são caracterizadas como sistemas isotrópicos dispersos com gotículas entre 1 e 500 nm (MASON *et al.*, 2006) o que garante que sejam cineticamente estáveis (GIONGO *et al.*, 2015). Nanoemulsões podem ser classificadas como uma dispersão nanométrica de gotículas oleosas, entre 1 e 200 nm, em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo adequado. Apresentam-se como líquidos de aspecto translúcido quando o tamanho dos glóbulos é inferior a 200 nm e aparência leitosa quando na faixa entre 200-500 nm, possuindo um reduzido diâmetro de gotícula e baixa viscosidade. O fármaco veiculado encontra-se preferencialmente disperso e/ou adsorvido no núcleo oleoso da nanoestrutura (MASON *et al.*, 2006. GHOSH *et al.*, 2011; CHIANG *et al.*, 2014).

3.17 Óleos essenciais com atividade anti-*trichomonas*

A literatura demonstra o notável desempenho dos óleos essenciais (OEs), derivados do metabolismo secundário das plantas, mostrando as diversas atividades biológicas desses compostos (BILIA *et al.*, 2014).

No estudo realizado por Malekifard *et al.* (2021) extratos de *Lavandula angustifolia* e *Zingiber officinale* podem atuar como potenciais agentes naturais contra a tricomoníase. Vários estudos comprovam que alguns extratos de ervas são eficazes na erradicação de protozoários, como no trabalho de Fenalti *et al.* (2020), Baccega *et al.* (2020) contra *Trichomonas vaginalis* e *Trichomonas gallinae* ao utilizarem óleo de manjerição, eucalipto e capim-limão.

Outros compostos naturais foram eficientes contra *Trichomonas gallinae*, Tabari *et al.* (2017) observaram a eficiência do *Pelargonium roseum* em pombos e Youssefi *et al.* (2017) analisando o efeito *in vitro* e *in vivo* de *Artemisia sieberi*.

3.18 Óleo essencial de capim-limão

O óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) é um dos mais importantes óleos essenciais comercializados. O nome capim-limão lhe foi atribuído devido à semelhança com o odor de limão proveniente de seu elevado teor em citral (CHAVEIRO & QUEIROZ, 1993). Conhecido popularmente no Brasil como capim-limão, capim-cidrô, capim-cheiroso, capim-cidreira, capim-cidrão, erva-cidreira e citronela-de-java (Fig. 6), espécie da família das Gramíneas, subfamília Panicoideae (ABEGAZ & YOHANNES, 1983).



Figura 6- Capim-limão

Fonte: Google imagens

Originária da Ásia, cultivada em todas as regiões dos trópicos, preferindo climas mais quentes e úmidos, chuvas bem distribuídas ao longo do ano e temperatura média elevada, não resistindo a regiões frias, sujeitas a geadas. É cultivado a pleno sol, vegetando em qualquer solo, desde que bem drenado e fértil (CORRÊA JÚNIOR *et al.*, 1994). A planta já está perfeitamente aclimatada e adaptada às condições do Brasil. (NEGRELLE & GOMES, 2007).

É uma erva aromática cujas folhas contêm, em sua composição química, o óleo essencial encontrado em células oleíferas, possui atividade antibacteriana, atua na diminuição da atividade motora e no aumento do período de sono; é anticonvulsivante, antiespasmódico e analgésico, sendo também utilizado como aromatizante de ambiente e como material de partida para a síntese da Vitamina A (LORENZI & MATOS, 2002). No Brasil, as folhas do capim-limão apresentam um grande uso popular como sedativo, sudorífero, carminativo, diurético, antipirético e antirreumático. Também é utilizado de

forma caseira para combater afecções das vias respiratórias e digestivas (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

Possui ação fitoterápica como bactericida, antiespasmódico, calmante, analgésico suave, carminativo, estomáquico, diurético, sudorífico, hipotensor e antirreumático. Também é utilizado em diarreias, dores estomacais e problemas renais (MARTINS *et al.*, 1995). Sua utilização no Brasil é por uso do chá das folhas, muito utilizado para nervosismo, febre, tosse, dores diversas (dor de cabeça, abdominais, reumáticas) e alterações digestivas, como dispepsia e flatulência. (COSTA *et al.*, 2005).

O capim-limão produz um óleo essencial com forte odor de limão, onde o mesmo vem sendo utilizado na indústria farmacêutica e de perfumaria, na preparação de sabonetes, colônias e desodorantes (LEAL *et al.*, 2001).

Na indústria, o óleo essencial do capim-limão é utilizado na preparação de sabonetes e colônias. Usado também como aromatizante na área da perfumaria e cosmética. Na indústria química é utilizado para a obtenção do citral, o qual serve como material de partida para a síntese de iononas que são precursoras da vitamina A (SILVA *et al.*, 2006). Seu odor forte e marcante é devido ao citral, constituinte majoritário é predominante na espécie, um aldeído monoterpeneo com forte odor de limão. Devido a esta característica, o *Cymbopogon flexuosus* é conhecido internacionalmente como *lemon grass*. No mundo todo, a cultura do capim-santo tem sido estudada, mas no Brasil pouco se sabe sobre o seu manejo agrônomo e seu comportamento nas diferentes regiões do nosso país (GOMES E NEGRELLE, 2003). O principal interesse é o óleo essencial da espécie, sendo útil na indústria para fragrância de cosméticos e muito utilizado na aromaterapia, um ramo que cresce muito no nosso país, além de fazer parte no aroma de detergentes, sabões aromatizantes de ambientes e repelentes de insetos (LEAL *et al.*, 2001).

Em sua composição química, OE de *Cymbopogon flexuosus* identifica-se como compostos majoritários os seguintes compostos geranial, neral (Fig 8 e 9) e o mirceno como compostos majoritários e geraniol, óxido de cariofileno, citronelol como compostos minoritários (BASSOLÉ *et al.*, 2011).

O óleo essencial de capim-santo é um dos mais importantes óleos essenciais comercializados no mundo. Os países tradicionalmente produtores do óleo de capim-santo são Índia, Guatemala, Haiti, Madagascar, Indochina e Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

O óleo essencial do capim-limão é uma substância com aparência líquida brilhante, com cor que vai desde o amarelado claro ao marrom, pouco densa, odor bem característico. Para o óleo ser um produto comercializável, o mesmo deve apresentar, no mínimo, 75% de citral na sua composição (ALMEIDA E CANECCHIO FILHO, 1973).

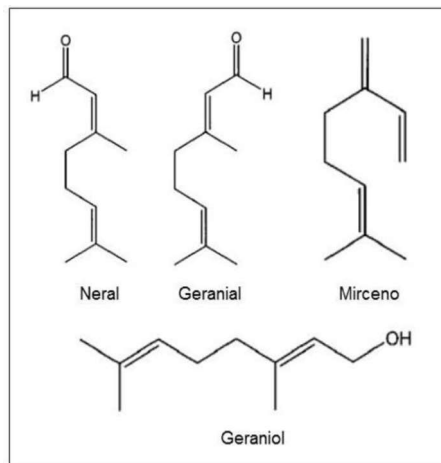


Figura 7- Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*.

Fonte: NEGRELLE & GOMES, 2007

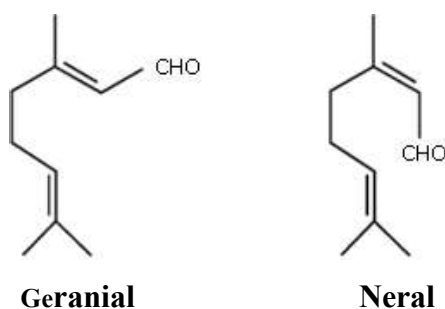


Figura 8- Estrutura química do geranial e neral (citral), componentes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*

Fonte: Google imagens

Schuck *et al.* (2001), verificaram que o óleo volátil de *C. flexuosus* possui acentuada atividade antifúngica frente a *Candida albicans*. Existem outros estudos sobre o citral, nos quais se constata propriedades antibacterianas, larvicida e repelente de insetos. O limoneno e o mirceno também são tóxicos para os mais variados tipos de insetos (TAIZ E ZEIGER, 1991).

Pesquisas realizadas no IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) revelam a superior ação larvicida deste óleo essencial no combate ao mosquito da dengue em comparação aos inseticidas químicos utilizados (MARTINS, 2002).

A maioria das análises do óleo essencial da espécie nos diferentes habitats pelo mundo identifica o citral como o maior constituinte volátil presente. Ekundayo (1985), em estudos com o material procedente da Etiópia, encontrou o geranial e neral como componente dominante do seu óleo.

No Brasil, o óleo essencial de plantas *Cymbopogon citratus* originárias de duas regiões diferentes do estado de São Paulo apresentaram uma composição química diferente, onde o óleo essencial extraído de uma população cultivada em Pindamonhangaba-SP apresentou uma concentração alta de citral (aproximadamente 96,0%), enquanto o óleo extraído da população de Ibiúna-SP apresentou, além de citral, proporções elevadas de outro monoterpeno, o geraniol (FURLAN, 2010).

A procedência do material genético da espécie influencia no teor e composição do óleo essencial do capim-limão, sendo seu rendimento avaliado com base no seu peso da matéria seca, podendo ser muito variável, dependendo de diversos fatores internos e externos. Para o capim-santo, os valores encontrados situam-se em torno de 0,2 a 0,5%, excepcionalmente podendo chegar a 3,0% (NASCIMENTO, 2003).

3.19 Óleo essencial de eucalipto

Eucalipto (do grego = "verdadeira cobertura") é a designação genérica das várias espécies vegetais do gênero *Eucalyptus*, família Myrtaceae, nativas da Austrália, amplamente cultivadas em áreas tropicais e subtropicais. Considerada uma árvore de médio a grande porte, a sua importância está na diversidade de produtos que é possível obter a partir da madeira e folhas (VALDETARO *et al.* 2011).

No Brasil, existe grande área plantada com eucalipto, cobrindo uma área de mais de três milhões de hectares (SALARI *et al.*, 2006). São, em termos gerais, árvores, em alguns raros casos, arbustos, que apresentam copa geralmente rala e alongada e o tronco quase sempre retilíneo e cilíndrico. As folhas possuem a característica comum, entre a maioria das espécies, o fato de serem aromáticas e dispostas nos ramos de maneira oposta na parte inferior e alternas na parte superior. Os frutos são constituídos por

cápsulas lenhosas deiscentes com sementes muito pequenas. As flores geralmente são melíferas, contribuindo para a produção de mel de abelha (BAKKALI *et al.*, 2008).

O gênero *Eucalyptus* é composto de espécies de múltiplos usos, podendo sua madeira ser utilizada como combustível para siderurgia, indústria de móveis, na construção civil, como postes, na produção de celulose, mel, e, suas folhas serem utilizadas para extração de óleos essenciais usados na fabricação de produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e medicamentos (VITTI e BRITO, 2003). Existem mais de 600 espécies e variedades, das quais 20 têm sido exploradas comercialmente e menos de 12 têm importância econômica no mercado mundial de óleos essenciais (FRANCO, 2005).

No Brasil, as principais espécies de eucalipto exploradas para a produção de óleo essencial são: *E. globulosus*, *E. staigeriana* e *E. citriodora*. *Eucalyptus globulus* é uma árvore frondosa e de grande porte que mede até 60 m de altura. Sua casca lisa branco-cremosa vai se renovando ao longo do tempo; a folhagem juvenil é ovalada e de coloração prata-azulada. As folhas adultas são brilhantes, têm formato de foice e medem até 25 cm de comprimento (Fig.10) e são cultivadas para extração de óleo essencial medicinal. A madeira desta espécie é usada apenas como lenha, apesar das referências favoráveis para a produção de celulose e papel (VITTI e BRITO, 2003).



Figura 9- *Eucalyptus globulus*

Fonte: Google imagens

No Brasil, o *Eucalyptus globulus* é considerado a principal espécie produtora de óleo medicinal. Esse óleo é destinado à fabricação de produtos farmacêuticos, sendo o seu principal constituinte químico denominado o eucaliptol, que apresenta propriedades bactericidas (VITTI; BRITO, 2003; KHAJAVI *et al.* 2014). Nesse contexto, é necessário considerar todos os aspectos tecnológicos que envolvam o estabelecimento e

o manejo das florestas, principalmente quando destinados à produção de óleo essencial (VITTI; BRITO, 2003). Os óleos essenciais são metabólitos produzidos pelas plantas que podem sofrer influência de fatores abióticos e afetar tanto o seu rendimento em massa, como sua composição química.

Os aspectos nutricionais da planta estão diretamente relacionados ao processo produtivo dos óleos essenciais e modificações no padrão nutricional podem acarretar mudanças no perfil químico dos óleos (SOUZA *et al.*, 2007).

Seus principais constituintes obtidos por cromatografia gasosa são 1,8-cineol ou eucaliptol como composto majoritário, e alfa-pineno, gama-terpineno, beta-mirceno, beta-pineno, 1-felandreno e alfa-terpinoleno, como compostos minoritários (CHAGAS *et al.*, 2002). Existem relatos da atividade do eucaliptol sobre as bactérias *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CHA *et al.*, 2007), os fungos *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *Pyrenophora graminea* (TERZI *et al.*, 2007) e os coleópteros *Tribolium castaneum* (TRIPATHI *et al.*, 2001), *Sitophilus oryzae* e *Rhyzopertha dominica* (LEE *et al.*, 2004). O eucaliptol também apresentou atividade *in vitro* sobre larva do nematóide *Anisakis simplex* (NAVARRO *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais de eucalipto são compostos formados por uma complexa mistura de diferentes concentrações de componentes orgânicos voláteis, e apresentam grupos químicos como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. A grande maioria, no entanto, é constituída de terpenos complexos, que constituem uma grande variedade de substâncias vegetais derivadas de unidades do isopreno.

Os compostos 20 terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (90 % dos óleos) e os sesquiterpenos (SALGADO *et al.*, 2003). Os monoterpenos são metabólitos secundários que podem causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas dos parasitos, apresentando a vantagem de, na maioria das vezes, serem pouco tóxicos para os mamíferos (RICE e COATS, 1994).

Alguns monoterpenos têm sido considerados como alternativas aos produtos comerciais sintéticos, sendo utilizados como condimentos artificiais, perfumes (TEMPLETON, 1998) e em formulações de expectorantes, descongestionantes, analgésicos externos e antisépticos (WINDHOLZ *et al.*, 1998).

Os óleos de eucalipto ocorrem, principalmente, nas folhas, onde são produzidos em pequenas cavidades globulares, chamadas glândulas. Existem vários fatores que podem exercer influência na variação da composição desses óleos. Os mais típicos são a variabilidade genética, a idade das folhas, as condições ambientais, o tipo de manejo

florestal, os métodos utilizados para amostragem das folhas, os processos de extração e de análise do óleo (CIMANGA *et al.*, 2002; BAKKALI *et al.*, 2008).

A ação dos óleos essenciais está relacionada com a sua volatilidade, pois, por meio dessa característica, agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como arma de defesa contra o reino animal. Eles já foram considerados como repelentes de insetos que se alimentavam de suas folhas, inibidores da germinação e de crescimento de outras plantas, controladores da atividade microbiológica de alguns fungos e bactérias, atrativos de polinizadores, proteção contra a perda de água e aumento de temperatura entre outros (FRANCO, 2005). Em função do seu uso final, os óleos essenciais de eucalipto podem ser divididos em três grupos: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumaria (VITTI e BRITO, 2003).

Óleos medicinais são aqueles que apresentam como componente principal o cineol e são destinados à fabricação de produtos farmacêuticos como inalante, estimulantes de secreção nasal, produtos de higiene bucal, dentre outros. A principal espécie produtora deste óleo no Brasil é o *E. globulus*.

Os óleos industriais têm como componentes principais o felandreno, que é usado como solvente e matéria-prima na produção de desinfetantes e desodorizantes e o mentol usado como aromatizante de produtos medicinais. E os óleos de perfumaria fazem parte da composição de perfumes, sendo mais usados nos produtos de limpeza, *E. citriodora* é a principal espécie cultivada no Brasil para a produção deste tipo de óleo, seguida pela espécie *E. staigeriana* (VITTI e BRITO, 2003).

3.20 Óleo essencial de manjeriço

O manjeriço (*Ocimum basilicum*) é uma planta medicinal e aromática, originária da Índia, sendo também conhecida como manjeriço comum, pertence à família Lamiaceae (Fig.11) amplamente usada por suas propriedades medicinais, aromatizantes e culinárias. É uma importante oleaginosa essencial, planta medicinal e erva culinária, (FAVORITO *et al.*, 2011)



Figura 10- Manjerição

Fonte: Google imagens

O óleo essencial de manjerição com alta concentração de linalol é valorizado no mercado internacional, é um componente da saúde bucal, produtos odontológicos, e tem sido utilizado na fragrância e indústria alimentícia amplamente usado nas indústrias de condimentos e cosméticos (CARVALHO FILHO *et al.*, 2006).

Segundo Fernandes (2004) e Shahrajabian *et al.* (2020) o manjerição possui importância econômica no Brasil na obtenção de óleo essencial, sendo seu consumo tanto in natura quanto para processamento industrial. Seu óleo é muito apreciado na culinária, na aromatização de alimentos e bebidas, e poderá ser usado nas indústrias de cosméticos e perfumarias. Apresenta propriedades inseticidas, repelentes e antimicrobianas, sendo também utilizado na conservação de grãos. O conteúdo de óleo essencial pode variar consideravelmente de espécie para espécie, em função de parâmetros climáticos e de fatores agrônômicos como fertilização, irrigação, colheita e, especialmente, a fase de desenvolvimento da planta na época da colheita. Muitas plantas existem sob vários fenótipos, isto é, diferindo na sua aparência e diversidade qualitativa e quantitativa, geralmente detectada na composição do óleo essencial obtido (KERROLA *et al.*, 1994).

O linalol, o constituinte majoritário do óleo de manjerição, tem sido largamente usado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila, e testado como acaricida, bactericida e fungicida. Na medicina tem sido aplicado com sucesso como sedativo e, atualmente estão sendo analisadas suas propriedades anticonvulsivas (Radünz, 2004).

4. Artigos publicados e submetidos

4.1 Artigo 1

Artigo publicado na Revista Disciplinarum Scientia Série: Naturais e Tecnológicas

Free essential oils and nanostructured on *Trichomonas gallinae* trophozoites

Bruna Baccega², Mirna Samara Dié Alves², Raquel Nascimento Neves³, Maiara Callegaro Velho⁴, Samantha Nunes de Godoi⁴, Aline Ferreira Ourique⁴, Marcos Marreiro Villela⁵, Elvia Elena Silveira Vianna⁵, Nara Amélia da Rosa Farias⁶ e Camila Belmonte Oliveira⁶

Disciplinarum Scientia. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 337-354, 2019.

Recebido em: 11.11.2019. Aprovado em: 19.11.2019.

ISSN 2176-462X

FREE ESSENTIAL OILS AND NANOSTRUCTURED ON *TRICHOMONAS GALLINAE* TROPHOZOITES¹

*ÓLEOS ESSENCIAIS LIVRES E NANOESTRUTURADOS EM
TROFOZOITOS DE TRICHOMONAS GALLINAE¹*

Bruna Baccega², Mirna Samara Dié Alves², Raquel Nascimento Neves³, Maiara Callegaro Velho⁴, Samantha Nunes de Godoi⁴, Aline Ferreira Ourique⁴, Marcos Marreiro Villela⁵, Elvia Elena Silveira Vianna⁵, Nara Amélia da Rosa Farias⁶ e Camila Belmonte Oliveira⁶

ABSTRACT

Avian trichomoniasis mainly affects the upper digestive tract of birds and it is caused by the flagellate proto-zoan, *Trichomonas gallinae*. The present study was developed to evaluate the *in vitro* effects of free essential oils (OEs) and nanostructured *Ocimum basilicum* and *Eucalyptus globulus* against trophozoites of *T. gallinae*. *T. gallinae* trophozoites were recovered by the swab method from naturally infected urban pigeons, followed by cultivation in TYM medium (trypticase-yeast-maltose extract). The *in vitro* assays were performed in 96-well plates containing essential oil (OE) and nanostructured on different concentrations in medium containing 1x10⁶ parasites. Four controls were performed: NC (culture medium and trophozoites), MTZ (trophozoites plus 25 µg / ml metronidazole), TW (trophozoites plus vehicle for solubilization of derivatives (0,1% Tween) and NB (blank nanoemulsion 1%). To verify the viability of trophozoites, motility, morphology, and exclusion by trypan blue dye (0.4%) were observed. The analysis of the data obtained from the screening of the compounds showed that 1,5% EO of *O. basilicum* and 1,25 of nanoemulsion reduced the viability of trophozoites by 100%, relative to the negative control. OE *E. globulus* 1,5% and 2% nanoemulsion. The controls CN, TW and NB exhibited positive motility and negative staining with trypan blue, while control MTZ reduced the viability of the parasite by 100% after 24-hour exposure. The data obtained in this study indicate that OEs and nanoemulsions may contribute as effective agents in the control of *T. gallinae* infections.

Keywords: birds, nanotechnology, phytotherapy, protozoa.

RESUMO

A tricomoníase aviária afeta principalmente o trato digestivo superior das aves, causado pelo protozoário flagelado *Trichomonas gallinae*. O presente estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos *in vitro* de óleos essenciais livres (OEs) e nanoestruturados de *Ocimum basilicum* e *Eucalyptus globulus*, contra trofozoítos de *T. gallinae*. Os trofozoítos de *T. gallinae* foram recuperados pelo método do swab de pombos urbanos naturalmente infectados, seguidos pelo cultivo em meio TYM (extrato de tripticase-levedura-maltose). Os ensaios *in vitro* foram realizados em placas de 96 poços contendo óleo essencial (OE) e nanoestruturados em diferentes concentrações em meio contendo 1×10^6 parasitos. Foram realizados quatro controles: NC (meio de cultura e trofozoítos), MTZ (trofozoítos mais 25 μg / ml de metronidazol), TW (trofozoítos mais veículo para solubilização de derivados (0,1% Tween) e NB (nanoemulsão branca a 1%). Para verificar a viabilidade dos trofozoítos, motilidade, morfologia, pela exclusão pelo corante azul de tripan (0,4%). A análise dos dados obtidos na triagem dos compostos mostrou que 1,5% de OE de *O. basilicum* e 1,25 de nanoemulsão reduziram em 100% a viabilidade dos trofozoítos em relação ao controle negativo. OE *E. globulus* nanoemulsão 1,5% e 2 %. Os controles CN, TW e NB exibiram motilidade positiva e coloração negativa com azul de tripan, enquanto o controle MTZ reduziu a viabilidade do parasito em 100% após 24 horas de exposição. Os dados obtidos neste estudo indicam que os OEs e as nanoemulsões podem contribuir como agentes efetivos no controle das infecções por *T. gallinae*.

Palavras-chave: aves, fitoterapia, nanotecnologia, protozoários.

INTRODUCTION

Avian trichomoniasis is a disease caused by the flagellate protozoan *Trichomonas gallinae*, which is the most affected species belonging to the family Columbidae (BRANDÃO; BEAUFRÈRE, 2013; PURPLE; GERHOLD, 2015). A protozoan infects wild and captive bird species worldwide and migrating birds may contribute to its spread (ROBINSON *et al.*, 2010). Due to its widespread occurrence and sometimes its pathogenic character, it is believed that *T. gallinae* plays a role in the regulation of wild bird populations (ROBINSON *et al.*, 2010; STABLER, 1954; KRONE *et al.*, 2005; FORRESTER; FOSTER, 2009; AMIN *et al.*, 2014). Birds of prey may develop trichomoniasis by feeding on infected prey, particularly pigeons (*Columba livia*), main hosts of *T. gallinae* (BUNBURY *et al.*, 2008a), causing mortality of adults and pups (KRONE *et al.*, 2005; AMIN *et al.*, 2012; BUNBURY *et al.*, 2008b; STOCKDALE *et*

al., 2015). Transmission may also occur at shared feeding sites among several bird species, but the main form is during feeding of pups by infected parents (STABLER, 1954; KOCAN, 1969).

Drugs for the treatment of trichomoniasis are nitroimidazoles. However, the use of subdoses and the preventive use of these drugs against avian trichomoniasis have resulted in the emergence of resistant strains (LUMEJI; ZWIJNENBERG, 1990). Despite the existence of nitroimidazole-resistant strains of *T. gallinae*, very little research has been done with alternative means of treatment.

One of the alternatives is the use of essential oils (OE), which are used due to their chemical compounds and have antibacterial, antifungal, antiviral, antiprotozoal and anti-inflammatory activities (CARSON et al., 2006; HAMMER et al., 2008).

Besides the use of OEs, nanotechnology has been used for the development of nanostructured systems that can increase the effectiveness of the oil, mainly raising its stability and the contact time on the target tissues. In our study, nanostructured OEs appear as a new alternative for the treatment in search of a new molecule of this disease, since these systems can, through their high specific surface and reduced surface tension, promote greater penetration of active substances at specific sites (SALAMANCA-BUENTELLO et al., 2005; SILVA, 2004), have less impact to the host, as well as improve the efficacy in the treatment of avian trichomoniasis.

The objective of the present study was to evaluate the efficacy of essential oils and nanoemulsions of *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) and *Ocimum basilicum* (basil), besides also evaluating new non-cytotoxic and pharmacologically active compounds *in vitro* against trophozoites of *T. gallinae*.

MATERIAL AND METHODS

REAGENTS

OE basil (*O. basilicum*) and metronidazole used as control in the *in vitro* test were purchased from Sigma-Aldrich®, Germany. Eucalyptus (*E. globulus*) of FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOEMULSIONS

The essential oils and nanoemulsions in *O. basilicum* and *E. globulus* were supplied by the Nanotechnology Laboratory of the Universidad Fransciscana (UFN). The characterization of essential oils allowed the method described by Hussain et al., 2010 with modifications. Using the Varian Star 3400CX gas chromatograph (CA, USA). For the qualitative analysis of the compounds, a Shimadzu QP2010 Plus gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC / MS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used (GODOI et al., 2017; GÜNDEL et al., 2018).

DEVELOPMENT OF NANOEMULSIONS

The nanoemulsions containing Basil (*O. basilicum*) or Eucalyptus (*E. globulus*) oil were developed using the homogenization under high agitation method, following the methodologies described by Gündel et al. 2018 and Godoi et al., 2017, respectively. The formulations were composed of an oil phase containing essential oil (5%) eucalyptus or 7.5% basil and sorbitan monooleate surfactant (2%), while the aqueous phase was composed of polysorbate 80 (2%) and ultrapure water. Both phases were homogenized separately with the aid of a magnetic stirrer, then the aqueous phase was placed in the Ultra-Turrax® (IKA, Germany) equipment for 10 minutes at 10,000 rpm. Subsequently, the oil phase was injected into the aqueous phase, and maintained in the Ultra-Turrax® for 30 minutes at 17,000 rpm, with temperature control. The blank nanoemulsion was developed using a medium chain triglyceride, derived from caprylic and capric acids (GODOI et al., 2017; GÜNDEL et al., 2018).

CHARACTERIZATION OF NANOEMULSIONS

The physicochemical characterization of the formulations was evaluated by determining the mean droplet size, polydispersity index, zeta potential and pH. The mean droplet size and polydispersity index were determined by the dynamic light scattering technique (Zetasizer® equipment, nano-ZS model ZEN 3600, Malvern) after sample dilution (500 times) in ultrapure water. The zeta potential was determined using the electrophoretic mobility technique (Zetasizer® equipment, nano-ZS model ZEN 3600, Malvern) after sample dilution (500 times) in aqueous solution of sodium chloride (10 mM). The pH was determined using a potentiometer (DM-22, Digimed®) previously calibrated with standard solution, and the readings were carried out directly in formulations. All formulations of the nanoemulsions remained stable under refrigeration for up to 90 days. The readings were done in triplicate and the results expressed as mean $\pm$ standard deviation (GODOI et al., 2017; GÜNDEL et al., 2018).

TRICHOMONAS GALLINAE

Specimens of *T. gallinae* were recovered by the wet mount method of naturally infected pigeons. Twelve native pigeons (2 to 8 weeks old) were captured in their nests in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul. This research was approved by the Committee of Ethics in the use of animals of the Federal University of Pelotas, 05/07th/2018, under the protocol 23110.012860 / 2018-81 and SISBIO on 02/08th/2018, under number 61235-1.

Using swabs, samples were taken from the oral cavity, and from membranous lesions of the oropharyngeal region of domestic pigeons (*C. livia*). The culture of the parasite was prepared by immersion of oral swabs in tryptone / yeast extract / maltose medium (TYM) Diamond, (1957), supplemented with 10% adult fetal serum, antibiotic (meropenem), antifungal (amphotericin B) and incubated at 37 ° C (SANSANO et al., 2009). The cultures were then examined under an optical microscope at (100 and 400 x) for observation of mobile *T. gallinae* trophozoites.

Cultures were observed during seven consecutive days to verify the growth of trophozoites. Every 48 hours, such as trophozoites that had more than 95% mobility and normal morphology, they were subcultured (SEDDIEK et al., 2014).

IN VITRO ASSAY

To examine the susceptibility of *T. gallinae* to essential oils and nanoemulsions, sterile 96-well plates were used for incubation with different concentrations of essential oil and nanoemulsion. The nanoemulsions used for the *in vitro* assay were applied after seven days of their formulations preparation.

The parasites were seeded at an initial density of 1×10^6 trophozoites / mL of TYM and incubated with the oils and nanostructured. Three controls were performed: A (trophozoites only), B (trophozoites plus the vehicle for solubilization of the derivatives (0.01% Tween) C (trophozoites plus 100mM metronidazole) (as positive control, and D (blank nanoemulsion).

The essential oils and nanoemulsions were added to the wells to obtain final concentrations of 0,25 and 2%, respectively. Subsequently, to generate anaerobic conditions, the microculture plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h. After this period, a preparation with trophozoites, containing trypan blue (0.4%) (1:1), was evaluated in Neubauer chamber. Cultures with viability equal or greater than 95% were used for assays, being considered motility, morphology and exclusion by death.

The IC₅₀ (half of the maximum inhibitory concentration) was determined at concentrations for the oils and nanoemulsions. A kinetic growth curve was constructed to obtain the profile of comparable activity of compounds OEs and nanoemulsions against *T. gallinae* trophozoites.

Only the OEs and nanoemulsions that showed a reduction in the viability of the trophozoites to 100% were used to determine the MIC and were used under different concentrations. The trophozoites used to establish MIC and low and high concentrations, as well as controls inoculated in fresh TYM medium at 37°C, were counted in Neubauer chamber with trypan blue every 24 hours for 96 hours to confirm MIC.

The best concentrations, presented after MIC analysis for each essential oil and nanoemulsion, were performed at the following times: 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 hours by the death exclusion method. The IC₅₀ was determined at varying concentrations, as described in the MIC method. A death time curve was constructed to obtain an activity profile of the efficacy of essential oil and nanoemulsion against *T. gallinae* flagellate trophozoites. All assays were performed independently in nonoplicata (SENA-LOPES et al., 2017).

ANALYZE STATISTICAL

Statistical analysis was performed by univariate analysis of variance (ANOVA) using a probability value of $p \leq 0.05$ followed by the Tukey Test (GraphPad Prism 8.0 Software).

RESULTS

CHARACTERIZATION ESSENTIAL OIL

The OE components of eucalyptus and basil were analyzed by gas chromatography. The major compounds of the *E. globulus* EO and its main components were 1,8-cineole (75.7%); p-cymene (7.5%); alpha-pinene (7.3%); and limonene (6.4%). In the analysis of the basil oil, the estragol was identified as the main constituent, which represented about 87%, in the sequence are the compounds 1,8-cineol and trans-alpha-bergamotene presenting values of normalization around 3 and 2%, respectively (GODOI et al, 2017; GÜNDEL et al., 2018).

CHARACTERIZATION OF NANOEMULSIONS

All nanoemulsions presented a polydispersity index lower than 0.3, indicating homogeneity of droplet size and characterizing a monodisperse system (ADUKU et al., 2016; XAVIER et al., 2016). Despite the use of non-ionic surfactants in the formulation, the nanoemulsions have slightly negative zeta potential, which may be associated with the chemical properties of the polyoxyethylene chains present in the sorbitan monooleate and polysorbate 80 (MARUNO; ROCHA-FILHO, 2010). While acid pH values are related to the properties of essential oils (FLORES et al., 2011).

Nanoemulsions are formed by mixing two immiscible liquids stabilized by surfactants, ranging in size from 20µm to 500 nm. The nanoemulsions developed in the present study had an average droplet size of less than 200 nm. The results of the characterization of nanoemulsions with OE and white nanoemulsion, according to mean size, polydispersity index, zeta potential and pH, are shown in table 1.

Table 1 - Physical-chemical characterization of nanoemulsions.

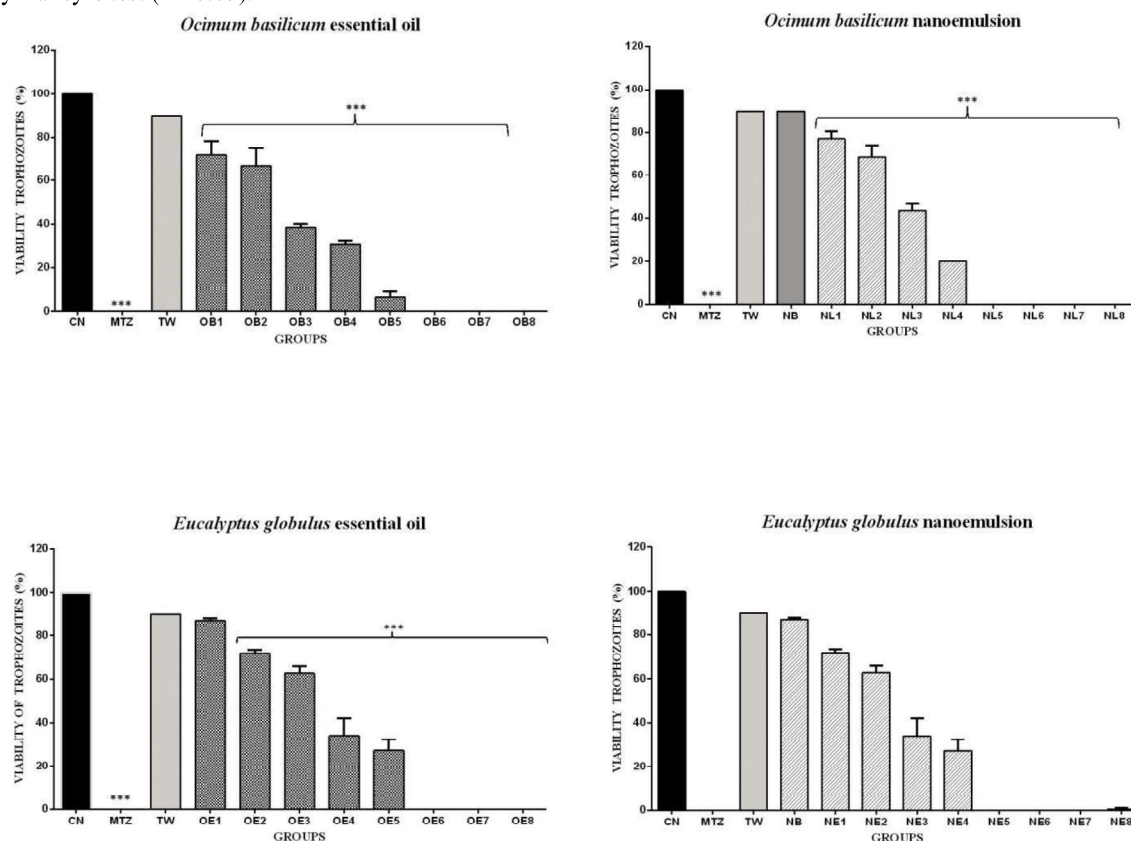
	Average droplet size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	pH
Nanoemulsion containing eucalyptus oil	66 ± 0.81	0.23 ± 0.004	- 7.53 ± 0.72	5.90 ± 0.04
Nanoemulsion containing basil oil	113 ± 0.78	0.19 ± 0.007	- 8.47 ± 0.98	5.37 ± 0.04
Blank nanoemulsion	127 ± 1.02	0.25 ± 0.005	- 6.37 ± 0.58	5.15 ± 0.03

The under refrigeration nanoemulsions were stable for 90 days as the parameters were maintained when compared to the parameters immediately after preparation (GODOI et al, 2017; GÜNDEL et al., 2018).

IN VITRO ASSAY

The results of the *in vitro* study on the anti-trichomonal *T. gallinae* inhibitory effect of OEs and nanoemulsions and the comparison of this activity with the drug metronidazole are presented in Table 1.

Table 2 - Anti-trichomonas activity in culture media of the formulations: essential oils and nanoemulsions in *Ocimum basilicum* and *Eucalyptus globulus* at concentrations of 0,25- 2%, as controls: CN (negative control), MTZ (metronidazole), TW (tween 80%) and NB (Blank nanoemulsion). The analyzes were evaluated at 24 hours post-treatment. The columns indicate the groups and * indicate the statistical difference when compared to the MTZ control by Tukey's test (P <0.05).



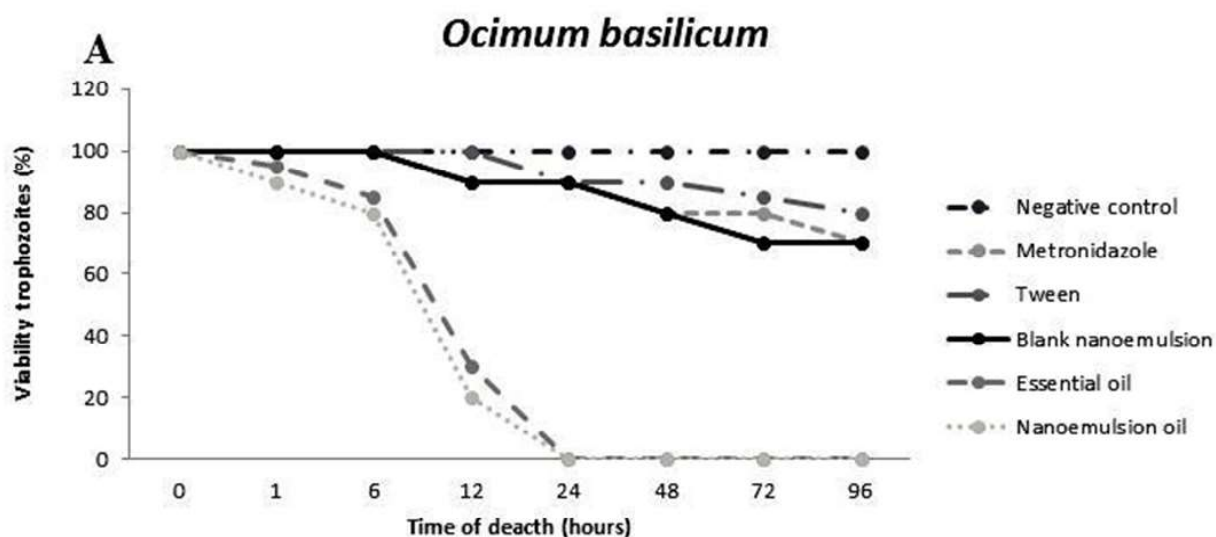
Source: Bruna Baccaga

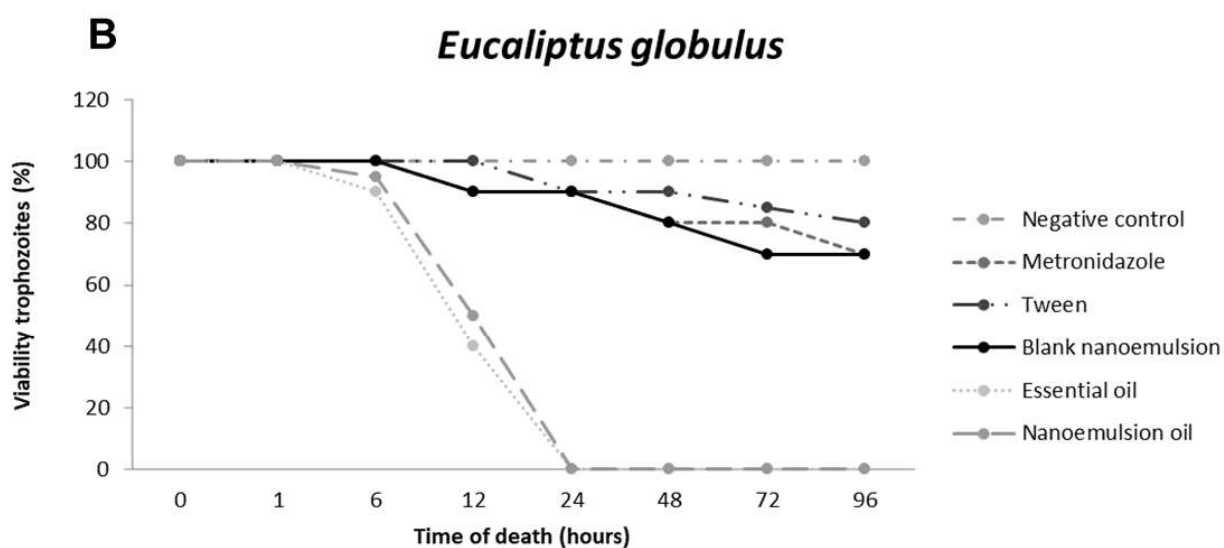
The essential oil and nanoemulsion of the compounds tested against *T. gallinae*, with emphasis on basil, showed efficiency at lower concentrations when compared to eucalyptus. For basil (*O. basilicum*), after 24- hour incubation at 1,25% concentration for nanoemulsion and 1.5% for essential oil, 100% unviable trophozoites in the culture medium. The MIC (minimum inhibitory concentration) of the es-essential oil and the nanoemulsion were 1,45% and 1,20%. IC₅₀ values (mean inhibitory concentration) were set at 0,5% for nanoemulsion and 0,75% for essential oil.

The essential oil and nanoemulsion of eucalyptus (*E. globulus*) showed inhibitory activity at the concentration of 1,5% and 2%, revealing its effectiveness in 24 hours, with no significant difference between them (Fig. 1). The MIC was 1,45% and 1,90% and the IC₅₀ was 0,75% and 1%, respectively.

The growth of the trophozoites was completely inhibited by the essential oils and nanoemulsions of basil and eucalyptus, the inhibition of 100% of the trophozoites after 24-hour incubation (Table 2).

Table 3 - Time of death of *Trichomonas gallinae* after treatment with negative control group, metronidazole, tween 80, blank nanoemulsion, essential oil and nanoemulsion basil and eucalyptus, in the period of 0, 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h.





Source: Bruna Baccega

DISCUSSION

The study of the use of herbal medicines has increased significantly in recent years. The use of medicinal plants with potential effects and phytotherapies has been increasing for the treatment of trichomoniasis, mainly for the species *Trichomonas vaginalis*. Iran has already been developing studies of native plants (IBRAIM, 2013), but in Brazil this study represents unpublished results with phytotherapy for the *T. gallinae* protozoan.

The emergence of resistance to the drugs used for the treatment of avian trichomoniasis has been reported in different parts of the world, as in studies by Lumeij and Zwijnenberg (1990) in Russia; Franssen and Lumeij (1992) in Europe; Gerhold et al. (2008) in Belgium, Munoz et al. (1998) in Spain, Rouffaer et al. (2014) The United States and Tabari et al. (2017) in Iran. Resistant strains end up becoming a threat to bird sanity (FORRESTER; FOSTER, 2009) and the parasite is found in species, such as: pigeon, sparrow, cardinal, quail, parrot, domestic birds, chicken, turkey, not infrequently causing economic losses (BONDURANT; HONIGBERG, 1994).

Resistances to current chemotherapies evidenced the need for new antiparasitic agents, such as the use of OEs and plant nanoemulsions (SOLÓRZANO-SANTOS et al., 2011, BARROS et al., 2016). There are reports of resistant isolates of *T. gallinae* to nitroimidazole, and their prevalence reaches 80-100%, few studies have been conducted to find alternative

trichomonacidal agents (HARLIN; WADE, 2009). The present work is a pioneer in studies related to essential oil and nanoemulsions on the flagel-late protozoan *T. gallinae* in Brazil, with promising results for OE basil nanoemulsion.

Treatment with basil, eucalyptus and metronidazole resulted in no viable trophozoite in the culture medium after 24 hours, corroborating with the data from Youssefi et al. (2017) and Tabari et al. (2017). These essential oils demonstrated the antitrichomonal effects against tropho-zoites *T. gallinae*, at the assay *in vitro*. Several drugs were tested active trichomoniasis in pigeons (AYDIN; COŞKUN 2000; EL-SAYED 2005), but the potential risks of carcinogenicity (SOBEL et al., 2010) and drug resistance (FRANSSEN; LUMEIJ 1992) against MTZ made the development of a new antitrichomonal drug an urgent need. Since ancient times, various herbal medicines have been tested to treat different parasites (KANOJIYA et al., 2015).

The EO and nanoemulsions used in the present study, at their respective concentrations, have already been tested under other microorganisms, without cytotoxicity (GODOI et al., 2017; GÜNDEL et al., 2018).

The three chemical constituents predominant in these OEs in this study were previously identified as major constituents, however, at different concentrations (VITTI; BRITO, 2003; MARTINEZ-VELAZQUEZ et al., 2011, MOKHTARZADEH et al., 2017). Variations in chemical constituents occur due to several factors: seasonality, temperature, collection, availability of water, among others (XAVIER et al., 2016). In our data the chemical constituents of the OEs tested showed activity against the flagellated *T. gallinae* protozoan, at different concentrations, inactivating the same in the 24-hour period. The activity of basil OEs is related to bioactive components that have estragol. Its activity is mainly associated with one of its components, estragol, which has already exhibited activity in other studies, such as the *Eimeria tenella* (JITVIRIYANON et al., 2016), *G. lamblia* (BARBOSA et al., 2007), *T. gallinae* (ADEBAJO et al., 2006), *T. vaginalis* (ARTHAN et al., 2008), and *Leishmania infantum* (GONZALEZ-COLOMA et al., 2011). In our study, basil oil showed higher efficacy at shorter time when compared to essential oil of eucalyptus. It has been demonstrated essential oil has the ability to destroy the integrity of the cell membrane, releasing the cellular components and causing morphologi-cal changes in the plasma membrane, which may cause damage to the organelles, and thus, cellular lysis of the trophozoites (BOYOM et al., 2003).

The efficacy of basil nanoemulsion, when compared to essential oil and nanoemulsion in eucalyptus, had a greater efficacy ($P < 0.05$). This fact can be attributed to the chemical compounds present in this essential oil, particle size reduction and greater bioavailability. The relevance of research with nanostructured systems with bioactive withdrawn from plants is evident as seen in the works of Schmaltz et al. (2005), Codevila et al. (2015), Bahamond et al. (2015) and Wen-Chien et al. (2018). The essential oils of basil and eucalyptus presented anti-*trichomonas* activity, both in their free formulation, as well as, nanostructured. However, the basil formulation evidenced its strongly potentiated activity, since it caused 100% mortality of the trophozoites in a lower time interval when compared to the OEs tested.

Tabari et al. (2017) suggests that *P. harmala* is a natural antitrichomonal agent effective against *T. gallinae* when compared to metronidazole, with a similar result to that of the present study, when compared to essential oil and nanoemulsion of basil at concentrations of 1,25% and 1,5%. Nikpay and Soltani (2018) evaluated the anti-trichomonas activity of the extracts of *Pulicaria dysenterica* and *Lycopus europaeus* at different concentrations. The results showed that both extracts decreased viability in 10% and 60% inhibition of the growth of the culture, results inferior to those obtained in the present work, in which the minimum inhibitory concentration (MIC) was 100% mortality of the trophozoites.

The essential oil *O. basilicum* had lethal effects on the growth of the trophozoites, with ultrastructure destructive changes. In this study the effect of the *O. basilicum* oil on the inhibition of trophozoites growth showed statistically significant difference when compared to parasite negative control, inhibition of trophozoites growth, and trophozoites motility were in relation to concentration and incubation in 24-hours' time. These findings were in accordance with the results of *T. gallinae* (ADEBAJO et al. 2006) and *T. vaginalis* (ARTHAN et al. 2008; ELDIN et al., 2015). It is believed that the inhibitory effect of *O. basilicum* oil on the growth of trophozoites is, also possibly, through its ability to inhibit activity of cysteine proteinase of *T. gallinae*, as claim Gradoni and Ascenzi (2004) under the protozoa *T. vaginalis*.

The eucalyptus EO has therapeutic application and Silva et al. (2003), Batish et al. (2008), Matos et al. (2004) and Chagas et al. (2002) state that some species of eucalyptus have activity against protozoa. In this study, the evaluation performed with the essential oil and nanoemulsion of *Eucalyptus globulus* on MIC (1,90%), occurred the death of the trophozoites

in 24-hours exposure. This data shows the lower efficacy of this bioactive compound when compared to the results observed with basil OE, because the lower the MIC, the greater the potency and, consequently, the greater the difficulty of the microorganism to develop resistance.

The eucalypt EO effectiveness was higher when compared to its nanoemulsion, which has a slower release to the trophozoites, breaking the nanostructure later. These results differ from those observed by Chagas et al. (2002) who demonstrated biocidal action of *Eucalyptus* species on the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick and observed that the essential oils had their activities potentiated when transformed into emulsifiable concentration. This eucalypt EO efficacy when compared to nanoemulsion can also be attributed to dilution of the oil that provides a slower and more effective penetration into the microorganism. Although the pure oil is lipophilic and has a lower absorption, when compared to the emulsifiable system (CHAGAS et al., 2002).

The use of nanoemulsions with essential oils has been gaining ground in research. Nanoemulsions can be classically defined as a nanometric dispersion of oily droplets in an external aqueous phase, stabilized by a suitable surfactant system. The oil/drug delivered is preferably dispersed or adsorbed on the oily nucleus of the nanostructure (FRONZA et al., 2004). In the tests carried out the nanotechnology associated with the essential oil of basil showed a high efficiency in the absorption of the target cells.

Nanotechnology associated with animal welfare has been gaining applications ranging from diagnosis to treatments in the field of pharmaceutical nanotechnology (FENEQUE, 2003). The synthesis of new synthetic molecules provides therapeutic compounds for the treatment of diseases in pets and production (CHAKRAVARTHI; BALAJI, 2010). The primary focus of research in the area of nanoemulsions is the creation of drug delivery systems. The development of these systems has made possible some improvements in the rate of absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs or other substances in the body (FENEQUE, 2003).

The nanoemulsions used in the present study were evaluated for their stability under opposing climatic conditions. When stored at elevated temperatures (40°C), there were instability in their formulations. Stability was observed for 90 days under refrigeration, when compared to the parameters obtained shortly after preparation (GÜNDEL et al., 2018; SOLANS et al., 2005).

An emulsion when it presents a mean droplet diameter (Z) of less than 300 nm is considered a nanoemulsion, corroborating with our study, in which the nanoemulsions had a diameter of less than 200 nm. Emulsions containing the smallest diameters (200-500 nm) tend to be physically more stable (MEHLHORN et al., 2009). The stability is due to the use of surfactants in their formulation, which increase the availability and penetration by low interfacial tension. The droplet size is a parameter of stability is relevant and of great importance (ANTON; VANDAMME, 2011; LEONG et al., 2009; MCCLEMENTS, 2012)

Nair et al. (2016) state that the therapeutic efficacy of many compounds when they are associated with nanotechnology occurs because of better solubilization, greater bioavailability and protection of the active ingredient against enzymatic and hydrolytic degradation. In our study, the results obtained in the tests with the EO of nanostructured basil demonstrate a greater efficacy. This fact could be attributed to a greater penetration of the nanoemulsion in the receptors present in the proto-zoan membrane, which allowed a greater interaction between them. The higher the concentration of nanoemulsion, the greater the dose-dependent efficacy, with 100% mortality occurring in the three highest concentrations tested. This result can be attributed to the size of the nanoparticles (<200 nm). Trados et al. (2004) affirm that nanoemulsions with the size and biocompatibility of 20-200nm present advantages like greater bioavailability, which facilitates the EO activity.

CONCLUSION

The essential oils and their respective nanoemulsions were able to reduce the viability of *T. gallinae* trophozoites that were causing cell death at different concentrations.

The use of basil OE was more effective against trophozoites of *T. gallinae* with increasing concentrations of essential oil and nanoemulsion in a time of 12 hours. The efficacy of EO of basil and eucalyptus only reached 100% efficacy after 24 hours of contact.

These results aim at the possibility of using essential oils and nanoemulsions as anti-*trichomonas* agents in various concentrations and may suggest the potential of these plants for the treatment of metronidazole resistant *T. gallinae* isolates. However, more comprehensive studies are needed to research the anti-*trichomonas* activities of essential oils and nanoemulsions under *in vivo* conditions.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful for the financial support of FAPERGS and CAPES for the ADR / 2017 process. Thanks to the partnership with the UFN of Santa Maria, thanks to the help of free and nanostructured essential oils.

REFERENCES

- ABD EL-RAHMAN, M. A. M. et al. Some Studies on Trichomoniasis of Pigeons at Qualiobia Governorate. **Egyptain Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology**, v. 21, n. 2, p. 123-141, 2008.
- ADEBAJO, A. C. et al. Anti-trichomonal, biochemical and toxicological activities of methanolic extract and some carbazolealkaloids isolated from the leaves of *Murraya koenigii* growing in Nigeria. **Phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 246-254, 2006.
- ADUKWU, E. C. et al. 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.
- AMIN, A. et al. Trichomonads in birds - a review. **Parasitology**, v. 141, n. 5, p. 733-47, 2014.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmacology Research**, v. 28, n. 5, p. 978-85, 2011.
- ARTHAN, D. et al. Inhibitory effects of Thai plants b-glycosides on *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 443-448, 2008.
- AYDIN, L.; COŞKUN, Ş. Efficacy of carnidazole (Spatrix®) and metronidazole (Flagyl®) against *Trichomonas gallinae* in aturally infected pigeons. **Acta Parasitology Turcica**, v. 24, n. 1, p. 65-66, 2000.
- BAHAMONDE-NORAMBUENA, D. et al. Polymeric nanoparticles in dermocosmetic. **International Journal of Morphology**, v. 33, p. 1563-1568, 2015.
- BARBOSA, E. et al. *In vivo* anti giardial activity of three flavonoids isolated from some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 552–554, 2007.
- BARROS, L. M. et al. Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Essential Oil. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 1-9, 2016.
- BATISH, D. R. et al. Eucalyptus Essential Oil as a Natural Pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 2166-2174, 2008.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antio-xidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-6, 1996.

BONDURANT, R. H.; HONIGBERG, B. M. **Trichomonads of veterinary importance**. In: KREIER, J. P. (Ed.). **Parasitic Protozoa**. New York, NY, USA: Academic Press, 1994. p. 111-188.

BOYOM, F. F. et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1269-1275, 2003.

BRANDÃO, J.; BEAUFRÈRE, H. Clinical update and treatment of selected infectious gastrointestinal diseases in avian species. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 22, n. 2, p. 101-117, 2013.

BUNBURY, N. et al. Epidemiology and conservation implications of *Trichomonas gallinae* infection in the endangered Mauritian Pink Pigeon. **Biological Conservation**, v. 141, n. 1, p. 153-161, 2008a.

BUNBURY, N. et al. Causes of mortality in free-living Mauritian pink pigeons *Columba mayeri*, 2002-2006. **Endanger Species Research**, v. 9, p. 213-220, 2008b.

CARSON, C. F. et al. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CHAGAS, A. C. de S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHAKRAVARTHI V. P.; BALAJI, S. N. Applications of Nanotechnology in Veterinary Medicine. **Veterinary World**, v. 1.3, n. 10, p. 477-480, 2010.

CODEVILLA, C. F. et al. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 142-151, 2015.

DIAMOND, L. S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **The Journal of Parasitology**, v. 43, n. 3, p. 488-490, 1957.

ELDIN, H. M. E.; BADAWY, A. F. *In vitro* anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Pistacia lentiscus* mastic and *Ocimum basilicum* essential oil. **Journal of Parasitology Diseases**, v. 39, n. 3, p. 465-473, 2015.

FENEQUE, J. Nanotechnology: a new challenge contributing to the creation of changes in veterinary for veterinary medicine. **The Pet Tribune**, v. 6, n. 5, p. 16, 2000.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

- FORRESTER, D. J.; FOSTER, G. W. Trichomonosis. In: ATKINSON, C. T.; THOMPSON, N. J.; HUNTER, D. B. (Ed.). **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008.
- FRANSSEN, F. F. J.; LUMEIJ, J. T. *In vitro* nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 409-415, 1992.
- FRONZA, T. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-556, 2004.
- GERHOLD, R. et al. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae* morphologic complex in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1335-41, 2008.
- GODOI, S. N. et al. Evaluation of stability and *in vitro* security of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil. **BioMed Research International**, v. 17, p. 1-10, 2017.
- GONZA'LEZ-COLOMA, A. et al. Antileishmanial, antitrypanosomal and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. **Parasitology Research**, v. 110, n. 4, p. 1381-1392, 2011.
- GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 101-3, 2004.
- GÜNDEL, S. S. et al. Basil oil-nanoemulsions: development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 378-383, 2018.
- HAMMER, K. A. et al. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 2, p. 170-3, 2008.
- HARLIN, R.; WADE, L. Bacterial and parasitic diseases of Columbiformes. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 453-73, 2009.
- HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 1, p. 78-84, 2010.
- IBRAHIM, A. N. Comparison of *in vitro* activity of metronidazole and garlic-based product (Tomex®) on *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2063-7, 2013.
- JITVIRIYANON, S. et al. *In vitro* study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 96-102, 2016.
- KANOJIYA, D. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of extracts of leaves of *Eucalyptus globulus* on ovine gastrointestinal nematodes. **Parasitology Research**, v. 114, n. 1, p. 141-148, 2014.

KOCAN, R. M. Various grains and liquid as potential vehicles of transmission for *Trichomonas gallinae*. **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, v. 5, n. 3, p. 148-9, 1969.

KRONE, O. et al. Prevalence of *Trichomonas gallinae* in northern goshawks from the Berlin area of northeastern Germany. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 2 p. 304-9, 2005.

LEONG, T. S. H. et al. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasound Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721-727, 2009.

LUMEIJ, J. T.; ZWIJNENBERG, R. J. G. Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). **Avian Pathology**, v. 19, p. 165-166, 1990.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, G. A. et al. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils ex-tracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipice-phalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 108, n. 2, p. 481-487, 2011.

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. O/W nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Techno-logy**, v. 31, p. 17-22, 2010.

MATOS, F. J. de et al. Craveiro. **Constituintes Químicos Ativos e Propriedades Biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras**. 2. ed. Fortaleza: EDIÇÕES UFC, 2004.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

MEHLHORN, H. et al. Entomological survey on vectors of Bluetongue virus in North Rhine-Westphalia (Germany during 2007–2008). **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 321-9, 2009.

MUNOZ, E. et al. *In vivo* and *in vitro* sensitivity of *Trichomonas gallinae* to some nitroimidazole drugs. **Veterinary Parasitology**, v. 78, n. 4, p. 239-46, 1998.

NAIR, J. et al. A nutritional evaluation of common barley varieties grown for silage by beef and dairy producers in western Canada. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 96, n. 4, p. 598-608, 2016.

NIKPAY, A.; SOLTANI, M. *In vitro* anti-parasitic activities of *Pulicaria dysenterica* and *Lycopus europaeus* methanolic extracts against *Trichomonas gallinae*. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 112-118, 2018.

PURPLE, K.; GERHOLD, R. Persistence of Two Isolates of *Trichomonas gallinae* in Simulated Bird Baths with and Without Organic Material. **Avian Diseases**, v. 59, n. 4, p. 472-474, 2015.

ROBINSON, R. A. et al. The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant in British non-passerines. Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. **Plos One**, v. 5, n. 8, p. 1234-1245, 2010.

ROUFFAER, L. et al. Racing pigeons: a reservoir for nitro-imidazole-resistant *Trichomonas gallinae*. **The Journal of Parasitology**, v. 100, n. 3, p. 360-3, 2014.

SALAMANCA-BUENTELLO, F. et al. Nanotechnology and the Developing World. **PLoS Med**, v. 2, n. 5, p. 97, 2005.

SCHMALTZ, C. et al. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p.80-85, 2005.

SEDDIEK, 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.

SENA-LOPES, Â. et al. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine; Pharmacotherapy**, v. 89, p. 284-287, 2017.

SILVA, G. A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurology**, v. 61, n. 3, p. 216-220, 2004.

SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277-283, 2003.

SOBEL, J.D.; KAYE, D. Urinary tract infections. In: Mandell Gl, Bennett JC, Dolin R., editors. Mandell,

Douglas, and Bennett's: **Principles and Practice of Infectious Disease**. 7. Elsevier; PA, USA: 2010. p. 957–985.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid ; Interface Science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-41, 2012.

STABLER, R. M. *Trichomonas gallinae*. A review. **Experimental Parasitology**, v. 3, n. 4, p. 368-402, 1954.

STOCKDALE, J. E. et al. The protozoan parasite *Trichomonas gallinae* causes adult and nestling mortality in a declining population of European Turtle Doves, *Streptopelia turtur*. **Parasitology**, v.142, n. 3, p. 490-498, 2015.

TABARI, M. A. et al. Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in Pigeon (*Columba livia domestica*), **British Poultry Science**, v. 58, n. 3, p. 236-241, 2017.

TRADOS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. São Paulo: ESALQ/USP, 2003. 26p.

WEN-CHIEN, L. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82-89, 2018.

XAVIER, M. N. et al. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1433, 2016.

YOUSSEFI, M. R. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. **Iran Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 25-29, 2017.

4.2 Artigo 2

Artigo publicado na Revista Avicenna Journal of Phytomedicine

In vitro and in vivo activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*

Bruna Baccega^{1*}, Yan Wahast Isalabão¹, Alexia Brauner de Mello¹, Filipe Obelar Martins¹, Carolina Caetano dos Santos¹, Aline Ferreira Ourique², Samanta da Silva Gündel², Marcia Raquel Pegoraro de Macedo¹, Elvia Elena Silveira Vianna¹, Nara Amélia da Rosa Farias¹, Camila Belmonte Oliveira¹

In vitro* and *in vivo* activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae

Bruna Baccega^{1*}, Yan Wahast Islabão¹, Alexia Brauner de Mello¹, Filipe Obelar Martins¹, Carolina Caetano dos Santos¹, Aline Ferreira Ourique², Samanta da Silva Gündel², Marcia Raquel Pegoraro de Macedo¹, Elvia Elena Silveira Vianna¹, Nara Amélia da Rosa Farias¹, Camila Belmonte Oliveira¹

¹Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

²Laboratory of Nanotechnology, Franciscan University, Santa Maria, RS, Brazil

Article history: Received: Nov 11, 2019

Received in revised form: Apr 14, 2020

Accepted: Apr 17, 2020 Epub ahead of print

Corresponding Author: Tel: (+55) 053 3275-7618

Email brubaccega@hotmail.com

Keywords:

Phytotherapy

Nanotechnology

Birds

Protozoa

Lemon grass

Abstract

Objective: This study was done to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of the essential oil (OE-CL) and nanoemulsion (N-CL) of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*.

Materials and Methods: *In vitro* assays were done with 10⁶ parasites and OE-CL and N-CL in the concentrations: 110, 220, 330, 440, 550, 660, 770 and 880 µg/ml and four controls: CN (culture medium and trophozoites), MTZ (trophozoites plus 800 µg/ml of metronidazole), TW (trophozoites plus vehicles used for solubilization of derivatives (0.01% Tween) and NB (blank nanoemulsion 880 µg/ml). The *in vivo* assay was done in 35 quails (*Coturnix coturnix*) infected experimentally 4x10⁴ mg/kg, were divided in seven groups (n=5): A (control-healthy), B (control infected), C (control TW 0.01%), D (NB 0.88 mg/kg), E (drug MTZ 25 mg/kg), F (OE-CL at 0.55 mg/kg) and G (N-CL at 0.44 mg/kg), during 7 consecutive days.

Results: The *in vitro* test showed that the OE-CL (550 µg/ml) and N-CL (440 µg/ml) concentrations reduced the trophozoites viability in 100%. In the *in vivo* test, the treatment with OE-CL was efficient on the 4th treatment day and the N-CL after the 3rd day, and the MTZ in the therapeutic concentration was efficient on the 7th day.

Conclusion: It can be observed in this study that the lemon grass has natural potential antitrichomonal activity against *T. gallinae* *in vitro* and *in vivo*.

Please cite this paper as:

Baccega B, Wahast Islabão Y, Brauner Mello A, Obelar Martins F, Caetano dos Santos C, Ferreira Ourique A, da Silva Gündel S, Raquel Pegoraro de Macedo M, Elena Silveira Vianna É, Amélia da Rosa Farias N, Belmonte

Oliveira C. *In vitro* and *in vivo* activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*. Avicenna J Phytomed, 2020. Epub ahead of print.

Introduction

Trichomonas gallinae is a eukaryotic organism, belonging to the Protist Kingdom (Gaspar da Silva et al., 2007). The infection by the flagellated protozoan, affects primarily the upper digestive and respiratory tract of birds (Columbiformes,

Falconiformes, Psittaciformes, Passeriformes and Galliformes) (Forrester and Foster, 2009). Occurring in sylvan birds, as well as in captivity, being which has pigeons (*Columba livia*) as responsible for its distribution, one of its main hosts. (Forrester and Foster, 2009; Bunbury et al., 2007).

For the treatment of this parasitoses, nitroimidazoles such as metronidazole and tinidazole are used, however, the treatment features therapeutic failures like adapted protocols and resistance of isolates and strains (Dunne et al., 2003; Upcroft et al., 2001; Dingsdag and Hunter, 2018, Zimre Grabensteiner et al., 2011 and Cudmore et al., 2004). Besides, these active principles can present toxicity, and administration of drugs in long-term treatment has carcinogenic potential, possibly due to the relation with DNA, proteins and cell membranes (Hussein et al., 2011; Rein, 1995; Tracy and Webster, 1996).

New alternatives are necessary to provide a substitute treatment against this protozoan as the use of essential oils (OEs) (Seddiek et al., 2011; Tabari et al., 2017; Youseffi et al., 2017) and the *Cymbopogon* genus, the *C. flexuosus* botanical species known as lemon grass, is a plant that produces high levels of OE when cultivated in tropical and subtropical regions worldwide and it has been gaining prominence in the use against parasitoses like *Leishmania* (L.) *chagasi*, and *Trypanosoma cruzi* (Ganjewala and Luthra, 2010; Santoro et al., 2007; Oliveira et al., 2012). OEs can suffer environmental variations and the use of nanostructured systems is an efficient strategy to prevent its degradation, improving the beneficial effects and the release of active compounds (Fang et al., 2010; Hosseini et al., 2013). In this context, this study had the objective to investigate the *in vitro* and *in vivo* *Trichomonas* activity in quails (*Coturnix coturnix japonica*) of the essential oil and *Cymbopogon flexuosus* (CF) nanoemulsion.

Materials and Methods

Reagents

CF was commercially acquired from FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda. Polysorbate 80 was acquired from Synth (Brazil), Sorbitan monooleate, MTZ (metronidazole) and meio de cultivo utilizado foi trypticase-extrato de levedo-maltose (TYM) was obtained from Sigma-Aldrich®, Deisenhofen, Germany and sterile adult bovine serum (SBA), from Bio Nutrients.

Development and characterization of nanoemulsion

The OE-CL and N-CL were supplied by the Nanotechnology Laboratory of the Universidad Fransciscana (UFN). The characterization OE-CL followed the method described by Hussain et al. (2010) with modifications (Gündel et al., 2018), using the Varian Star 3400 CX gas

chromatograph (CA, USA). For the qualitative analysis of the compounds, a Shimadzu QP2010 Plus gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC/MS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used (Gündel et al., 2018).

Development of nanoemulsion

The N-CL oil was developed using the homogenization under high agitation method, following the methodologies described by Gündel et al. (2018). The formulations were composed of an oil phase containing OE-CL (5%) and sorbitan monooleate surfactant (2%), while the aqueous phase was composed of polysorbate 80 (2%) and ultrapure water. Both phases were homogenized separately with the aid of a magnetic stirrer, then the aqueous phase was placed in the Ultra-Turrax® (IKA, Germany) equipment for 10 min at 10,000 rpm. Subsequently, the oil phase was injected into the aqueous phase, and maintained in the Ultra-Turrax® for 30 min at 17,000 rpm, with temperature control. The blank nanoemulsion was developed using a medium chain triglyceride, derived from caprylic and capric acids (Gündel et al., 2018).

Characterization of nanoemulsion

The physicochemical characterization of the formulation was done by determining the mean droplet size, polydispersity index, zeta potential and pH. The mean droplet size and polydispersity index were determined by the dynamic light scattering technique (Zetasizer® equipment, nano-ZS model ZEN 3600, Malvern) after sample dilution (500 times) in ultrapure water. The zeta potential was determined using the

electrophoretic mobility technique (Zetasizer® equipment, nano-ZS model ZEN 3600, Malvern) after sample dilution (500 times) in aqueous solution of sodium chloride (10 mM). The pH was determined using a potentiometer (DM-22, Digimed®) previously calibrated with standard solution, and the readings were carried out directly in formulations. The formulation of the N-CL remained stable under refrigeration for up to 90 days. The readings were done in triplicate and the results are expressed as mean±standard deviation (Gündel et al., 2018).

Trichomonas gallinae

Samples of *T. gallinae* were recovered by the wet mount method of naturally infected pigeons. Twelve native pigeons (*C. livia*) (2 to 8 weeks old) were captured in their nests in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul.

Using swabs, samples were taken from the oral cavity, and from membranous lesions of the oropharyngeal region of domestic pigeons (*C. livia*). The culture of the parasite was prepared by immersion of

oral swabs in tryptone/ yeast extract/maltose médium (TYM) (Diamond, 1957) supplemented with 10% adult fetal serum, antibiotic (meropenem), antifungal (amphotericin B) (Sigma-Aldrich®) and incubated at 37°C (Sansano et al., 2009). The cultures were then examined under an optical microscope at (100 and 400x) for mobile trophozoites observation.

Cultures were observed over seven consecutive days to verify the growth of trophozoites. At every 48 hr, trophozoites that had more than 95% mobility and normal morphology were subcultures (Seddiek et al., 2014).

Molecular analyses

To confirm the *Trichomonas* species, we did molecular analyses and construct the phylogenetic tree of genera. For the extraction of total genomic DNA, the culture medium sample from the *in vitro* test of *T. gallinae* was used, applying a commercial DNA- GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) according to the manufacturer's instructions.

To verify the parity of the *T. gallinae* DNA sample, Trichomonad small subunit (SSU) rRNA primers (forward– TACTTGGTTGATCCTGCC and reverse-TCACCTACCGTTACCTTG) and the ITS-1 rDNA sequences were amplified by PCR using the ITS1R-ITS1F and primers were modified according to Cepicka et al (2005). The PCR reaction was run in the final 25 µl volume using Promega PCR Master Mix (Promega Corporation, WI, USA), 20 pM of each primer, and 100-150 ng DNA template. The amplification comprises a denaturation step of 5 min to 95 °C hence of 40 repeats of 60 sec at 95 °C, 30 sec at 56° C and 30 sec at 72° C and a final extent at 72° C for 10 min. A positive control (*Caracara plancus*) and a negative control sample were used for each amplification reaction. The amplicons were verified by agarose gel electrophoresis (2%) and observed by staining with Blue Green 1X DNA loading dye (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil). The amplification products were purified using the Illustra GFX (GE Healthcare) PCR and gel DNA purification kit and the DNA strand was sequenced directly (Macrogen; <http://www.macrogen.com>). The sequence results were matched with the NCBI/Genbank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).

The SSU sequences were used to construct the phylogenetic tree, in software MegaX (Kumar et al, 2018). The phylogenetic trees were inferred using the Neighbor-Joining method and Maximum Likelihood. The robustness of the trees was evaluated using bootstrapping with 1000 replicates.

In vitro assay

To examine the susceptibility of *T. gallinae* to free and nanostructured oils, sterile 96-well plates were used for incubation with different concentrations of OE free and nanostructured. The N-CL was applied to the *in vitro* assay after seven days of the preparation of its formulation.

The parasites were seeded at an initial density of 10⁶ trophozoites/ml of TYM and incubated with the oil and N-CL. Four controls were considered: A (trophozoites only), B (trophozoites plus the vehicle used for solubilization of the derivatives (0.01% Tween (TW)), C (trophozoites plus 880 µg/ml metronidazole (MTZ), as positive control) and D (blank nanoemulsion (NB) 880 µg/ml).

Free OE-CL and nanostructured were added to the wells to obtain final concentrations of 110, 220, 330, 440, 550, 660, 770 and 880 µg/ml, respectively. Subsequently, to generate anaerobic conditions, the microculture plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h. After this period, a preparation with trophozoites, containing trypan blue (0.4%) (1:1), was evaluated in Neubauer chamber. Cultures with viability equal to or greater than 95% were used for assays, having considered motility, morphology and exclusion by dye.

The IC₅₀ (half the maximal inhibitory concentration) was determined for the oil and N-CL. A kinetic growth curve was constructed to obtain the profile of comparable activity of OE and N-CL compounds against *T. gallinae* trophozoites.

Only the concentrations of OE and/or N-CL that showed a reduction in the viability of the trophozoites to 100%, were used to determine the MIC (minimum inhibitory concentration). The trophozoites used to establish MIC and below and above concentrations, as well as inoculated controls in fresh TYM medium at 37°C, were counted in Neubauer chamber with trypan blue every 24 hr for 96 hr to confirm MIC.

The best concentration, presented after MIC free oil analysis and N-CL OEs, was conducted at the following times: 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hr by the dye exclusion method. The IC₅₀ was determined at varying concentrations, as described in the MIC method. A death time curve was constructed to obtain an activity profile of the efficiency of the free oil and N-CL against *T. gallinae* flagellate trophozoites. All assays were performed independently in nonoplicate (Sena- Lopes et al., 2017).

Animals

Quails (*C. coturnix japonica*), females, at 6 weeks old and average weight of 115 g, were allocated in specific cages for the species, separated and fed with ration diet (100 to 120 g/bird/day) and water *ad libitum* and went through a 15-day adaptation period. Afterward, they were infected experimentally by oral inoculation, with 4×10^4 trophozoites. From the seventh day after infection, trophozoites were observed in the birds. These ones were examined daily, for 15 days, by wet mounting method and observed under optical microscope, to confirm the infection. The body weight of the quails was evaluated in the beginning and at the end of the experiment.

***In vivo* assay**

The birds were divided in seven groups (n=5): A (control–healthy), B (control infected), C (control TW 0.01%), D (NB 0,88mg/kg), E (MTZ 25 mg/kg), F (OE-CL at 0.55 mg/kg) and G (N-CL at 0.44 mg/kg). The treatments were managed orally (gavage) once a day, during 7 consecutive days (Youssefi et al., 2017).

Committee of ethics

The Committee of Ethics in the use of Animals of the Federal University of Pelotas, under the protocol 23110.005097/2017-51 and 23110.012860 2018-81 and SISBIO under number 61235-1 approved this research.

Analyze statistical

Statistical analysis was performed by univariate analysis of variance (ANOVA) using a probability value of $p \leq 0.05$, followed by the Tukey Test (GraphPad Prism 8.0 Software).

Results

Characterization OE-CL

The chemical components of OE-CL was determined by gas chromatography. The major compounds were β -geranial (45.74%), Z-citral (34.42%) and geraniol (6.01%), respectively.

Characterization of N-CL

All N-CL presented a polydispersity index lower than 0.3, indicating homogeneity of droplet size and characterizing a monodisperse system despite the use of non-ionic surfactants in the formulation, the N-CLs had slightly negative zeta potential.

N-CL is formed by mixing two immiscible liquids stabilized by surfactants, ranging in size from 20 μm to 500 nm. The N-CL developed in the present study had an average droplet size of less than 200 nm. The results of the characterization of N-CL with OE and white N-CL, according to mean size, polydispersion index, zeta potential and pH, are shown in Table 1.

The under-refrigeration N-CLs were stable for 90 days as the parameters were maintained when compared to the parameters immediately after preparation.

Molecular results

The *T. gallinae* isolate was confirmed by equivalence with the Genbank isolates.

***In vitro* assay**

The results of the *in vitro* study on the anti-trichomonal inhibitory effect of OE, N-CL and MTZ. The comparison of this activity with the CN (negative control) is presented in Figure 1. Neither OE-CL nor N-CL presented toxicity at the concentrations used in the study, being tested on other micro-organism.

For the N-CL after 24 hr incubation at 440 $\mu\text{g/ml}$ concentration and 550 $\mu\text{g/ml}$ for OE-CL, 100% unviable trophozoites in the culture medium was found (Figure 3). The MICs (minimum inhibitory concentration) of the free OE-CL and the N-CL were 528 and 418 $\mu\text{g/ml}$. IC₅₀ values (minimum inhibitory concentration) were set at 110 $\mu\text{g/ml}$ for N-CL and 220 $\mu\text{g/ml}$ for free OE-CL. The growth of the trophozoites was completely inhibited by the free and nanostructured OE of lemon grass in 12 hr incubation (Figure 4).

***In vivo* assay**

After the treatment with OE-CL trophozoites, the absence in 4-day post treatment birds (n=5) was observed, and until the 7th day, none of the birds of this group has presented viable forms of trophozoite in the swabs culture through 24 and 48 hr, comparing to all other group controls ($p < 0.05$). The treatment with N-CL presented efficiency on the 3rd day of treatment with the trophozoites absence (n=5) after 4th day of treatment, none of the birds of this group has presented viable trophozoites in the culture until the 7th day. The MTZ presented trophozoites absence in the birds on the 7th day of treatment. During the experiment deaths did not occur and there was no adverse effect observed in the treated animals. During the treatment (30 days), the body weight and laying of the treated quails and the groups controls have not shown changes (Figure 5).

Discussion

Drugs like MTZ, dimetridazole, ronidazole and carnidazole, are considered efficient against trophozoites of *T. gallinae* (Franssen and Lumeij, 1992). The existence of resistant strains to the *in vivo* nitroimidazoles has already been demonstrated in several countries (Lumeij and Zwijnenberg (1990), Franssen and Lumeij (1992), Gerhold et al. (2008), Munoz et al. (1998), Rouffaer et al. (2014), Tabari et al. (2017), and threaten bird health, causing economic losses (Bondurant and Honigberg, 1994). This work is pioneer in studies related to OE-CL and N-CL on the *T. gallinae* flagellated protozoan in Brazil.

In our study, we used the lemon grass and in the gas chromatographic analysis, it was observed that β -geranial (45.74%), Z-citral (34.42%) and geraniol (6.01%) are the main constituents of OE. Adukwu et al. (2012) and Ahmad and Viljoen (2015) in their studies also identified Z-citral and β -geranial as main compounds of OE-CL, where they have found values of 33 to 32.9% of Z-citral and 47 and 46.1%, of β -Geranial, respectively, corroborating our results. Variations in the chemical constituents occur due to several factors: seasonality, temperature, water availability, among others (Xavier et al., 2016).

The OE-CL trichomonacidal action in different concentrations could be related to the bioactive compounds of *C. flexuosus* that have antioxidant and fungicidal activities. One of the compounds is the citral (Silva et al. (2008; Shukla et al. 2009), that owns its ability to destroy the cell membrane integrity, releasing the cell compounds of *Geotrichum citri-aurantii* (Zhou et al., 2014) through a mechanism of cell membrane damage, compromising integrity and permeability (Tao et al., 2014).

Other natural compounds were efficient against *Trichomonas* spp. if compared to MTZ as presented in our study. Tabari et al. (2017) observed the efficiency of the OE *Pelargonium roseum* in pigeons, as on the 6th day of treatment, trophozoites were not observed. In our study, the nanoemulsion presented similar results on the 3rd day and the oil on the 4th day of treatment. Youssefi et al. (2017) by analyzing the *in vitro* and *in vivo* effect of *Artemisia sieberi*, have found in the *in vivo* test that the treatment with OE at a dose of 50 mg/kg after 4 days led to the full recovery of the infected pigeons. The results obtained at the treatment with *C. flexuosus* free essential oil, corroborate with this study.

The N-CL used in this study has stability for a period of 90 days under refrigeration, when compared to the obtained parameters as soon as the preparation. Sonnevile-Auburn et al. (2004), have considered emulsion of an average droplet diameter (Z) less than 300 nm as nanoemulsion, corroborating our study, in which N-CL had a diameter less than 200 nm. Minor emulsions diameters are more stable (Mehlhorn et al., 2009). The stability is due to the use of surfactants in their formulation, increasing the availability and low interfacial tension penetration (Solans et al., 2005).

The greatest effectiveness ($p < 0.05$) of nanoemulsion is compared to the essential oils in the *in vitro* and *in vivo* tests, could be attributed to the reduction of particle size, increase of bioavailability of chemical compounds and the surface charge of nanoemulsion droplets (potential zeta). However, in this study, there was not an electrostatic attraction, because N-CL has negative charges and the membrane of trophozoites is composed mainly of sialic acid, which also contributed to the protozoan negative charge (Costa e Souza, 1986). The relevance of researches with nanostructured systems with bioactives from plants is evident, as seen in works of Bahamond et al. (2015) and Wen-Chien et al. (2018). When the results of the standard drug used (MTZ) are compared, it has been different from the one in this study, which only presented the total elimination of the parasite from the 7th day of treatment. The

OE-CL transport using N-CL is a new alternative to overcome limitations like hydrophobicity and volatility, reducing the drugs dose, and increasing the bioavailability and the potential effects of toxicity (Sun et al., 2012, Salem et al., 2015).

Nair et al. (2016) claimed that the therapeutic efficiency of many compounds, when associated to the nanotechnology, due to better solubilization, higher bioavailability and protection of the active principle against the enzymatic and hydrolytic degradation, occur. Our results showed a higher N-CL efficiency, which could be attributed to a greater penetration of nanoemulsion in the receptors present in the protozoan membrane, leading to a greater interaction between them. The higher the concentration of N-CL dose-dependent efficacy increases, occurring 100% of mortality in the greatest tested concentrations, demonstrating that the nanoparticles size (200 nm) increases the bioavailability, facilitating the EO activity (Trados et al. (2004).

In the *in vitro* test, the OE-CL and N-CL were able to reduce the viability of *T. gallinae*. *T. gallinae* trophozoites causing the cell death in different concentrations. The use of OE-CL was more effective against *T. gallinae* trophozoites with increasing concentrations of OE-CL and N-CL in the period of 12 hours, when compared to MTZ that took 24 hours. In the *in vivo* test, N-CL and OE-CL were more effective than the drug of choice, being able to eliminate the protozoan of the treated birds in 3 days for the N-CL use and 4 days for the OE-CL use, while MTZ only can eliminate the protozoan of all the treated birds after 7 days. The data obtained in this study introduced lemon grass like a natural anti-trichomonas agent, effective against trophozoites. The main chemical constituents of lemon grass can be considered like effective compounds for future researches and development of new anti-*T. gallinae* agents.

The isolated sample showed 99% similarity to the *T. gallinae* strains of *Acridotheres tristis*, Iran (KT869157.1), *Melopsittacus undulates*, Iran (KT869155.1), *Columbia livia*, China (MH733817.1), *Streptopelia decaocto*, Malta (KX844991.1), *Columba oenas*, Germany (KX459445.1), *Bubo bubo*, Spain (KX514378.1), *Serinus canaria* f. *domestica*, Slovenia (KX584000.1) and *Aquila pennata*, Spain (KP900042.1). On the other hand, the analysis among *Trichomonas* species, through ITS-1 rDNA (Figure 1) and SSU rDNA 18S (Figure 2), *Trichomonas gallinae* is in sister position of *T. canistomae* and *T. bixi*, both isolate of oral cavity from dogs and more distant of *T. vaginalis*.

Acknowledgment

The authors are grateful for the financial support of FAPERGS for the ADR/2017 process. Thanks for the partnership with UFN of Santa Maria, thanks for the help of free essential and nanostructured oils. This study was carried out with the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel-Brazil (CAPES) Financing Code 001.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adukwu EC, Allen SC, Phillips CA. 2012. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol, 113:1217-27.
- Ahmad A, Viljoen A. 2015. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. Phytomedicine, 22:657-665.
- Bahamonde-Norambuena D, Molina-Pereira A, Cantin M, Muñoz M, Zepeda K, Vilos C. 2015. Polymeric nanoparticles in dermocosmetic. Int J Morphol, 33:1563-1568.
- Bondurant RH, Honigberg BM. 1994. Trichomonads of veterinary importance. In: Academic Press (Eds.), Parasitic Protozoa, p. 111–206, New York.
- Bunbury N, Jones CG, Greenwood AG, Bell DJ. 2007. *Trichomonas gallinae* in Mauritian Columbids: Implications for an endangered endemic. J Wild Dis, 43:399– 407.
- Cepicka I, Kutišová K, Tachezy J, Kulda J, Flegr J. 2005 Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. Vet Parasitol, 128:11–21.
- Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. 2004. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev, 17:783-93.
- Diamond, LS. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J Parasitol, 43:488-490.
- Dingsdag SA, Hunter N. 2018. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. J Antimicrob Chemother, 73:265-79.
- Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Res, 13:239-49.
- Fang L, Du D, Ding GZ, Si YK, Yu SS, Liu Y, Wang WJ, Ma SG, Xu S, Qu J, Wang JM, Liu YX. 2010. Neolignans and glycosides from the stem bark of *Illicium difengpi*. J Nat Product, 73: 818-824.
- Forrester DJ, Foster GW. 2009. Trichomonosis. In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J.; Hunter, D.B. (Eds.), Parasitic Diseases of Wild Birds, pp.120-153, Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Franssen FFJ, Lumeij JT. 1992. *In vitro* nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). J Vet Pharmacol Therapeut, 15:409–415.
- Ganjewala D1, Luthra R. 2010. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. Nat Prod Commun, 5:163-72.
- Gaspar da Silva D, Barton E, Bunbury N, Lunness P, Bell DJ, Tyler KM. 2007. Molecular identity and heterogeneity of trichomonad parasites in a closed avian population. Infect Genet Evolut, 7:433-440.

Gerhold RW, Tate CM, Gibbs SE, Mead DG, Allison AB, FISCHER JR. 2007. Necropsy findings and arbovirus surveillance in mourning doves from southeastern United States. *J Wild Dis*, 43:129-135.

Gündel SS, de Souza MB, Quatrin PM, Klein B, Wagner R, Gündel A, Vaucher R de A, Santos RCV, Ourique AF. 2018. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. *Microb Pathog*, 118:268-276.

Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydr Polym*, 95:50-56.

Hussain AI, Anwar F, Shahid M, Ashraf M, Przybylski R, 2010. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. *J Essent Oil Res*, 22:78-84.

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.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evolut*, 35:1547-1549.

Lumeij JT, Zwijnenberg RJG. 1990. Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). *Avian Pathol*, 19:165-166.

Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Schmahl G, Al-Quraishy A, Walldorf U, Mehlhorn B, Bätza HJ. 2009. Entomological survey on vectors of Bluetongue virus in North Rhine-Westphalia (Germany during 2007–2008). *Parasitol Res*, 102:321-9.

Munoz E, Castella J, Gutierrez J. 1998. *In vivo* and sensitivity of *Trichomonas gallinae* to some nitroimidazole drugs. *Vet Parasitol*, 31: 239-46.

Nair J, Christensen D, Yu P, Beattie AD, McAllister T, Damiran D, Preston N, Fuhr L, McKinnon JJ. 2016. A nutritional evaluation of common barley varieties grown for silage by beef and dairy producers in western Canada. *Can J Anim Sci*, 96:598-608.

Oliveira MMM, Brugnera DF, Nascimento JA Piccoli RH. 2012. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. *Food and Bioproducts Processing*, 90:809-18.

Rein MF. *Trichomonas vaginalis*. 1995. In: Mandell, Douglas, Bennet. Principles and practice of infectious diseases (Eds.) Churchill Livingstone, 2493-7, New York:

Rouffaer L, Adriaensen C, de Boeck C, Claerebout E, Martel A. 2014. Racing pigeons: a reservoir for nitro-imidazole-resistant *Trichomonas gallinae*. *J Parasitol*, 100:360-3.

Salem W, Leitner DR, Zingl FG, Schratter G, Prassl R, Goessler W, Reidl J, Schild S. 2015. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 305:85–95.

Sansano-Maestre J, Garijo-Toledo MM, Gómez-Muñoz MT. 2009. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. *Avian Pathol*, 38: 201-7.

Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LG, Salgado AP, Mena-Barreto RF, Soares MJ 2007b. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res* 100: 783-790.

Seddiek A, El-Shorbagy MM, Khater HF, Ali AM. 2014. The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitol Res*, 113:1319–1329.

Seddiek SA, Ali MM, Khater HF, El-Shorbagy 2011 Anthelmintic activity of the white wormwood, *Artemisia herba-alba* against *Heterakis gallinarum* infecting turkey poults. *J Med Plant Res*, 5:3946– 3957.

Sena-Lopes Â, das Neves RN, Bezerra FSB, de Oliveira Silva MT, Nobre PC, Perin G, Alves D, Savegnago L, Begnini KR, Seixas FK, Collares T, Borsuk S. 2017. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. *Biomed Pharmacot*, 89: 284-287.

Shukla R, Kumar A, Singh P, Dubey NK. 2009. Efficacy 1 of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil and its monoterpenes aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *Int J Food Microbiol*, 135:165-170.

Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval E.E. 2008. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Braz J Inf Dis*, 12:1763- 1766.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. 2005. Nanoemulsions. *Curr Opin Colloid Int*, 10:102-110.

Sonneville-Aubrun O, Simonnet JT, L'allore F. 2004. Nanoemulsions a new vehicle for skincare products. *Adv Col Interf Sci*, 108-109:145-149.

Sun H, Liu K, Liu W, Wang W, Guo C, Tang B, Gu J, Zhang J, Li H, Mao X, Zou Q, Zeng H. 2012. Development and characterization of a novel nanoemulsion drugdelivery system for potential application in oral delivery of protein drugs. *Int J Nanomed*, 7:5529–5543.

Tabari MA, Youssefi MR, Moghadamnia AA. 2017. Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in Pigeon (*Columba livia domestica*), *Br Poult Sci*, 58: 236-241.

Tao N, OuYang Q, Jia L. 2014. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. *Food Control*, 41:116–121.

Tracy JW, Webster LT. 1996. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: Goodman and Gilman's (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*.: McGraw-Hill Companies, p. 995-8, New York.

Trados T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. 2004. Formation and stability of nano emulsions. *Adv coll Interf Sci*, 108:303-318.

Upcroft P, Upcroft JA. 2001 Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Ver*, 14:150-64.

Wen-Chien L, Huang DW, Wang CR, Yeh CH, Tsai JC, Huang YT, Li PH. 2018. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *J Food Grug anal*, 26:82-89.

Xavier MN, Alves JM, Carneiro NS, Souchie EL, Silva EAJ, Martins CHG, Ambrosio MALV, Egea MB, Alves CCF, Miranda MLD. 2016. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Rev Virt Quím*, 8:1433.

Youssefi MR, Tabari MA, Moghadamnia AA. 2017. *In vitro* and *in vivo* activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. *Iran J Veterin Res*, 18:25.

Zhou H, Tao N, Jia L. 2014. Antifungal activity of citral, octanal and -terpineol against *Geotrichumcitri-aurantii*,” *Food Control*, 37: 277–283.

Zimre-Grabensteiner E, Arshad N, Amin A, Hess M. 2011. Genetically different clonal isolates of *Trichomonas gallinae*, obtained from the same bird, can vary in their drug susceptibility, in vitro evidence. *Parasitol Int*, 60:213-5.

Table 1. Physical-chemical characterization of N-CL

	Average droplet size (nm)	Polydispersit y index	Zeta potential (mV)	pH
N-CL	98±0.82	0.20±0.007	-7.48±1.02	4.00±0.07
Blank nanoemulsion	127±1.02	0.25±0.005	- 6.37±0.58	5.15±0.03

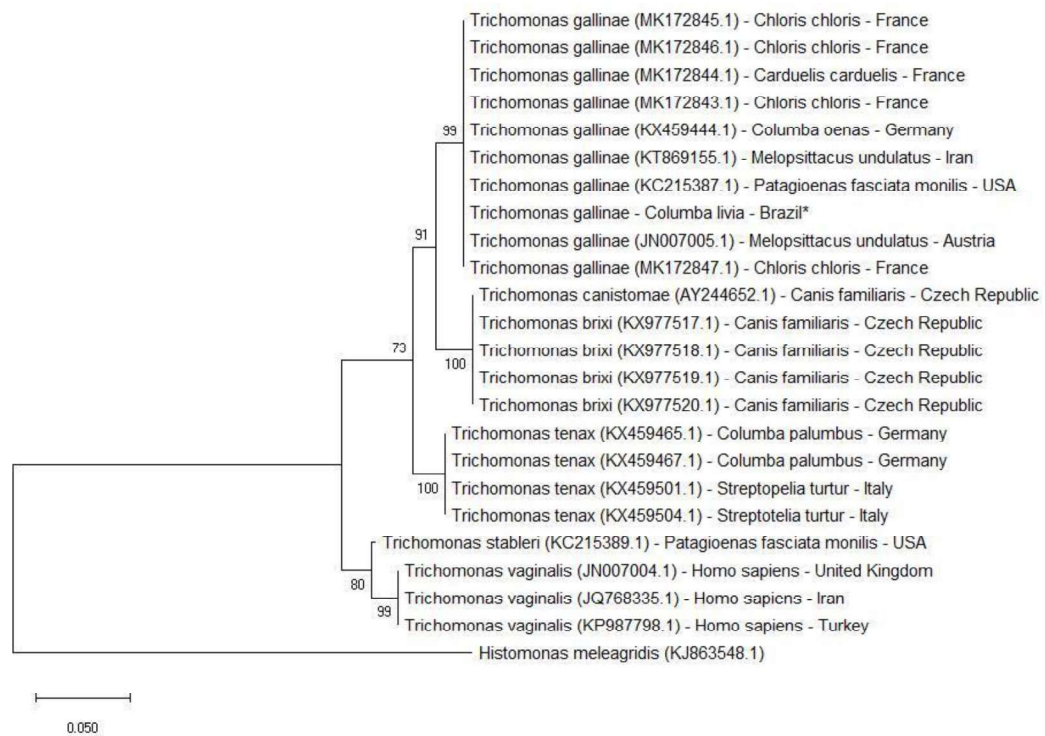


Figure 1. Phylogenetic analysis of the relationship based in ITS-1 rDNA sequences between *Trichomonas gallinae*, *T. bixi*, *T. canistomae*, *T. tenax*, *T. stableri* and *T. vaginalis*. Maximum likelihood tree (24 sequences and 336 sites). Bootstrap support (BS) was calculated for each branch using Mega X. *Histomonas meleagridis* was the outgroup. Star indicates our isolate.

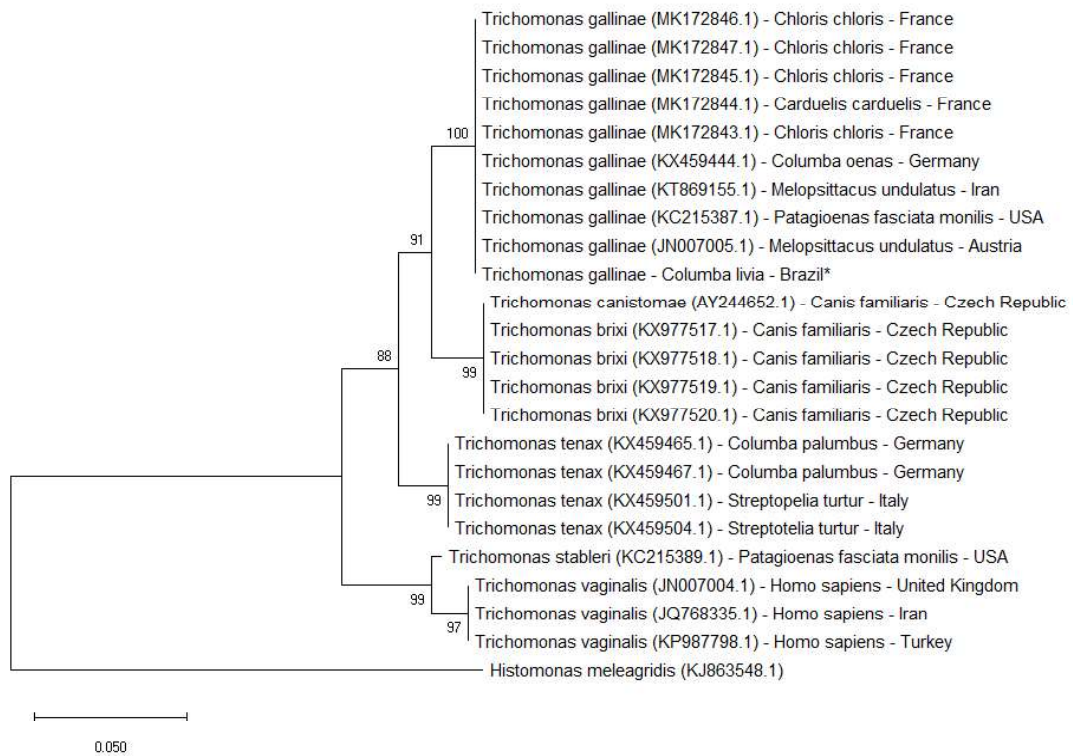


Figure 2. Phylogenetic analysis of the relationship based in SSU rDNA 18S sequences between *Trichomonas gallinae*, *T. bixi*, *T. canistomae*, *T. tenax*, *T. stableri* and *T. vaginalis*. Neighbour-Joining tree (24 sequences and 336 sites). Bootstrap support (BS) was calculated for each branch using Mega X. *Histomonas meleagridis* was the outgroup. Star indicates our isolate.

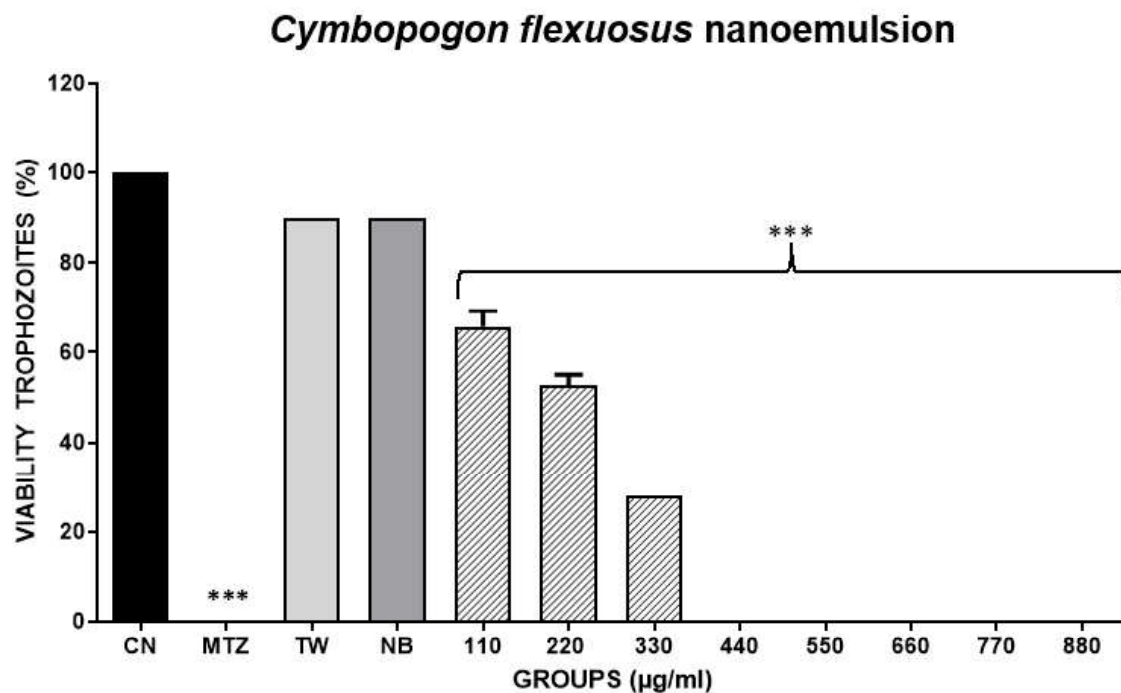
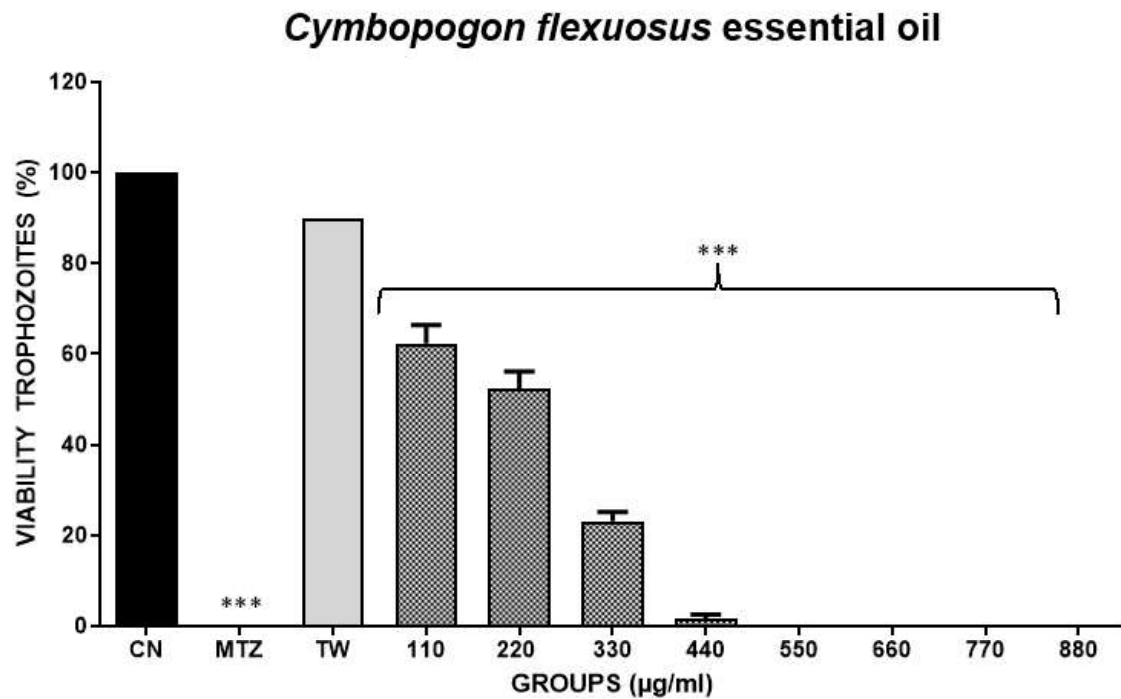


Figure 3. Anti-trichomonas activity in culture medium of the formulations: OE-CL and N-CL their respective at concentrations of 110 µg/mL to 880 µg/ml, as controls: CN (negative control), MTZ (metronidazole 880 µg/ml), (tween 0.01%) and NB (blank nanoemulsion 880 µg/ml). The analyses were done at 24 hr post-treatment. The columns indicate the groups and ***indicates the statistical difference when compared to the MTZ control by Tukey's test ($p < 0.05$).

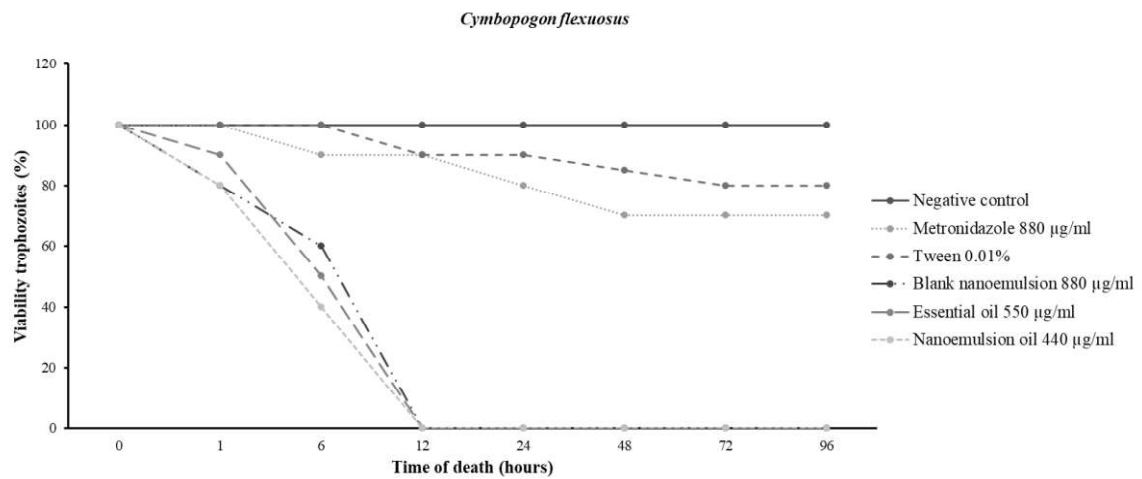


Figure 4. Death time of *T. gallinae* after treatment with negative control group, blank nanoemulsion control, OE-CL and N-CL, in the period of 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hr.

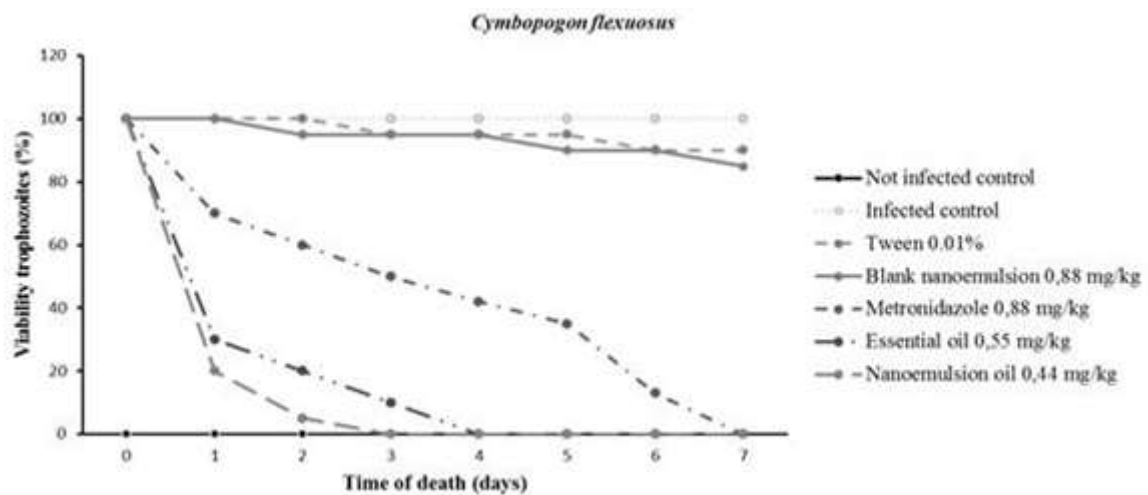


Figure 5. Death time of *T. gallinae* after treatment with the control groups and treatment groups with the standard drug, as well as, the OE-CL and N-CL in the period of 0.1. 2. 3. 4. 5. 6. 7 days.

4.3 Artigo 3

Artigo submetido a Revista Parasitology

***Anti-Trichomonas gallinae* properties of compounds citral and geraniol**

Bruna Baccega¹, Juliana Monteli Fenalti¹, Paloma Taborda Birmann², Alessandra Neis³, Alexia Brauner de Mello¹, Yan Wahast Islabão¹, Francielle Liz Monteiro⁴, Lucielli Savegnago², Silvia de Oliveira Hübner⁴, Rodrigo de Almeida Vaucher⁵, Nara Amélia da Rosa Farias¹, Camila Belmonte Oliveira¹

Anti-*Trichomonas gallinae* properties of compounds citral and geraniol

Bruna Baccega¹, Juliana Monteli Fenalti¹, Paloma Taborda Birmann², Alessandra Neis³, Alexia Brauner de Mello¹, Yan Wahast Islabão¹, Francielle Liz Monteiro⁴, Lucielli Savegnago², Silvia de Oliveira Hübner⁴, Rodrigo de Almeida Vaucher⁵, Nara Amélia da Rosa Farias¹, Camila Belmonte Oliveira¹

¹Laboratório de Parasitologia. Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Brazil.

²Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel

³Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel

⁴Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

⁵Research Laboratory in Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM), Federal University of Pelotas, Pelotas

Abstract

This study was done to evaluate the *in vitro* cytotoxicity, antioxidant and antiparasitic activity of citral (3,7-Dimethyl-2,6-octadienal) and of geraniol (trans-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol). *In vitro* assays were done with 10^6 parasites and citral and geraniol in the concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 μ M, and four controls: CN (culture medium and trophozoites), MTZ (trophozoites plus 100 μ M of metronidazole), TW (trophozoites plus vehicles used for solubilisation of derivatives (0.01% Tween)). Results: The *in vitro* test showed that the citral (60 μ M) and geraniol (50 μ M) concentrations reduced the trophozoites viability in 100%. Our results showed that citral MIC (minimal inhibitory concentration) 60 μ M and 50 μ M inhibit the growth of *T. vaginalis* trophozoites in 12 h of exposure. In the cytotoxicity test the citral further the determination of Reactive Species (ROS) and Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels showed that citral and geraniol have an antioxidant. Molecular docking experiment was demonstrating that there might be a potential for citral and geraniol to inhibit a hydrogen enzyme crucial for *T. gallinae* survival. Conclusion: It is possible to observe in this study that the majority compounds of the lemongrass have natural potential antitrichomonal activity against *in vitro* *T. gallinae*.

Key words: birds, protozoa, treatment, oils, lemon grass.

Key Findings

- An analysis of citral activity revealed that MIC was 60 μ M and IC₅₀ was 30 μ M, inhibiting the completion of trophozoite growth by the compound in 12 hours of incubation.
- For geraniol there was efficacy from the MIC concentration of 50 μ M and the IC₅₀ was 30 μ M, after 24 h of incubation from the concentration.
- Data analysis demonstrated that immediately after of exposure to treatments with citral and geraniol oil (60 μ M and 50 μ M) induced the lipid peroxidation levels when compared to the negative control group.
- The results also showed that immediately and 24 h after of exposure to treatment with citral oil (60 μ M) were unable to significantly change in RS levels when compared to the negative control group.
- In addition the results demonstrated that the immediately after of exposure to treatment with geraniol oil (50 μ M) was significantly change in RS levels when compared to the negative control group.
- Citral and geraniol and Fe-hydrogenase interacted through hydrophobic and / or hydrogen interactions. Both can bind and interfere, to a certain extent, in the activity of Fe-hydrogenase. Demonstrating that there may be a potential for geraniol and citral to inhibit a hydrogenosomal enzyme crucial for the survival of *T. gallinae*.

Introduction

Avian *trichomoniasis* is an important disease causing bird mortality, both wild and captive, around the world (Stabler, 1954; Amin et al., 2014). Its transmission occurs directly during courtship, feeding of chicks and/or by predation by birds of prey

(Nematollahi et al., 2012), being transmitted mainly by pigeons (*Columba livia*) to other bird species (*Columbiformes*, *Falconiformes*, *Passeriformes*) (Girard et al., 2017).

In the upper digestive tract, present in yellowish caseous lesions in the upper digestive region, particularly in the mouth, esophagus and harvest of infected birds, leading to anorexia, weight loss and asphyxia. Birds are characterized mainly by caseous masses and ulceration in the oral cavity and other parts of the upper digestive tract, what can affect feed and can even cause hunger or suffocation (Amin et al., 2014). It can present in acute or chronic subclinical form, depending on the host species, pathogenicity of the strain, immunological status (Bunbury et al., 2008; Robinson et al., 2010; Marx et al., 2017).

Studies have shown that lemongrass oil and citral have several biological activities, such as antineoplastic, antimicrobial, antifungal, antiprotozoal, anthelmintic and anti-arthropod activities (Satthanakul et al., 2015; Giteru et al., 2015; Gao et al., 2020; Plata-Rueda et al., 2020). Lemongrass oil contains mainly citral (Tajidin et al., 2012), a natural combination of two isomeric aldehydes, that is, the geranial isomers (α -citral) and neral (β -citral) (Pengelly, 2004). Geraniol is an acyclic alcohol, with a floral odor, which appears as a yellowish oily liquid (Liu et al., 2016). In addition to its use in fragrances, it has several biological activities, such as antiseptic, anthelmintic, antioxidant, anti-inflammatory, antifungal (Herro, 2004; Ibrahim et al., 2015; Wang et al., 2016; Leite et al., 2015). In this context, the identification of new safer and more efficient therapeutic agents with antiparasitic action is desirable, so that the considered plants are viable alternatives. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity, antioxidant and antiparasitic activity of *in vitro* citral (3.7-Dimethyl-2.6-octadienal) and geraniol (trans-3.7-Dimethyl-2.6-octadien-1-ol) and against trophozoites from *Trichomonas gallinae*.

Materials and methods

Reagents

Citral, geraniol, DMSO, MTZ and TYM (Trypticase Yeast Extract Maltose) was commercially acquired from Sigma-Aldrich®.

Trichomonas gallinae

Samples of *T. gallinae* were recovered by the wet mount method of naturally infected pigeons. Twelve native pigeons (*C. livia*) (2 to 8 weeks old) were captured in urban areas using swabs, samples were taken from the oral cavity, and from membranous lesions of the oropharyngeal region these birds. The culture of the parasite was prepared by immersion of oral swabs in tryptone/ yeast extract/maltose medium (TYM) (Diamond, 1957) supplemented with 10% adult fetal serum, antibiotic (meropenem), antifungal (amphotericin B) (Sigma-Aldrich®) and incubated at 37°C (Sansano et al., 2009).

The cultures were then examined under an optical microscope at (100 and 400x) for mobile trophozoites observation.

Cultures were observed over seven consecutive days to verify the growth of trophozoites. At every 48 hr, trophozoites that had more than 95% mobility and normal morphology, were subculture (Seddiek et al., 2014).

In vitro assay

To examine the susceptibility of *T. gallinae* to citral and geraniol, sterile 96-well plates were used for incubation with different concentrations.

The parasites were seeded at an initial density of 10^6 trophozoites/mL of TYM and incubated with the citral and geraniol. Three controls were considered: A (trophozoites

only), B (trophozoites plus the vehicle used for solubilization of the derivatives (DMSO), C (trophozoites plus 100 μ M metronidazole (MTZ), as positive control).

Citral and geraniol were added to the wells to obtain final concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 μ M, respectively. Subsequently, to generate anaerobic conditions, the microculture plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h. After this period, a preparation with trophozoites, containing trypan blue (0.4%) (1:1), was evaluated in Neubauer chamber. Cultures with viability equal to or greater than 95% were used for assays, having considered motility, morphology and exclusion by dye.

The IC₅₀ (half the maximal inhibitory concentration) was determined for the citral and geraniol. A kinetic growth curve was constructed to obtain the profile of comparable activity of citral and geraniol compounds against *T. gallinae* trophozoites.

Only the concentrations of citral and geraniol that showed a reduction in the viability of the trophozoites to 100%, were used to determine the MIC (minimum inhibitory concentration). The trophozoites used to establish MIC and below and above concentrations, as well as inoculated controls in fresh TYM medium at 37°C, were counted in Neubauer chamber with trypan blue every 24 hr for 96 hr to confirm MIC.

The best concentration, presented after MIC citral analysis and geraniol, was conducted at the following times: 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hr by the dye exclusion method. The IC₅₀ was determined at varying concentrations, as described in the MIC method. A death time curve was constructed to obtain an activity profile of the efficiency of the citral and geraniol against *T. gallinae* flagellate trophozoites. All assays were performed independently in nonoplicate (Sena- Lopes et al., 2017).

Cytotoxicity

The cytotoxic effect of citral and geraniol was assessed on Vero cells (1.8×10^6 cells/plate) by MTT assay, according to methodology described by Mosmann (1983) with minor modifications. Briefly, 100 μ l of cells were seeded in 96-well polystyrene plates and 24h later were added of different Citral and geraniol concentrations (100 μ M, 80 μ M, 60 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M). After 14 h of incubation, an MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) solution (5mg/mL) was added in all wells and the plates were incubated for 4 h until violet color development. The supernatant was replaced by 200 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO). The optical density was determined by spectrophotometry (550 nm) and the results were expressed in percentage of viable cells relative to cell control (untreated).

Reactive species (RS) and Thiobarbituric acid reative species (TBARS) assay

This assay was used to quantify the levels of RS using 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) (Loetchutinat et al., 2005). The *T. gallinae* control and treatment groups were incubated with 1 mM dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCHF-DA) and 10 mM Tris-HCl pH 7.4. The oxidation of DCFH-DA to the fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation). The values were expressed as units (U) of fluorescence.

Assay evaluated the levels of lipid peroxidation, as described by Ohkawa et al. 1979 with modifications. An aliquot of the *T. gallinae* control and treatment groups were incubated with 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.8% TBA, and acetic acid/HCl (pH 3.4) at 95 °C during 60 min. The levels of TBARS were measured spectrophotometrically at 532 nm, and the results were expressed as nmol MDA/10⁵ trophozoites.

Structure modeling

We were able to retrieve the amino acid sequence of Iron dehydrogenase from NCBI protein database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) under the accession number ARW59279, which corresponds to UNIPROT ID A0A220DJR0. Using the BLASTp (Altschul, 1990) global search in the nr database or restricted to *T. gallinae*, we assessed differences between the deposited sequences. The tridimensional structure was modeled through I-TASSER (Yang, 2015), which also provided the probable ligand binding sites through the COACH module (Jianyi, 2013). After model refinement made by Modrefiner (Dong, 2011), we generated a Ramachandran plot to evaluate the model quality in the module ProCheck (Laskowski, 1993) at PDBSum (Laskowski, 2018).

Molecular docking

The ligands citral and geraniol were retrieved from PubChem database (Kim, 2019). Both ligand and the refined model of Fe-hydrogenase were prepared for docking using MGLTools package (AutoDock Tools) to add polar hydrogens, compute Gasteiger charges, and select the residues from the binding sites to generate the grid box. The docking was performed in Autodock Vina (Trott, 2010). Visualization of the docked proteins was made using PyMOL Molecular Graphics System (Version 2.4 Schrödinger, LLC), and the webserver PLIP (Salentin, 2015) was used to evaluate ligand interactions.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA of variance followed by the Newman-Keuls post hoc test. Descriptive statistics data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Probability values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered statically

significant. The statistical analysis was accomplished using GraphPad Prism version 8.0 for Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA).

Results

In vitro assay

The results of the *in vitro* study on the inhibiting effect of citral and geraniol compounds on *T. gallinae* and the comparison of this activity with the drug metronidazole are in Figure 1. Analysis of anti-*T. gallinae* from citral showed that at concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50 μ M there was no total reduction of trophozoites (76.25%, 53.10%, 38.63%, 32.55%, and 26.49%, respectively). This compound was 100% effective after 24h of incubation at concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 μ M, as the trophozoites became unfeasible and the total reduction in the culture medium occurred. Geraniol was effective from the concentration of 50, 60, 70, 80, 90 and 100 μ M, showing no statistically significant difference from the standard metronidazole medication when compared and used in the therapeutic dose (100 μ M). The MIC was 60 μ M and the IC₅₀ was 30 μ M, respectively (Fig.1). The growth of trophozoites was completely inhibited by the compound within 12 hours of incubation (Fig.2). The MIC was 50 μ M and the IC₅₀ was 30 μ M, respectively (Fig.1). For use with treatment with geraniol, it made the trophozoites unfeasible after 24 h of incubation from a concentration of 50 μ M, the MIC was 0.075 μ g/mL and the IC₅₀ was 30 μ M, respectively (Fig. 1). For the death curve, the trophozoites only obtained 100% trophozoites inactivation at the MIC concentration after 24 hours. Although citral showed antiprotozoal activity as observed in the experiment, a significant decrease in VERO cell proliferation was detected after 24 hours. As noted, the number of viable cells for concentrations is of 10 to 100 μ M, respectively. By performing the assay, it can

be observed that geraniol showed protozoan activity, as well as not causing effects and damage to VERO cells in 24 hours of time-dependent dose-treatment, compared to the control proliferation (100%). Data analysis demonstrated immediately after exposure to treatments with citral and geraniol oil (60 and 50 μM) induced the lipid peroxidation levels when compared to the negative control group ($P < 0.001$) [Fig. 3A]. The results demonstrated that after 24 h of exposure to both treatments decreased the lipid peroxidation levels when compared to the negative control group ($P < 0.05$) [Fig. 3C]. The results also showed that immediately and 24 h after exposure to treatment with citral oil (60 μM) were unable to significantly change in RS levels when compared to the negative control group ($P < 0.5$) [Fig. 4A and 4C]. In addition, the results demonstrated that the immediately after exposure to treatment with geraniol oil (50 μM) was significantly change in RS levels when compared to the negative control group ($P < 0.05$) [Fig. 4B]. But not significantly change in RS levels when compared to the negative control group after 24 h after exposure to treatment with geraniol oil (50 μM) [Fig. 4D].

The results also showed that after 24 hours the exposure to treatment with citral oil (60 μM) was not able to significantly change the RS levels when compared to the negative control group ($P < 0.5$) [Fig. 4A and 4C].

Structure modeling

The sequence analysis of BLASTp results restricted to *T. gallinae* showed great sequence homology, with a minimum of 92% similarity between those described as “Fe-hydrogenase”. The global search (nr database) demonstrated it had 94% similarity with *T. vaginalis*. After refinement, an improvement in sequence quality was visible, due to the increased number of residues in allowed positions - good quality models

would be expected to have over 90% amino acids in the most favored regions (Table 1, Supplementary materials 1 and 2). Root mean square deviation (RMSD) of 0.682 shows some variation compared to the initial model, demonstrating that structural changes occurred during the refinement – the higher the numbers for RMSD, the smaller similarity. The TM-score is a completer and more sensitive metric to measure the global topological similarity between two structures, and the value of 1 represents a perfect match; as we obtained a value of 0.9915, it also proves that additional changes were required during model refining.

Molecular docking

After the ligand and protein preparation, we then assessed each of the predicted binding sites from COACH in our docking analysis (Table 2, Figure 1). The overall best energies were moderate, and site 3 presented energies not high enough to infer that the docking is reliable. The other results indicate that a probable interaction between Fe-hydrogenase and the natural oils may occur (Table 3).

We also consider ligand conformational integrity (Figures 2 and 3) and the residues involved in interactions with the enzyme (Table 4) to analyze the docking quality. The oils and Fe-hydrogenase interacted via hydrophobic and/or hydrogen interactions. It is important to note that not only the binding affinity is considered for a good docking – the ligand conformation and correct positioning in the binding site are also of crucial importance. To determine the most reliable results apart from the binding energy, we selected the poses that presented hydrophobic and/or hydrogen bonding with at least 2 residues from the COACH prediction to analyze via PLIP (Table 4). The best-predicted sites were 1 and 2 for citral, once the residues were bound to the correspondent amino acids of the ligand sites; in the latter, the ligand was internally bound. Binding sites 1

and 3 were the best suited for geraniol, considering the same criteria of citral. Binding sites 2 and 5 were only bound only to one residue predicted by COACH and were not considered as a suitable result.

Discussion

Several drugs have already been tested against *trichomoniasis* in pigeons (Aydin & Coşkun 2000; El-Sayed, 2005). However, there is no specific drug for the treatment of this disease in birds, so metronidazole has been used, a drug for human use for the treatment, which was adapted for use in birds, due to the lack of development of a new antitrichomonal drug (Franssen & Lumeij 1992). In this context, several synthetic compounds demonstrated activity against *T. gallinae*, as well as a low toxicity to the host and can be good alternatives to nitroimidazoles, when there is resistance to these drugs (Forrester & Foster, 2009).

In this study, the treatment with citral and geraniol compounds at the highest concentrations reduced the viable trophozoites in the culture medium by 100% after 24 hours, corroborating the data by Youssefi et al. (2017), Tabari et al. (2017), Baccega et al. (2021) who used essential oils in their studies, demonstrating the antitrichomonal effects against *T. gallinae* trophozoites in the *in vitro* assay. The mechanism of action responsible for the antiprotozoal activity of citral and geraniol in the study is still unexplained. It can probably be explained by the ability of this compound to promote damage to the cell membrane, alternate the integrity and permeability of it, as observed in other studies (Onawunmi , et al., 1984, Park et al., 2006, Mesa-Arango et al., 2009, Zhou et al., 2014). Raut and Karuppayil (2014) report that essential oils are lipophilic. This contributes to greater penetration into the cell membrane of the protozoan, interacting with polysaccharides, fatty acids and phospholipids, being the first mechanism of action, causing cell death due to loss of ions and cell content.

About the inhibitory effects of citral, they have been observed *in vitro* against *Trypanosoma cruzi*, reducing the epimastigote and trypomastigote forms, acting in the process of differentiation of protozoa. The same antiprotozoal activity has been detected by Santin et al. (2009) against promastigotes, axenic amastigotes and intracellular amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Corroborating the data presented in this study, which may be responsible for changes in the morphology of the protozoan, causing the rupture of the plasma membrane, interfering with the cell division process and promoting the disintegration of the parasite. Zhou et al. (2014) observed that volatile compounds induced a decrease in the total lipid content of *G. citri-aurantii* cells, indicating the destruction of cell membrane structures. These results suggest that the antifungal activity of citral may be assigned to disruption of cell membrane integrity and leakage of cell components. Geraniol has reports of activities against fungi, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* (Maruyama et al., 2008), the nematode *Caenorhabditis elegans* (Kumaran et al., 2003) and the bacteria *Salmonella typhimurium* (Kim et al., 2006; Morales et al., 2009). Bakkali et al., 2008 suggest that the mechanism of action of geraniol is associated with its lipophilic properties. It can preferentially influence the membrane structures or the synthesis of these structures, changing the permeability and fluidity of the membrane. Pereira et al., 2015 report that, in addition to its lipophilic characteristic, it has a chemical structure very similar to geranyl-pyrophosphate, a sterol found in cell membranes and functions as an important regulator of membrane fluidity. This similarity suggests that the action of geraniol is associated with the inhibition of enzymes involved in the ergosterol biosynthesis process, thus causing dynamic alterations in the cell membrane of microorganisms.

To investigate a possible mechanism of action of the activity against citral and geraniol pathogens, we evaluated their pro-oxidant or antioxidant capabilities in the reactive

species assay and in the TBARS assay. Cell damage caused by free radicals is linked to lipid oxidation of cell membranes, leading to loss of fluidity and increased membrane permeability, with release of nutrients and toxic substances to the cell in the extracellular space, and even its rupture (Ferreira & Matsubara, 1997; Damasceno et al., 2002). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) are one of the main biological markers of this type of damage to cell membranes (Draper & Hadley, 1990). Our results demonstrate that the treatment of *T. gallinae* cells with citral and geraniol at time 0 increased the levels of reactive species (Figure 4), and consequently increased lipid peroxidation (Figure 3) when compared to the control group from these results. We believe that the cytotoxicity of citral to *T. gallinae* cells was due to its pro-oxidant effect, since polyunsaturated fatty acids in cell membranes are degraded by lipid peroxidation, with subsequent change in membrane integrity, suggesting that peroxidation lipid, mediated by reactive species, is an important cause of cell damage, which can lead to cell death. Our data corroborate the findings by Sanches et al. (2017) who demonstrated that citral increased MDA levels, suggesting that the induction of oxidative stress is related to citral cytotoxicity to B16F10 cells. Interestingly, 24 hours after exposure of *T. gallinae* cells to citral, there was a decrease in lipid peroxidation (Figure 3) when compared to the control group, demonstrating that the pro or antioxidant effect of citral may be time dependent. For this, we believe that there is the involvement of antioxidant enzymes, such as catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase, and therefore, it would be necessary to analyse the activity of these enzymes to better aggregate our results, which is a limitation of our studies. Sacchetti et al. (2005) also evaluated the antioxidant effect of citral; they suggest that more than 60% of the antioxidant activity for the lemongrass essential oil, which had a

content of 73.58% of citral in its composition, has the capacity to neutralize free radicals.

It is believed that the antioxidant activity of geraniol continued to increase reactive species within 24 hours, as it is considered an allylic alcohol, that is, the second class of oxygenated monoterpenes, which make up essential oils, being more active in terms of antioxidant activity, differentiating from data found by Scherer et al. (2009). They observed that citronella oil did not present antioxidant activity, having as major components citronellal (45%), geraniol (20.71%) and citronellol (14.49%). MTT cell viability showed that citral reduced VERO cell growth in a dose and time dependent manner. Souza et al (2020) reported cytotoxic and genotoxic effects exhibited by citral at 05 $\mu\text{g} / \text{mL}$ on human hematopoietic culture cells and leukocytes, showing a significant decrease in cell viability, corroborating our study. For geraniol, the assay by the (MTT) method indicated that cell viability remained above 100%, demonstrating that it did not show cytotoxicity at the tested concentrations. Sinha et al. (2014) evaluated the cytotoxic potential of six concentrations of geraniol (100-2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$) in human lymphocytes; both of the tested concentrations were cytotoxic which differs from our study. This difference is possible to be related to the difference in time and concentration of exposure to geraniol, while we used 24 h, Sinha et al. (2014) treated the cells for 3 h.

Our docking results indicate that there might be an interaction with Fe-hydrogenase and natural oils are emerging as an invaluable source of antiparasitic compounds. Other reports also performed molecular docking analysis with relevant proteins for *T. vaginalis* metabolism (Setzer 2017; Alves, 2020) and present very interesting results, although none with essential oils or Fe-hydrogenase. The only sequence we were able to

retrieve and model was Fe-hydrogenase. Then, this is the first report to model and analyze the interaction of essential oils with a hydrogenosome enzyme from *T. gallinae*. Using the same method as ours, other studies evaluated the inhibitory potential of these essential oils, but none with *T. gallinae* or related organisms. The effect of geraniol in CaCdr1p efflux pumps in *Candida albicans* was tested *in silico* and revealed strong binding energy of -8.8 kcal/mol; further *in vitro* testing proved geraniol did inhibit *Candida* virulence factors (Singh, 2018). Citral also presented inhibitory activity against MARK4 protein, which disruption is associated with the occurrence of cancer (Naz, 2017). The authors found the binding energy of -5.6 kcal/mol and that the oil was placed in the same site as a MARK4 known inhibitor. Ultimately, citral efficiently inhibited cancer cell lines. We did not have any molecule to compare with, as there is none available in RCSB PDB, and sequence retrieving was also hampered by the lack of an annotated genome for *T. gallinae*. We support the idea that a relatively low binding energy does not necessarily imply in lack of function, and these oils potentially interfere in the Fe-hydrogenase activity, although all *in silico* analysis should be tested *in vitro*.

One study analyzed the antiparasitic potential of another natural oil – resveratrol - against *T. vaginalis* (Mallo, 2013). Although the hydrogenosome activity was increased after resveratrol administration, Fe-hydrogenase activity decreased, indicating the same effect caused by the most used drug for trichomoniasis (metronidazole). The H₂ inhibition is a known effect of metronidazole that competes for electrons, but this competition ability is not described for resveratrol. The authors then infer that resveratrol would act primarily inhibiting Fe-hydrogenase enzyme and the Iron transportation. This could be a reason for our results do not present a high negative value, although the different chemical characteristics of geraniol and citral compared to resveratrol: event though these oils do not strongly bind to Fe-hydrogenase, their main

role could be interfering in the iron transportation and thus causing *T. gallinae* metabolic disruption.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of FAPERGS for the ADR/2017 process. This study was carried out with the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel-Brazil (CAPES) Financing Code 001.

Financial Support

The authors are grateful for the financial support of FAPERGS for the ADR/2017 process.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Standards

This research was approved by the SISBIO on 08/02/2018, under number 61235-1.

References

- Akhila, A** (2010) *Essential oil-bearing grasses: Q10 the genus cymbopogon*. In: Medical and aromatic plants-industrial profile. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW and Lipman, DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

- Alves MSD, das Neves RN, Sena-Lopes Â, Domingues, M, Casaril, AM, Segatto, NV, Nogueira, TCM, Souza, MVN de, Savegnago, L, Seixas, FK, Collares, T and Borsuk, S** (2020) Antiparasitic activity of furanyl N-acylhydrazone derivatives against *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* and *in silico* analyzes. *Parasites Vectors* **13**, 59. doi:10.1186/s13071-020-3923-8
- Amin, A, Bilic, I, Liebhart, D and Hess, M** (2014) Trichomonads in birds - a review. *Parasitology* **141**, 733–47. doi: 10.1017/S0031182013002096.
- Andoğan, BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Ozbaşar D, Mumcu E** (2002) Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of pharmacal research* **25**, 860-4. doi: 10.1007/BF02977005.
- Aydın, L and Coşkun, S** (2000) Efficacy of carnidazole (Spatrix®) and metronidazole (Flagyl®) against *Trichomonas gallinae* in naturally infected pigeons. *Acta Parasitology Turcica* **24**, 65-66.
- Baccega, B, Islabão, YW, Mello, AB de, Martins, FO, Santos, CC dos, Ourique, AF, Gündel, S da S, Macedo, MRP de, Vianna, ÉE, Farias, NA da R and Oliveira, CB** (2021) *In vitro* and *in vivo* activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*. *Avicenna journal of phytomedicine*, **11**, 32–34. doi: 10.22038/AJP.2020.15662.
- Bakkali, F, Averbeck, S, Averbeck, D, Idaomar, M** (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 446–475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- Bard, M, Albrecht MR, Gupta N, Guynn CJ and Stillwell W** (1988) Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids* **23**, 534-8. doi: 10.1007/BF02535593.
- Barnard, DR and Xue, RD** (2004) Laboratory evaluation of mosquito repellents

against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology* 41, 726-30. doi: 10.1603/0022-2585-41.4.726.

Bunbury, N, Stidworthy, M, Greenwood, A, Jones, C, Sawmy, S, Cole, R, Edmunds, K and Bellet, DJ (2008) Causes of mortality in free-living Mauritian pink pigeons *Columba mayeri*, 2002–2006. *Endangered Species Research* 9, 213–220. doi: 10.3354/ESR00088.

Cardoso, J and Soares, MJ (2010) *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 1026-32. doi:10.1590/S0074-02762010000800012.

Carneiro, JNP, Albuquerque, RS, Leite, NF, Machado, AJM, Brito, DIV de, Rolón, M, Vega, C, Coronel, C, Coutinho, HDM and Morais-Braga, MFB (2015) Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. *Caderno de Cultura e Ciência* 13, 29-36, doi: 10.14295/cad.cult.cienc.v13i2.841.

Chen, W and Viljoen, A (2010) Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany* 76, 643-51. doi: 10.1016/j.sajb.2010.05.008.

Diamond, LS (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* 43, 488-499. doi: 10.1093/nar/gkv315.

Dong, X and Zhang Y (2011) Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-step Atomic-level Energy Minimization. *Biophysical Journal* 101, 2525-2534. doi: 10.1016/j.bpj.2011.10.024.

- El-Sayed, NM, Myler, PJ, Blandin, G, Berriman, M, Crabtree, J, Aggarwal, G, et al.** (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 15,404-9. doi: 10.1126/science.1112181.
- Forrester, DJ and Foster, GW** (2009) Trichomonosis. In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, D.B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, p.120-153.
- França, ISX, Souza, JÁ de, Baptista, RS, Britto and VR de S** (2008) Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem* **61**, 201-8. doi: 10.1590/S0034-71672008000200009.
- Franssen, FFJ and Lumeij, JT** (1992) *In vitro* nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **15**, 409–415. doi: 10.1111/j.1365-2885.1992.tb01032.x.
- Girard, YA, Rogers, K., Gerhold, R, Land, KM, Lenaghan, SC, Woods, LW, Haberkern, N, Hopper, M, Cann, JD and Johnson, CK** (2014) *Trichomonas stableri* n. sp., an agent of trichomonosis in Pacific Coast band-tailed pigeons (*Patagioenas fasciata monilis*). *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **3**, 32–40. doi: 10.1016/j.ijppaw.2013.12.002.
- Giteru SG, Coorey R, Bertolatti D, Watkin E, Johnson S and Fang Z** (2015) Physicochemical and antimicrobial properties of citral and quercetin incorporated kafirin-based bioactive films. *Food Chemical* **168**, 341-7.
- Ibrahim, AN** (2013) Comparison of *in vitro* activity of metronidazole and garlic-based product (Tomex®) on *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research* **112**, 2063-7. doi: 10.1007%2Fs00436-013-3367-6.

- Kim, S, Chen, J, Cheng, T, Gindulyte, A, He, J, He, S, Li, Q, Shoemaker, BA, Thiessen, P A, Yu, B, Zaslavsky, L, Zhang, J, and Bolton, EE** (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research*, **47**(D1), D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>.
- Kumaran, AM, Souza, P, Agarwal, A, Bakkolla, RM and Balasubraniam, M** (2003) Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. *Phytotherapy Research*, **17**, 957. doi: 10.1002/ptr.1267.
- Laskowski, RA, Jabłońska, J, Pravda, L, Vařeková, RS and Thornton, JM** (2018) “PDBsum: Structural summaries of PDB entries.” *Protein science: a publication of the Protein Society* **27**, 129-134. doi:10.1002/pro.3289.
- Laskowski, RA, MacArthur, MW, Moss, DS and Thornton JM** (1993) PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**:283–291. doi: 10.1107/S0021889892009944.
- Leite, NS, Lima, AP, Araújo-Neto, V, Estevam, CS, Pantaleão, SM, Camargo, EA, Fernandes, RPM, Costa, SKP, Muscará, MN and Thomazzi, SM** (2015) Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). *Revista brasileira de plantas medicinais* **17**, 164-170. doi:10.1590/1983-084X/09_189.
- Liu, W, Xu, X, Zhang, R, Cheng, T, Cao, Y, Li, X, Guo, J, Liu, H and Xian, M** (2016) Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. *Biotechnology for Biofuels* **9**, 58. doi: 10.1186/s13068-016-0466-5.
- Loetchutinat, C, Kothan, S, Dechsupa, S, Meesungnoen, J, Jay-Gerin, JP and Mankhetkorn, S.J.R.P.** (2005) Spectrofluorometric determination of intracellular

levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate assay, *Chemistry* **72**,323-331. doi: 10.1016/j.radphyschem.2004.06.011.

Mallo N, Lamas J and Leiro JM (2013) Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobiol Agents Chemotherapy* **57**, 2476-2484. doi:10.1128/AAC.00009-13.

Maruyama, N, Takizawa, T, Ishibashi, H, Hisajima, T, Inouye, S, Yamaguchi, H and Abe, S (2008) Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**, 1501-1506. doi: 10.1248/bpb.31.1501.

Marx, M, Reiner, G, Willems, H, Rocha, G, Hillerich, K, Masello, JF, Mayr, SL, Moussa, S, Dunn, JC, Thomas, RC, Goodman, SJ, Hamer, KC, Metzger, B, Cecere, JG, Spina, F, Koschkar, S, Calderón, L, Romeike T and Quillfeldt P (2017) High prevalence of *Trichomonas gallinae* in wild columbids across western and southern Europe. *Parasites & Vectors* **10**, 1-11. doi: 10.1186/s13071-017-2170-0.

Mesa-Arango, A, Montiel-Ramos, J, Zapata, B, Durán, C, Betancur-Galvis, L and Stashenko, E (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **6**, 878-84. doi:10.1590/S0074-02762009000600010.

Morales, M, Navarro, MC, Martin, J, Valero, A, Lara, AM, Barón, S and Morillas, F. (2009). Activity of different monoterpenic derivatives of natural origin against *Leishmania infantum* promastigotes. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, **68**, 65-72.

Mosmann, T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Naz, F, Khan, FI, Mohammad, T, Khan, P, Manzoor, S, Hasan, GM, Lobb, KA, Luqman, S, Islam, A, Ahmad, F and Hassan, MI (2018) Investigation of molecular mechanism of recognition between citral and MARK4: A newer therapeutic approach to attenuate cancer cell progression. *International Journal of Biological Macromolecules* **107**, 2580-2589. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.143.

Nematollahi, A, Ebrahimi, M, Ahmadi, A and Himan, M (2012) Prevalence of *Haemoproteus columbae* and *Trichomonas gallinae* in pigeons (*Columba domestica*) in isfahan, Iran *Journal of Parasitic Diseases* **36**,141-142. doi: 10.1007/s12639-011-0082-z.

Nordin, N, Yeap, SK, Rahman, HS, Zamberi, NR, Abu, N, Mohamad, NE, How, CW, Mas Masarudin, J, Abdullah, R and Alitheen, NB (2019) *In vitro* cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. *Scientific reports* **9**, 1614. doi: 10.1038/s41598-018-38214-x.

Ohkawa, H, Ohishi, N and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochemical* **95**(2) 351-8.

Onawunmi, GO, Yisak, W and Ogunlana, EO (1984) Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology* **12**, 279-286. doi: 10.1016/0378-8741(84)90057-6

Park, IK, Choi, KS, Kim, DH, Choi, IH, Kim, LS, Bak, WC, Choi, JW and Shin, SC (2006) Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pinpinella anisum*) and garlic (*Allium*

sativum) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science* **62**, 723-728. doi: 10.1002/ps.1228.

Pengelly, A (2004) The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. Oxon, United Kingdom: CABI Publishing.

Pereira, F de O, Mendes, JM, Lima, IO, Mota, KS de L, Oliveira, WA de and Lima, EO de (2015) Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes' alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis *Pharmaceutical Biology*, **53**, 228-234. doi: 10.3109/13880209.2014.913299.

Raut, JS and Karuppayil, SM (2014) A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. *Industrial Crops and Products*, **62**, 250-264. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055.

Robinson, R. A., Lawson, B., Toms, M. P., Peck, K. M., Kirkwood, J. K., Chantrey, J., Clatworthy, I. R., Evans, A. D., Hughes, L. A., Hutchinson, O. C., John, S. K., Pennycott, T. W., Perkins, M. W., Rowley, P. S., Simpson, V. R., Tyler, K. M. and Cunningham, A. A. (2010). Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. *PloS One* **5**, e12215. doi: 10.1371/journal.pone.0012215.

Sacchetti, G, Maietti, S, Muzzoli, MV, Scaglianti, M, Manfredini, S, Radicec, M and Brunid, R (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* **91**, 621-632. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.06.031.

Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V.J., Adasme, M.F. and Michael Schroeder, M. (2015) PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* **1**, W443–W447.

Sanches LJ, Marinello PC, Panis C, Fagundes TR, Morgado-Díaz JA, de-Freitas-Junior JC, Cecchini R, Cecchini AL and Luiz RC (2017) Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. *Tumour Biology.* **39**, 1-15. doi: 10.1177/1010428317695914.

Sansano-Maestre J., Garijo-Toledo, M.M., Gómez-Muñoz, M.T. (2009) Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. *Avian Pathology* 38, 201-7. doi: 10.1080/03079450902912135.

Santin MR, dos Santos AO, Nakamura CV, Dias Filho BP, Ferreira IC and Ueda-Nakamura T (2009) *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research* **105**, 1489-96. doi: 10.1007/s00436-009-1578-7.

Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LG, Salgado AP, Mena-Barreto RF and Soares MJ (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research* **100**, 783-790. doi: 10.1007/s00436-006-0326-5.

Satthanakul P, Taweechaisupapong S, Paphangkorakit J, Pesee M, Timabut P, Khunkitti W. (2015) Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour micro-organisms and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. *Journal Of Applied Microbiology* **118**, 11-7. doi: 10.1111/jam.12667.

- Scherer, R, Wagner, R, Duarte, MCT, and Godoy, HT (2009)** Composição e atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai* **11**, 442-9. doi: 10.1590/S1516-05722009000400013.
- Seddiek, SA, Khater, HF, El-Sorbagy, MM, Ali, MMA (2014)** The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitology Research* **113**, 1319-1329. doi: 10.1007/s00436-014-3771-6.
- Sena-Lopes, Â, das Neves, RN, Bezerra, FSB, de Oliveira Silva, MT, Nobre, PC, Perin, G, Alves, D, Savegnago, L, Begnini, KR, Seixas, FK, Collares, T and Borsuk, S. (2017)** Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium i *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **89**, 284-287. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.173.
- Setzer, MS, Byler, KG, Ogungbe, IV, Setze,r WN (2017)** Natural Products as New Treatment Options for Trichomoniasis: A Molecular Docking Investigation. *Scientia Pharmaceutica* **85**, 5. doi:10.3390/scipharm85010005
- Singh, S, Fatima, Z, Ahmad, K and Hameed S (2018)** Fungicidal action of geraniol against *Candida albicans* is potentiated by abrogated CaCdr1p drug efflux and fluconazole synergism. *PLoS ONE* **13**, e0203079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203079>
- Sinha, S, Jothiramajayam, M, Ghosh, M and Mukherjee, A (2014)** Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* **68**, 71–77. doi: 10.1016/j.fct.2014.02.036.

- Souza, ACS, Silva, LK, Queiroz, TB, Marques, ES, Hiruma-Lima CA, Gaivão, IOM and Maistro, EL** (2019) Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. *Drug and chemical toxicology*, **43**, 435-440. doi: 10.1080/01480545.2019.1585445.
- Stabler, RM** (1954) *Trichomonas gallinae*. A review. *Experimental Parasitology* **3**, 368–402. doi: 10.1016/0014-4894(54)90035-1Get.
- Tabari, MA, Youssefi, MR and Moghadamnia, AA** (2017) Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in Pigeon (*Columba livia domestica*). *British Poultry Science*, **58**, 236-241. doi: 10.1080/00071668.2017.1280725.
- Tajidin, NE, Ahmad, SH, Rosenani, AB, Azimah, H, Munirah, M.** (2012) Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. *African Journal of Biotechnology*, **11**, 2685e93. doi: 10.5897/AJB11.2939.
- Trott, O and Olson, AJ** (2010) Auto Dock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **31**, 455-461. doi: 10.1002/jcc.21334.
- Wang, W and Liu, J** (2020) Efficient extraction, antioxidant activities and anti-inflammation of polysaccharides from *Notopterygium franchetii* Boiss. *Carbohydrate Polymers* **248**, 1516783. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116783.
- Yang, J and Zhang, Y** (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research* **43**, W174-W181. doi: 10.1093/nar/gkv342.

Yang, J, Roy, A and Zhang, Y (2013) Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment, *Bioinformatics* **29**, 2588-2595. doi: 10.1093/bioinformatics/btt447.

Youssefi, MR, Tabari, MA and Moghadamnia, AA (2017) *In vitro* and *in vivo* activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. *Iranian journal of veterinary research* **18**, 25. doi:10.22099/IJVR.2017.4025.

Zhou, H, Tao, N and Jia, L (2014) “Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*,” *Food Control* **37**, 277–283. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.057.

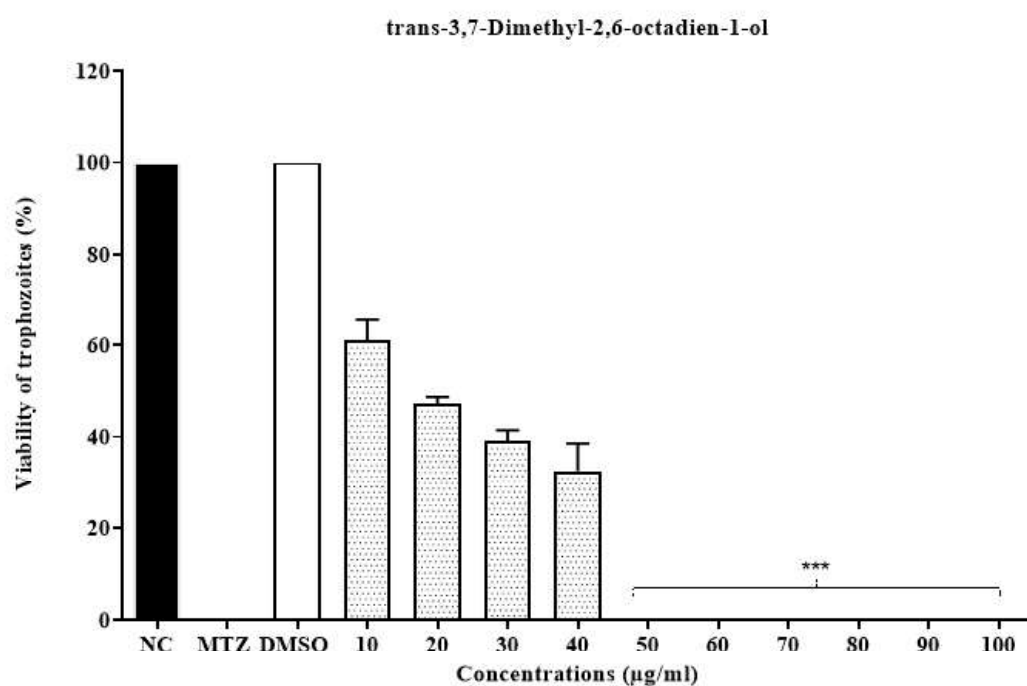
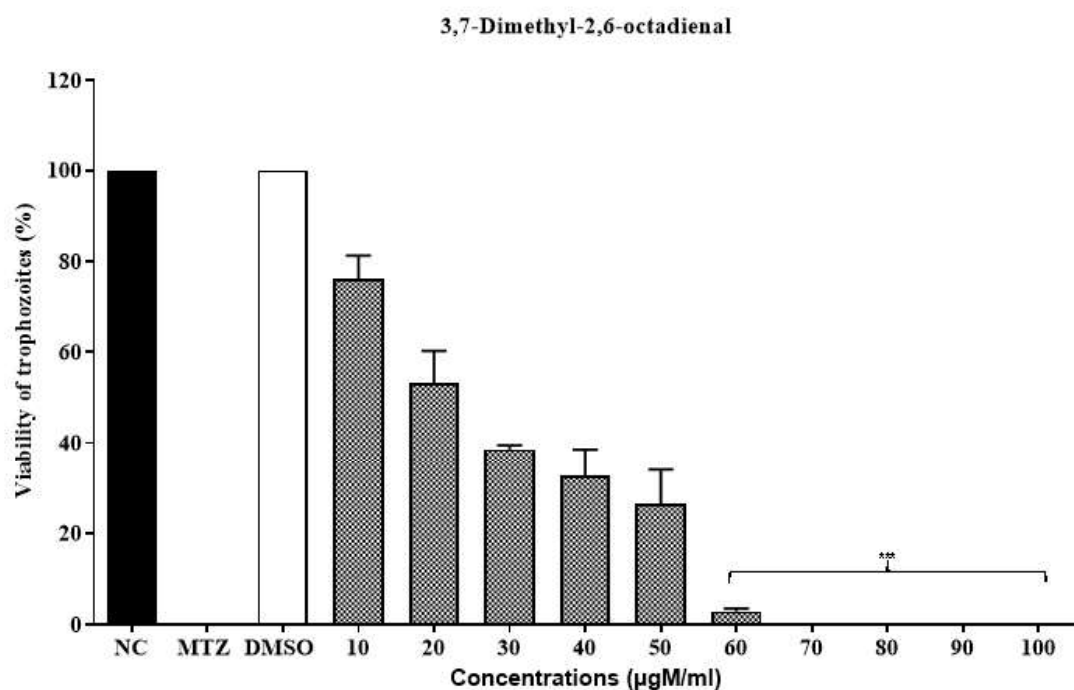


Figure 1- Anti-Trichomonas activity in culture medium of the formulation of the major compounds (citral and geraniol) at concentrations from 10 to 100 µM, as controls: NC (negative control), MTZ (metronidazole 100 µM), DMSO (diluent 0.6%). The analyses

were evaluated 24 hours after treatment. The columns indicate the groups and * indicate the statistical difference when compared to the MTZ control by the Tukey test ($P < 0.05$).

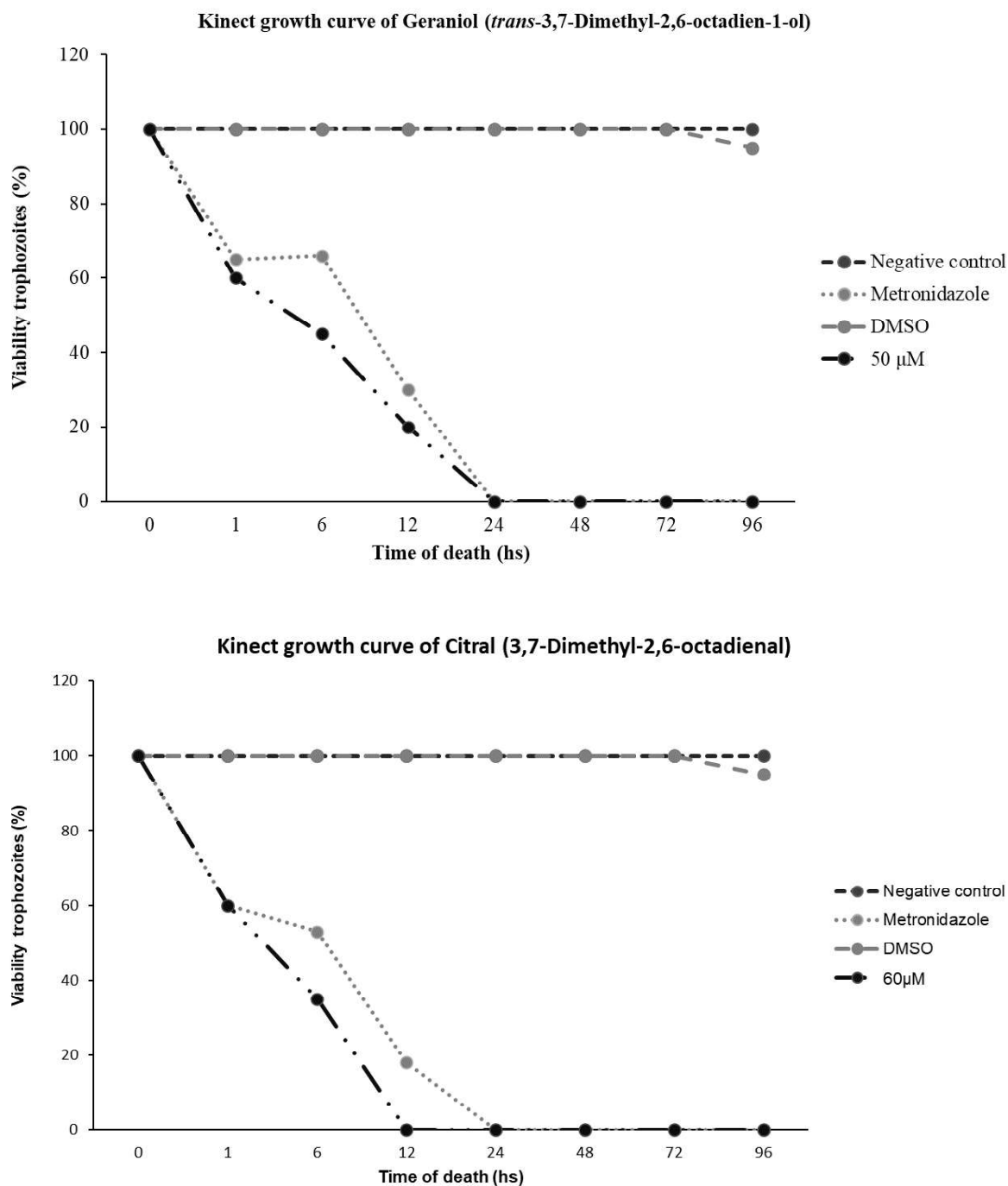


Figure 2- Time of death of *Trichomonas gallinae* after treatment with the control groups, treatment groups with the standard drug, as well as citral and geraniol in the period of 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h.

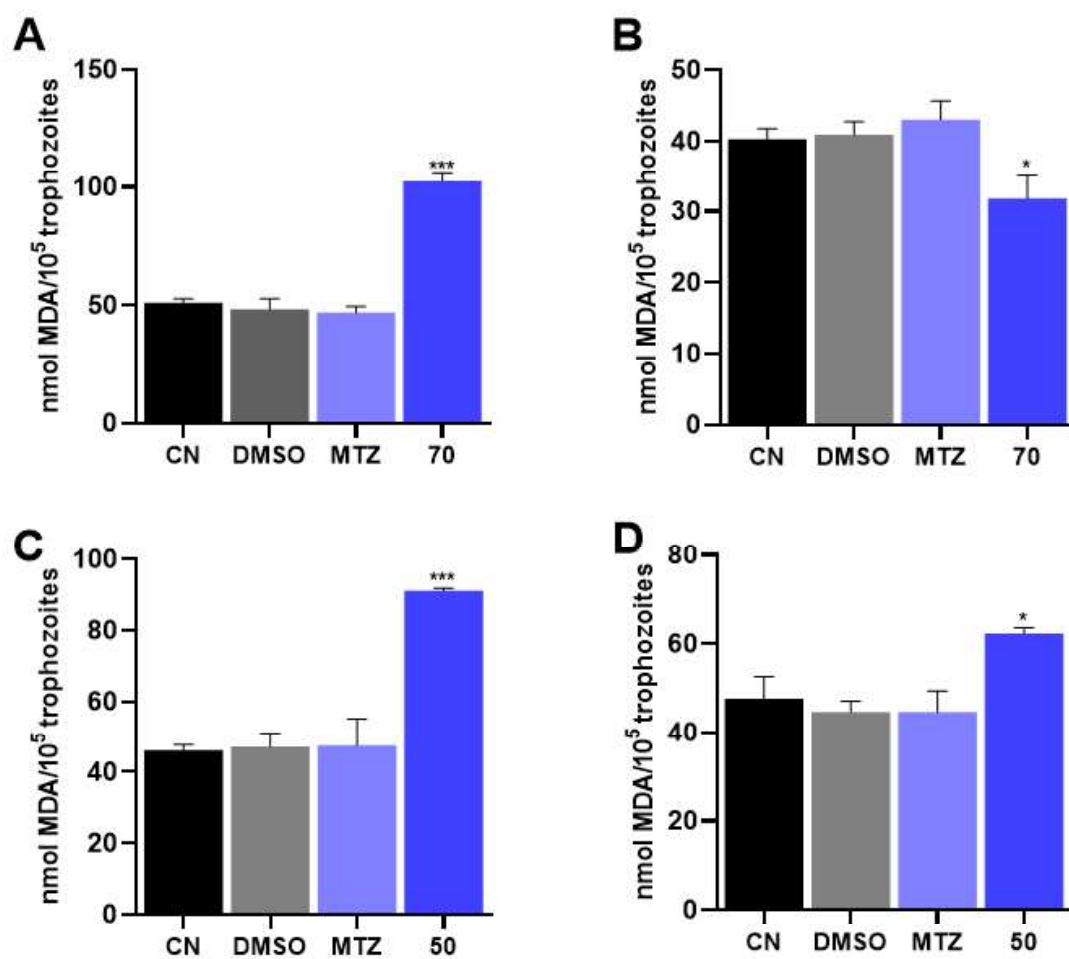


Figure 3- Lipid peroxidation levels immediately of exposure to citral (60 μ M) (A), and to geraniol (50 μ M) (C), and after 24 h of exposure to citral (60 μ M) (B) and geraniol (50 μ M) (D). Nos gráficos também estão expressos os grupos, Control (untreated trophozoites), DMSO (vehicle), MTZ (metronidazole at 100 μ M). Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n= 3-4). * P < 0.05 and *** P < 0.001 when compared with control group.

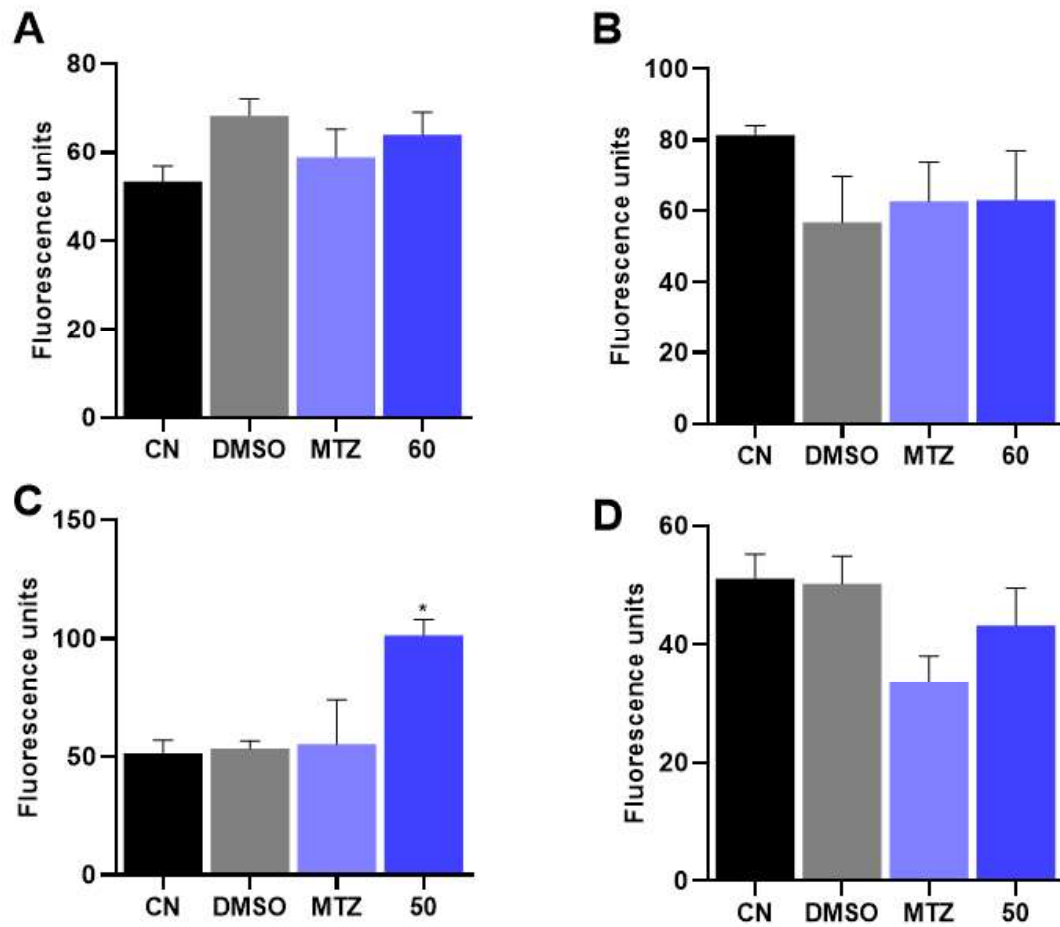


Figure 4- Reactive species levels immediately of exposure to citral (60 μ M) (A), and to geraniol (50 μ M) (B), and after 24 h of exposure to citral (60 μ M) (C) and geraniol (50 μ M) (D). Control (untreated trophozoites), DMSO (vehicle), MTZ (metronidazole at 0,171 μ g/mL). Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n= 3-4). * P < 0.05 when compared with control group.

Table 1. Best docking results according to PLIP analysis of the residues involved in hydrophobic and hydrogen bonding.

Binding site	Residues	Ligand pose	Molecule	Affinity (kcal/mol)
1	177,215,272, 366	6	Citral	-4.1
	247,248,366	5	Geraniol	-4.1
2	94,95,98,123,148,151	1	Citral	-5.4
3	44,57,58	4	Citral	-4.2
	44,58	1	Geraniol	-4.6
4	293,321	9	Citral	-3.3
	321,322	5	Geraniol	-3.7
5	107,137,141	7	Citral	-4.5

Table 2. Predicted binding sites for ligands in COACH server and those described in UNIPROT, ranked by best prediction.

Rank	Predicted binding sites
1	177-179,215,219,247,248,272,273,301-306, 366
2	93-99,123,146-148,150,151
3	42-46,49,51,52,55,57,58,92,148,149
4	170,281,293,295,321,322,325
5	86,103,107,109,111,112,131,136-142

Table 3. Ligand binding affinity (kcal/mol) of the best results (pose 1) of different binding sites tested with Autodock Vina.

Ligand	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5
Citral	-5.1	-5.4	-4.6	-3.9	-5.2
Geraniol	-5.1	-4.8	-4.6	-3.9	-4.6

Table 4. Best docking results according to PLIP analysis of the residues involved in hydrophobic and hydrogen bonding.

Binding site	Residues	Ligand pose	Molecule	Affinity (kcal/mol)
1	177,215,272, 366	6	Citral	-4.1
	247,248,366	5	Geraniol	-4.1
2	94,95,98,123,148,151	1	Citral	-5.4
3	44,57,58	4	Citral	-4.2
	44,58	1	Geraniol	-4.6
4	293,321	9	Citral	-3.3
	321,322	5	Geraniol	-3.7
5	107,137,141	7	Citral	-4.5

4.4 Artigo 4

Atividade biológica do óleo essencial e nanoemulsão de *Cymbopogon flexuosus* em codornas, antioxidante, bioquímico e histológico.

Bruna Baccega¹, Alexia Brauner de Mello¹, Paloma Taborda Birmann², Aline Ferreira Ourique³, Samanta da Silva Gündel³, Rodrigo de Almeida Vaucher⁴, Milena Cerveira⁴, Luiza Spohr⁵, Lucielli Savegnago², Roselia Maria Spanevello⁵, Camila Belmonte Oliveira¹

Atividade biológica do óleo essencial e nanoemulsão de *Cymbopogon flexuosus* em codornas, antioxidante, bioquímico e histológico.

Bruna Baccega¹, Alexia Brauner de Mello¹, Paloma Taborda Birmann², Aline Ferreira Ourique³, Samanta da Silva Gündel³, Rodrigo de Almeida Vaucher⁴, Milena Cerveira⁴, Luiza Spohr⁵, Lucielli Savegnago², Roselia Maria Spanevello⁵, Camila Belmonte Oliveira¹

¹Graduate program, Department of Microbiology and Parasitology- Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

²Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel

³Laboratory of Nanotechnology - Franciscan University, Santa Maria, RS, Brazil

⁴Research Laboratory in Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM), Federal University of Pelotas, Pelotas

⁵Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

RESUMO

A tricomoníase aviária afeta principalmente o trato digestivo superior das aves, causada pelo protozoário flagelado *Trichomonas gallinae*. O presente estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito do tratamento com óleo essencial e nanoemulsão de *Cymbopogon flexuosus* nos parâmetros bioquímicos e histológicos em codornas infectadas experimentalmente com *Trichomonas gallinae*. As aves foram divididas em grupos (n=5), controle não infectado, controle infectado, controle de Tween (0,01%), nanoemulsão branca (0,88mg / kg), metronidazol (25 mg / kg), óleo essencial de capim-limão (OE-CL a 0,55 mg / kg) e nanoemulsão de capim-limão (N-CL a 0,44 mg /

kg). Para isso, as aves foram tratadas por sete dias com óleo essencial e nanoemulsão. No teste com o soro para a determinação dos níveis de Espécies Reativas (ROS) e Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e Superóxido dismutase (SOD) mostrou que óleo e a nanoemulsão possuem atividade antioxidante. Não foram observadas alterações microscópicas na cavidade oral, fígado e rins, porém, apresentaram lesões no esôfago. Os dados do presente estudo introduziram *C. flexuosus* como um potente agente anti-trichomonal natural e eficaz contra *T. gallinae*.

Keywords: phytotherapy, birds, lemongrass, antioxidant

INTRODUÇÃO

O cranco é uma doença causada pelo protozoário *Trichomonas gallinae*, parasito que infecta boca, papo, esôfago e faringe de aves selvagens e domésticas, provocando erosões e lesões necróticas em órgãos internos, como fígado, pulmões e sacos aéreos (STABLER, 1954; AMIN et al., 2014; GRUNENWALD et al., 2018). A alimentação é a principal via de transmissão entre os pássaros, levando a sinais clínicos de engasgo, regurgitação, vômito, diarreia, ptialismo e morte (STABLER, 1954; AMIN et al., 2014). Infecções assintomáticas também são comuns. A gravidade da infecção está relacionada à virulência da cepa (Girard et al., 2014).

O tratamento de tricomoniase, nas últimas décadas, envolve 5'-nitroimidazoles, por exemplo, metronidazol, tinidazol, ornidazole e nimorazole. A toxicidade induzida pelo tratamento de 5-nitroimidazóis é um problema a ser minimizado para garantir a observância do paciente e assegurar o controle adequado da doença (HUSSEIN et al., 2011). Metronidazol (MTZ) é altamente recomendado para curar a doença (AYDIN et al., 2000; SEDDIEK et al., 2012). A resistência ao MTZ está bem documentada e os mecanismos envolvidos em suas atividades foram definidos com precisão (UPCROFT & UPCROFT, 2001). Existem alguns efeitos colaterais relacionados à ingestão de MTZ, como neutropenia transitória, náuseas, câncer e neuropatia periférica (KUROHARA et al., 1991; SOBEL et al., 1999). Estes efeitos podem estar relacionados à formação de radicais livres e causar a toxicidade deste grupo de fármacos (MORENO et al., 1982).

O aumento da produção de radicais livres está ligado muitas vezes à utilização de substâncias químicas reativas que podem causar danos celulares aos organismos vivos. Em condições fisiológicas normais, há um equilíbrio crítico na geração de radicais livres e sistemas de defesa antioxidante contra a lesão de radicais livres (POLI, 1993; RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e defesa antioxidante cria uma condição conhecida como estresse oxidativo. Observações clínicas e evidências experimentais sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel dominante papel na defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias (SCHIRMER et al., 1987).

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima da mitocôndria e o citosol da maioria das células (hepáticas, musculares, renais, neuronais, eritrócitos, esplênicas, intestinais e pulmonares). A GGT (gama glutamiltransferase) é enzima de membrana associada a vários tecidos. Atividade sérica ou plasmática elevada ocorre por meio do aumento de produção e de liberação pelo tecido hepatobiliar (CAMPBELL, 2004). A histopatologia é uma ferramenta importante na identificação das lesões causados pelo protozoário. Porém, muitas vezes, a infecção parasitária é julgada como algo incidental, uma vez que os agentes são considerados como de pouco potencial patogênico (SANTOS et al., 2015).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento do óleo essencial e nanoemulsão de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) em codornas (*Coturnix coturnix japônica*) positivas para *T. gallinae*, sobre os parâmetros de estresse oxidativo, bioquímicos e histológicos

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para esse estudo foram utilizadas codornas (*Coturnix coturnix japônica*), com 6 semanas de idade, e peso médio de 115 gramas. Os animais inicialmente passaram por um período de adaptação de 15 dias, esses foram alocados em gaiolas específicas para a espécie, separadas e alimentadas com ração (100 a 120 gramas / ave / dia) e água. Posteriormente os animais foram divididos em sete grupos com cinco animais cada, mantidos em um ciclo claro / escuro de 12/12h em ambiente climatizado e com temperatura constante ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Grupo A (controle - não infectado), B (controle -

infectado), C (controle TW 0,01%), D (NB 0,88mg / kg), E (MTZ 25 mg / kg, F (OE-CL a 0,55 mg / kg) e G (N-CL a 0,44 mg / kg). Os tratamentos foram administrados por via oral (gavagem) uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos (YOUSSEFI et al., 2017).

Os grupos dos animais foram divididos em sete grupos (n=5). A partir do sétimo dia após a infecção, foram observados trofozoítos nas aves. Estes foram examinados diariamente, durante 15 dias, pelo método de montagem úmida e observados ao microscópio óptico, para confirmação da infecção. O peso corporal das codornas foi avaliado no início e no final do experimento. As codornas foram submetidas à eutanásia imediatamente após sete dias de tratamento, onde foram colhidas amostras de sangue via cardíaca, e os outros materiais.

O experimento foi conduzido de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética e Experimentação Animal da instituição, sob protocolo número 23110.012860 / 2018-81.

Análises bioquímicas

As amostras foram coletadas em tubo sem anticoagulante contendo gel separador, as amostras foram centrifugadas a x RPM por x minutos. Posteriormente o soro foi acondicionado em microtubos para análise.

Para a determinação da ureia e creatinina em soro, utilizou-se o ensaio de creatinina cinética, foi empregado a metodologia descrita por Jaffe (1886), adaptada ao sistema automatizado Cobas Mira® (Roche Diagnostics, Suíça). Utilizou-se o Kit Comercial da Wiener Lab ® e Labtest ®. Para o ensaio de Aspartato Aminotransferase (AST), empregou-se a metodologia descrita por Karmen (1955), e para a determinação da ALT Alanina Aminotransferase (ALT), foi utilizado a metodologia de Karmen (1955). Para a determinação dos níveis séricos Gama Glutamil Transferase (GGT) utilizou-se a metodologia de Szasz (1969) modificada. Para ambos os testes (AST/ALT) utilizou-se o Kit Comercial da Labtest ® e adaptada ao sistema automatizado Cobas Mira® (Roche Diagnostics, Suíça). Todos os resultados dos testes foram expressos em μl .

Determinação de parâmetros de estresse oxidativo através de soro e tecidos

Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A medida da peroxidação lipídica foi determinada por TBARS de acordo com o protocolo descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Resumidamente, os homogenados foram misturados com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 0,67% e aquecidos em banho-maria por 25 min. TBARS foi determinado pela absorbância a 535 nm. Os resultados foram relatados como nmol de TBARS por mg de proteína.

Ensaio de superóxido dismutase (SOD)

A atividade total de SOD foi medida usando o método descrito por Misra e Fridovich (1972). Este método é baseado na inibição da auto-oxidação da adrenalina dependente de superóxido em um espectrofotômetro ajustado a 480 nm. A atividade específica da SOD foi relatada em unidades por mg de proteína.

Ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A oxidação de DCFH-DA a 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi medida para detectar espécies reativas de oxigênio intracelular. A intensidade de fluorescência de DCF foi registrada usando excitação a 488 nm e emissão a 525 nm 30 min após a adição de DCFH-DA ao meio. A formação de ROS foi determinada de acordo com Ali et al. (1992) com algumas modificações e foi expresso como $\mu\text{mol DCF} / \text{mg de proteína}$.

Análise histológica

Fragmentos da cavidade oral, esôfago, fígado e rins foram coletados e fixados por imersão em solução de formalina 10% tamponada. Os mesmos foram processados rotineiramente, embebidos em parafina, cortados em secções de 3-4 μm , corados com hematoxilina-eosina (HE) e examinados ao microscópio óptico.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância univariada (ANOVA) com valor de probabilidade $p \leq 0,05$, seguida do Teste de Tukey (GraphPad Prism 8.0 Software).

RESULTADOS

Análises bioquímicas

E os resultados da avaliação do *T. gallinae*? O óleo e a nano funcionou in vivo?

E o peso? Animais ganharam ou perderam peso entre os grupos?

Os resultados das análises bioquímicos em aves tratadas com o óleo essencial e a nanoemulsão de *Cymbopogon flexuosus* sobre *T. gallinae* e a comparação dessa atividade com o fármaco metronidazol podem ser observados na tabela 1.

Table 1- Parâmetros bioquímicos após tratamento de *Coturnix coturnix* com óleo essencial livre e nanoestruturado de *Cymbopogon flexuosus* (média $\pm$ SD)

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

*diferença estatística quando comparado ao controle não infectado

Análises histológicas

Durante o experimento, não foram observadas mudanças significativas e mortes entre os animais. A análise macroscópica dos órgãos dos animais dos sete grupos após a administração das substâncias sob suas diferentes concentrações não apresentou nenhuma alteração. Na análise histológica microscópica não foram observadas alterações na cavidade oral, fígado e rins. No entanto, no esôfago foram observadas pequenas alterações ocasionadas devido à resposta inflamatória provocada pelos trofozoítos do protozoário *Trichomonas gallinae*, nos animais do grupo controle infectado, com o grupo tratado com óleo essencial livre e nanoemulsão (Fig.1).

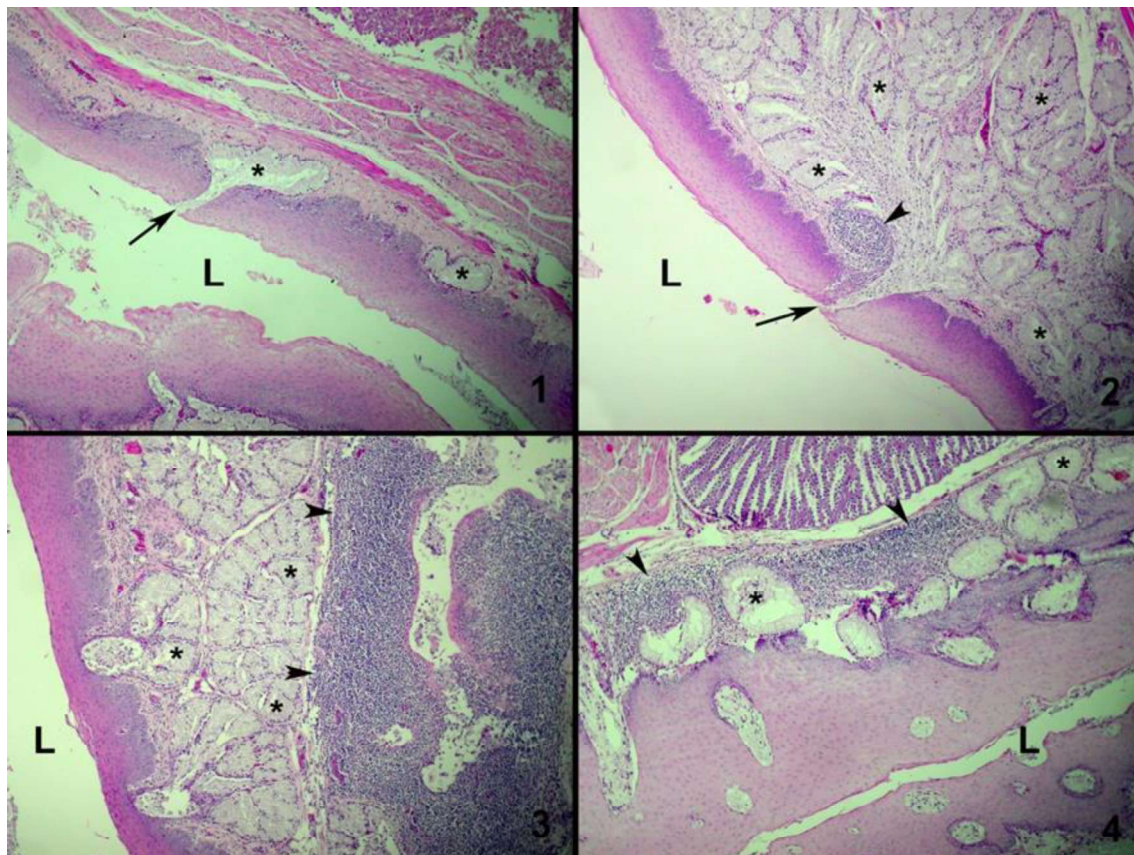


Figura 1- 1- esôfago. Animal controle. Ácinos mucosos (*). Ducto glandular (seta). Luz do órgão (L). HE. 100X. 2- esôfago. Animal inoculado com trofozoítos. Infiltrado inflamatório focal de células mononucleares em ácino mucoso (cabeça de seta). Ácinos mucosos (*). Ducto glandular (seta). Luz do órgão (L). HE. 100X. 3- esôfago. Animal inoculado com trofozoítos e tratado com óleo essencial. Extensa área de infiltrado inflamatório de células mononucleares (cabeça de seta). Ácinos mucosos (*). Luz do órgão (L). HE. 100X. 4- esôfago. Animal inoculado com trofozoítos e tratado com nanoemulsão óleo essencial. Área focalmente extensiva de infiltrado inflamatório de células mononucleares em ácinos mucosos. Luz do órgão (L). Ácinos mucosos (*). HE. 100X.

Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

A análise dos dados demonstrou que após a exposição aos tratamentos com óleo essencial e nanoemulsão, ocorreu a indução dos níveis de peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle negativo no plasma das codornas (ANOVA: $F(6, 28) = 19,25$, $P < 0.001$ [Fig. 1A] e $F(6, 28) = 10,40$, $P < 0.001$ respectivamente) [Fig. 2B].

A análise de TBARS do rim $F(6, 28) = 4,536$, $P < 0,0025$ [Fig. 2C], mostrou que o controle sadio, tween e a nanoemulsão branca aumentaram a peroxidação lipídica, quando comparado ao controle negativo. No fígado não houve diferença significativa $F(6, 28) = 0,5633$, $P = 0,7557$ [Fig. 2D]. Além disso, nos rins a nanoemulsão diminuiu a formação de espécies reativas (ROS) quando comparado ao controle negativo, já no fígado não ocorreu diferença significativa $F(6, 28) = 4,841$, $P = 0,0017$ [Fig. 2E] and $F(6, 28) = 2,089$, $P = 0,0866$ [Fig. 2F].

No que diz respeito à atividade antioxidante das enzimas (SOD), observou-se que os tratamentos empregados nas codornas, mostrou que nos rins todos os grupos tiveram uma diminuição da atividade enzimática em comparação ao controle negativo, exceto o controle sadio $F(6, 28) = 6,594$, $P = 0,0002$ [Fig. 2G]. No fígado não houve diferença significativa $F(6, 28) = 9,038$, $P < 0,0001$ [Fig. 2H].

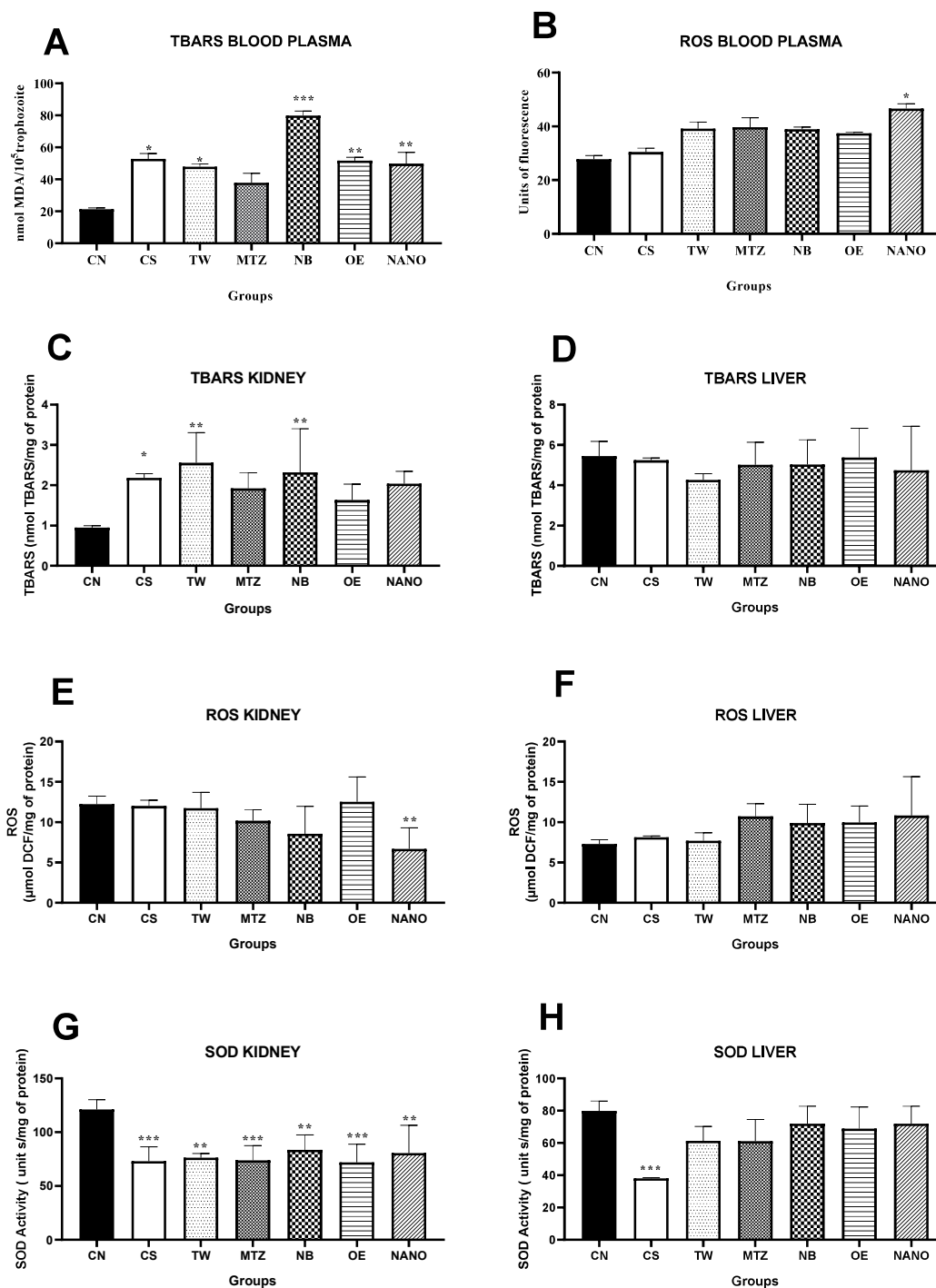


Figura 2- Níveis de espécies reativas (TBARS, ROS, SOD) em exposição ao óleo essencial *Cymbopogon flexuosus* (0,090 μ g / mL), e nanoemulsão em fígado, rim e plasma de codornas positivas para *Trichomonas gallinae*. Controle não infectado (trofozoítos não tratados), Controle infectado, TW (veículo 0.01%), MTZ (metronidazol 25 mg/kg), NB (nanoemulsão branca 0,88mg/kg) OE-CF (óleo essencial *Cymbopogon flexuosus* 0,55 mg/kg) e N-CF (nanoemulsão *Cymbopogon flexuosus* 0,44 mg/kg). Os

dados são expressos como média $\pm$ SEM (n =5). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle.

DISCUSSÃO

Os tricomonádídeos são protozoários microaerófilos e possuem uma organela redox responsável pela descarboxilação oxidativa do piruvato, o hidrogenossomo. O mecanismo de ação do metronidazol já é bem conhecido na literatura (ANVISA, 2007). Segundo Kulda (1999) o efeito da droga está relacionado à sua redução dentro do hidrogenossomo, através da transferência de elétrons catalisada pela ferredoxina para o metronidazol. As drogas do grupo dos nitroimidazóis são seletivas para anaeróbios. Sob condições anaeróbicas e de baixas tensões de oxigênio, ocorre a transferência de um único elétron, levando à geração de ao menos três radicais intermediários com potenciais citotóxicos. Os efeitos colaterais do MTZ incluem citotoxicidade (OYEDAPO et al. 2004), possíveis carcinogênicas propriedades (Sobel et al. 1999), disfunção neurológica (CAYLOR & CASSIMATIS 2001), e desenvolvimento de resistência (FRANSSEN & LUMEIJ 1992).

Os antioxidantes naturais são amplamente distribuídos em plantas medicinais, possuindo diversas atividades biológicas (EL-HACK et al., 2020). Os óleos de capim-limão possuem atividade antioxidante devido ao seu conteúdo offlavonóides e fenóis (NAMBIAR & MATELA, 2012). O capim-limão é uma erva que tem sido cultivada para finalidades medicinais em vários países (RIQUELME et al., 2017) e o citral é o principal constituinte do óleo e é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras, fungistáticas antimicrobianas, antioxidantes e antissépticas (LERTSATITTHANAKORN et al., 2006; BACHIEGA & SFORCIN, 2011). O capim-limão contém uma quantidade muito elevada de vitamina C e seu óleo mostra atividades antioxidantes com capacidade de melhorar o status lipídico e antioxidante (GUIMARÃES et al., 2011). Singh e colaboradores (2015) afirmam que os compostos fenólicos possuem capacidade de fornecer hidrogênio ou elétrons, explicando a remoção do oxigênio dos radicais livres.

Para investigar um possível mecanismo de ação do óleo e a nanoemulsão de *C. flexuosus* contra *T. gallinae*, avaliamos suas capacidades pró-oxidantes e antioxidantes no ensaio de ROS, TBARS, SOD do fígado, rins e plasma das codornas. O óleo de capim-limão foi identificado neste estudo como um potente antioxidante com capacidade de melhorar o status lipídico e antioxidante. A redução da peroxidação lipídica observada nos tratamentos com óleo e a nanoemulsão, podem ser observadas e

este fato pode ser atribuído ao potencial do capim-limão é fonte de compostos bioativos, flavonoides e vitaminas que podem inibir as reações em cadeia de oxidação lipídica, justificando assim a atividade antioxidante obtido (Ibrahim e Salem, 2013). Além disso, os componentes da nanoestrutura utilizadas neste estudo possuem atividade antioxidante (BOUNOUS, 2000, EL-KADY et al., 2010).

Segundo Giri et al. (2016) radicais livres estão ligados à oxidação lipídica das membranas celulares, liberando nutrientes e substâncias tóxicas para a célula no espaço extracelular, causando perda de fluidez e aumento da permeabilidade da membrana e até mesmo sua ruptura. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um dos principais marcadores biológicos desse tipo de dano às membranas celulares (DRAPER & HADLEY, 1990).

Nossos resultados demonstram que o tratamento do óleo essencial e a nanoemulsão aumentou os níveis de espécies reativas (ROS) e, consequentemente, aumentou a peroxidação lipídica no rim das codornas quando comparado ao grupo controle a partir desses resultados. Acreditamos que a citotoxicidade do citral, composto majoritário do óleo essencial possui efeito pró-oxidante, devido que os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares são degradados pela peroxidação lipídica, com consequente alteração da integridade da membrana, sugerindo que a peroxidação lipídica, mediada por espécies reativas, é uma causa importante de dano celular, que pode levar à morte celular.

Halliwell (2007) os metabólitos reativos de oxigênio são importantes substâncias geradas por meio de células metabolismo em que as moléculas de oxigênio frequentemente passam pelo processo de redução. Além disso, a maioria radicais livres em sistemas biológicos são derivados da molécula de oxigênio que é referido como "Espécies Reativas de Oxigênio" (ROS). Essas substâncias são produzidas como produtos de metabolismo celular normal. Produção excessiva de espécies ativas de oxigênio ou perturbando o equilíbrio entre a formação e a remoção resultaria em estresse oxidativo, o que ocorreu no presente trabalho, quando empregado a análise de ROS sobre o plasma e rim das codornas. (POLI et al., 1993).

Segundo Halliwell (1994) os antioxidantes enzimáticos incluem principalmente superóxido dismutase (SOD). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante pode estar envolvida na patogenia de algumas doenças, de acordo com Halliwell (2007). A presença de atividade de SOD no rim mostra que o óleo e a nanoemulsão induziram a produção significativa de antioxidante. O estresse oxidativo é

principalmente associado à produção de substâncias reativas derivadas de oxigênio que são, em última análise, responsáveis pelos níveis de danos a uma grande variedade de componentes celulares (DNA, lipídios de membrana, enzimas, etc.)

Os resultados para AST, ALT e GGT apresentaram níveis baixos, acredita-se que o mesmo poderia ser explicado devido ao isolado de *Trichomonas gallinae* não ser patogênico e assim não invadir e danificar o fígado e pelo tratamento não ter causado lesões, diferindo estudo de Seddiek et al. (2014), que em seu experimento as aves infectadas com o protozoário apresentaram níveis bioquímicos aumentados para ALT e AST, devido a cepa ser patogênica.

Para as análises renais tanto os resultados de ureia como creatinina apresentaram níveis elevados, diferindo o trabalho de Sekhar e Sinha (1986) não comprometendo os rins dos animais.

Nenhuma alteração histológica foi observada no fígado e rins dos animais, sugerindo que não ocorreram lesões macroscópicas e microscópicas, tanto para o tratamento com o fármaco padrão metronidazol, como para o uso do óleo essencial e a nanoemulsão. Achados semelhantes são descritos na literatura, como no estudo de Cole e Friend (1999), que afirmam que cepas com virulência moderada são frequentemente associadas a abscessos caseosos na região orofaríngea, não havendo lesões visíveis. Stabler (1948) relata que 90% dos pombos adultos infectados não mostram quaisquer sinais clínicos da doença.

As lesões ocasionadas por estes protozoários variam desde úlcera na mucosa à grandes nódulos caseosos, ocasionando altas taxas de mortalidade, (EL KATAN et al., 2017) [48]. Girard et al. (2014) diagnosticaram aves com lesões case necróticas na orofaringe e esôfago, essas lesões se estendem pela mucosa do trato digestório superior, semelhante ao presente estudo, o qual só apresentou lesões microscópicas no esôfago dos animais tratados com o óleo essencial de *C. flexuosus* e a nanoemulsão. A tricomoníase provoca placas diftéricas branco-amareladas caseosas na orofaringe, esôfago, ingluvío e traquéia. As formas sistêmicas no fígado e pulmão são menos comuns (KRONE & COOPER, 2002; SAMOUR, 2003; FORRESTER E FOSTER, 2008).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo de capim-limão e a nanoemulsão possui a atividade antioxidante. Ambos os tratamentos não apresentaram lesões no fígado e rins, apresentando níveis baixos de AST, ALT, GGT, ureia e creatinina. No exame histológico, só foram observadas lesões no esôfago.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPERGS para o processo ADR / 2017. Obrigada à parceria com a UFN de Santa Maria. O presente estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Código Financeiro 001.

REFERÊNCIAS

- ALAGAWANY, M. et al. Use of lemongrass essential oil as a feed additive in quail's nutrition: its effect on growth, carcass, blood biochemistry, antioxidant and immunological indices, digestive enzymes and intestinal microbiota. *Poultry Science*, v. 100, n. 6, p. 101172, 2021.
- ALI, Ashiq; KLEIN, April; ROSENFELD, James. Analysts' use of information about permanent and transitory earnings components in forecasting annual EPS. *Accounting Review*, p. 183-198, 1992.
- AMIN A, BILIC I, LIEBHART D, HESS M. Trichomonads em pássaros-uma revisão. *Parasitologia*. 2014; 141 (6): 733. pmid: 24476968.
- AYDIN, L. et al. Efficacy of carnidazole (Spatrix®) and metronidazole (Flagyl®) against *Trichomonas gallinae* in naturally infected pigeons. *Acta Parasitologica Turcica*, v. 24, n. 1, p. 65-66, 2000.
- BACHIEGA, Tatiana Fernanda; SFORCIN, José Maurício. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *Journal of ethnopharmacology*, v. 137, n. 1, p. 909-913, 2011.
- BRASIL. ANVISA. Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, [s. l.], 2007. Disponível em: . Acesso em: 22 abr. 2020.
- CAMPBELL, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M.A. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004,. p. 479-492.
- CAYLOR, Kevin B.; CASSIMATIS, Marina K. Metronidazole neurotoxicosis in two cats. *Journal of the American animal hospital association*, v. 37, n. 3, p. 258-262, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trichomoniasis. Disponível em . Acesso em: 04 out. 2021.

COLE R.A. Trichomoniasis. In: Friend M.; Franson J.C.; editors. 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.

DRAPER, H. H[†]; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods in enzymology, v. 186, p. 421-431, 1990.

EL-KHATAM, Ahmed O. et al. *Trichomonas gallinae*: prevalence and molecular characterization from pigeons in *Minoufiya governorate*, Egypt. Experimental parasitology, v. 170, p. 161-167, 2016.

EL-SABER BATIHA, Gaber et al. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. Nutrients, v. 12, n. 3, p. 872, 2020.

ESMAEILNEJAD, Bijan et al. Evaluation of antioxidant status, oxidative stress and serum trace mineral levels associated with *Babesia ovis* parasitemia in sheep. Veterinary parasitology, v. 205, n. 1-2, p. 38-45, 2014.

ESTERBAUER, Hermann; CHEESEMAN, Kevin H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in enzymology, v. 186, p. 407-421, 1990.

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.

FRANSSEN, F. F. J.; LUMEIJ, J. T. *In vitro* nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, v. 15, n. 4, p. 409-415, 1992.

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.

GIRI, Tapan Kumar et al. Nano-encapsulation of capsaicin on lipid vesicle and evaluation of their hepatocellular protective effect. International journal of biological macromolecules, v. 88, p. 236-243, 2016.

GRUNENWALD C., et al. Tetratrichomonas e doença associada a trichomonas spp. em *Eiders comuns* de vida livre (*Somateria mollissima*) de Wellfleet Bay, MA e descrição dos genótipos da região ITS1. Doenças aviárias. v.62, n.1, p. 117–23, 2018.

GRUNKEMEYER, Vanessa L. Advanced diagnostic approaches and current management of avian hepatic disorders. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice, v. 13, n. 3, p. 413-427, 2010.

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de Lima et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, p. 464-472, 2011.

HALLIWELL, Barry. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical society transactions*, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HANAA, AR Mohamed et al. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 57, n. 2, p. 113-116, 2012.

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. Comparison of *in vitro* activity of metronidazole and garlic-based product (Tomex®) on *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, v. 112, n. 5, p. 2063-7, 2013.

JAFFÉ, Max. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. 1886.

KARMEN A., WRÓBLEWSKI F., LA DUE J. Transaminase activity in human blood. *J. of Clin Investigation*, v.34, n. 1, p. 131, 1955.

KHATER, G. A. Influence of Cr₂O₃, LiF, CaF₂ and TiO₂ nucleants on the crystallization behavior and microstructure of glass-ceramics based on blast-furnace slag. *Ceramics International*, v. 37, n. 7, p. 2193-2199, 2011.

KHATER, Hanem F. et al. Abdel. *In vitro* control of the camel nasal botfly, *Cephalopina titillator*, with doramectin, lavender, camphor, and onion oils. *Parasitology research*, v. 112, n. 7, p. 2503-2510, 2013.

KOUSHIK, O. et al. Nano drug delivery systems to overcome cancer drug resistance—a review. *J Nanomed Nanotechnol*, v. 7, n. 378, p. 2, 2016.

KRONE, O.; COOPER, J. E. Parasitic diseases. *Birds Of Prey: Health & Disease*, p. 105-120, 2002.

KULDA, Jaroslav. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International journal for parasitology*, v. 29, n. 2, p. 199-212, 1999.

KUROHARA, Margaret L. et al. Metronidazole hypersensitivity and oral desensitization. *Journal of allergy and clinical immunology*, v. 88, n. 2, p. 279-280, 1991.

LERTSATITTHANAKORN, P. et al. *In vitro* bioactivities of essential oils used for acne control. *International Journal of Aromatherapy*, v. 16, n. 1, p. 43-49, 2000

MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

NAMBIAR, Vanisha S.; MATELA, Hema. Potential functions of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) in health and disease. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, v. 3, n. 5, p. 1035-1043, 2012.

NAZIFI, S. et al. Evaluation of erythrocyte antioxidant mechanisms: antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and serum trace elements associated with progressive anemia in ovine malignant theileriosis. *Parasitology Research*, v. 109, n. 2, p. 275-281, 2011.

OYEDAPO, A. O. et al. Antitrichomonal activity of 1, 3-diaryl-2-propen-1-ones. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v. 1, n. 1, p. 55-62, 2004.

POLI, Giuseppe et al. Modulation of hepatic fibrogenesis by antioxidants. *Molecular aspects of medicine*, v. 14, n. 3, p. 259-264, 1993.

RAMAKRISHNA, Vadde; JAILKHANI, Rama. Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. *Diagnostic pathology*, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2007.

REITMAN, Stanley; FRANKEL, Sam. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American journal of clinical pathology*, v. 28, n. 1, p. 56-63, 1957.

RIQUELME, Natalia; HERRERA, Maria Lidia; MATIACEVICH, Silvia. Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: Effect of process and storage conditions. *Food and Bioproducts Processing*, v. 104, p. 94-103, 2017.

POLAT, Umit et al. Serum biochemical profile of broiler chickens fed diets containing rosemary and rosemary volatile oil. *J Biol Environ Sci*, v. 5, n. 13, p. 23-30, 2011.

SAMOUR, J. H.; NALDO, J. L. Diagnosis and Therapeutic Management of Trichomoniasis in Falcons in Saudi Arabia. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. v.17, n.3, p.136–143, 2003.

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.

SCHIRMER, R. H. et al. Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. Free radical research communications, v. 3, n. 1-5, p. 3-12, 1987.

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.

SEKHAR, P. C.; SIMHA, S. S. Effect of helminthiasis on the total and differential leucocyte count in chicken blood. Indian Veterinary Journal (India), 1985.

SCHWEBKE, Jane R.; BARRIENTES, Frank J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.

SINGH, Madhav; KAISER, Jörg; HAHN, Horst. Thick electrodes for high energy lithium ion batteries. Journal of The Electrochemical Society, v. 162, n. 7, p. A1196, 2015.

SOBEL, Jack D.; NAGAPPAN, Vijayalakshmi; NYIRJESY, Paul. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis—an emerging problem. New England Journal of Medicine, v. 341, n. 4, p. 292-293, 1999.

STABLER RM. *Trichomonas gallinae*: uma revisão. Experimental Parasitology, v.3, n.4, p.368–402, 1954;

TABLER, Robert M. Protection in pigeons against virulent *Trichomonas gallinae* acquired by infection with milder strains. The Journal of parasitology, v. 34, n. 2, p. 150-153, 1948.

TABARI, M. A. et al. Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against tricho-moniasis in Pigeon (*Columba livia domestica*), British Poultry Science, v. 58, n. 3, p. 236-241, 2017.

THRALL M.A., BACKER D.C., CAMPBELL T.W., DENICOLA D., FETTMAN M.J., LASSEN E.D., Rebar A. & Weiser G. 2007. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Roca, São Paulo. 592p.

TRAESEL, Carolina Kist et al. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. Comparative Clinical Pathology, v. 20, n. 5, p. 453-460, 2011.

UPCROFT, Jacqueline A.; UPCROFT, Peter. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 45, n. 6, p. 1810-1814, 2001.

WANT, Muzamil Yaqub; YADAV, Priya; AFRIN, Farhat. Nanomedicines for therapy of visceral leishmaniasis. Journal of nanoscience and nanotechnology, v. 16, n. 3, p. 2143-2151, 2016.

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.

5. Conclusões gerais

- Os óleos essenciais e suas respectivas nanoemulsões foram capazes de reduzir a viabilidade dos trofozoítos de *T. gallinae* que estavam causando a morte celular em diferentes concentrações.
- O uso de OE de manjerição foi mais eficaz contra trofozoítos de *T. gallinae* com concentrações crescentes de óleo essencial e nanoemulsão em um tempo de 12 horas.
- A eficácia do OE de manjerição e eucalipto só atingiu 100% de eficácia após 24 horas de contato.
- O teste *in vitro* mostrou que as concentrações de OE-CL (550 µg / ml) e N-CL (440 µg / ml) reduziram a viabilidade dos trofozoítos em 100%.
- No teste *in vivo*, o tratamento com OE-CL foi eficaz no 4º dia de tratamento e o N-CL após o 3º dia, e o MTZ na concentração terapêutica foi eficaz no 7º dia.
- O capim-limão possui potencial natural de atividade antitricomonal contra *T. gallinae in vitro* e *in vivo*.
- O citral revelou que 60 µM, inibiu a conclusão do crescimento do trofozoíto pelo composto em 12 horas de incubação.
- O geraniol houve eficácia a partir da concentração de 50 µM, após 24 h de incubação a partir da concentração.
- A análise dos dados demonstrou que imediatamente após a exposição aos tratamentos com óleo de citral e geraniol (60 µM e 50 µM) induziu os níveis de peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle negativo.
- Citral não foi capaz de alterar significativamente os níveis de RS quando comparados ao grupo de controle negativo.
- Geraniol houve alteração significativa nos níveis de RS quando comparado ao grupo de controle negativo.

- O geraniol e o citral inibem uma enzima hidrogenossômica crucial para a sobrevivência de *T. gallinae*.
- Citral reduziu o crescimento das células VERO de maneira dependente da dose e do tempo.
- Geraniol, o ensaio pelo método (MTT) indicou que a viabilidade celular permaneceu acima de 100%.
- Conclui-se que o óleo de capim-limão e a nanoemulsão possui a atividade antioxidante.
- O óleo e a nanoemulsão de capim-limão não apresentaram lesões no fígado e rins.
- No exame histológico, só foram observadas lesões no esôfago.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGAZ, B.; YOHANNES, P. G.; DIETER, K. Constituents of the essential oil of Ethiopian *Cymbopogon citratus* Stapf. **Journal of Natural Products**, v.46, n.3, p.424–426, 1983.

ADEBAJO, A.C.; AYOOLA, O.F.; IWALEWA, E.O.; AKINDAHUNSI, A.A.; OMISORE, N.O.A.; ADEWUNMI, C.O.; ADENOWO, T. K. Anti-trichomonal, biochemical and toxicological activities of methanolic extract and some carbazolealkaloids isolated from the leaves of *Murraya koenigii* growing in Nigeria. **Phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 246-254, 2006.

ADUKWU, E.C.; BOWLES, M.; EDWARDS-JONES, 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.

AHMAD, A.; VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**. v.22, n.6 p. 657-665, 2015.

AKHILA, A. Essential oil-bearing grasses: Q10 the genus *Cymbopogon*. In: **Medical and aromatic plants-industrial profile**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2010.

ALAGAWANY, M.; EL-SAADONY, M.T.; ELNESR, S.S.; FARAHAT, M.; ATTIA, G.; MADKOUR, M.; REDA, F. M. Use of lemongrass essential oil as a feed additive in quail's nutrition: its effect on growth, carcass, blood biochemistry, antioxidant and

immunological indices, digestive enzymes and intestinal microbiota. **Poultry Science**, v. 100, n. 6, p. 101172, 2021.

ALI, A.; KLEIN, A.; ROSENFELD, J.. Analysts' use of information about permanent and transitory earnings components in forecasting annual EPS. **Accounting Review**, p. 183-198, 1992.

ALMEIDA, A.T.; CANECCHIO FILHO, V. **Principais culturas**. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 2 ed. Ilustra, 1973. 405 p.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, M.S.D.; DAS NEVES, R.N.; SENA-LOPES, Â.; DOMINGUES, M.; CASARIL, A.M.; SEGATTO, N.V.; NOGUEIRA, T.C.M.; SOUZA, M.V.N. DE; SAVEGNAGO, L.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S. Antiparasitic activity of furanyl N-acylhydrazone derivatives against *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* and *in silico* analyses. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2020.

AMARAL, J.F.T.; FONSECA, A.F.A. da; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.; FONTES, P.C.R. Deficiências de macronutrientes, Fe e B em manjerição, (*Ocimum* sp.) em cultivo hidropônico. **Revista Ceres**, v.46, n.265, p.297-308, 1999.

AMIN, A.; BILIC, I.; LIEBHART, D.; HESS, M. Trichomonads in birds - a review. **Parasitology**, v.141, n. 6, p.733–47, 2014.

ANDOĞAN, B.C.; BAYDAR, H.; KAYA S.; DEMIRCI, M.; OZBAŞAR, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives of pharmacal research**, v. 25, n. 6, p. 860-864, 2002.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmacology Research**, v. 28, n. 5, p. 978-85, 2011.

ARTHAN, D.; SITHIPROM, S.; THIMA, K.; LIMMATVATIRAT, C.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P.; SVASTI, J. Inhibitory effects of Thai plants b-glycosides on *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 443-448, 2008.

AYDIN, L.; COŞKUN, Ş. Efficacy of carnidazole (Spatrix®) and metronidazole (Flagyl®) against *Trichomonas gallinae* in naturally infected pigeons. **Acta Parasitology Turcica**, v. 24, n. 1, p. 65-66, 2000.

BACCEGA, B.; ISLABÃO, Y.W.; MELLO, A.B. DE; MARTINS, F.O.; SANTOS, C.C. DOS; OURIQUE, A.F.; GÜNDEL, S. DA S.; MACEDO, M.R.P. DE; VIANNA, É.E.; FARIAS, N.A. DA R.; OLIVEIRA, C.B. *In vitro* and *in vivo* activity of the essential oil and nanoemulsion of *Cymbopogon flexuosus* against *Trichomonas gallinae*. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 11, n. 1, p. 32, 2021.

BACHIEGA, T.F.; SFORCIN, J.M.. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 909-913, 2011.

BAHAMONDE-NORAMBUENA, D.; MOLINA-PEREIRA, A.; CANTIN, M.; MUÑOZ, M.; ZEPEDA, K.; VILOS, C. Polymeric nanoparticles in dermocosmetic. **International Journal of Morphology**. v.33, n.4, p. 1563-1568, 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n. 2, p.446–475, 2008.

BARBOSA, E.; CALZADA, F.; CAMPOS, R. In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated from some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 552–554, 2007.

BARD, M.; ALBRECHT, M.R.; GUPTA, N.; GUYNN, C.J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

BARNARD, D.R.; XUE, R.D. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 41, n. 4, p. 726-730, 2004.

BARROS, L.M.; DUARTE, A.E.; MORAIS-BRAGA, M.F.B.; WACZUK, E.P.; VEGA, C.; LEITE, N.F.; MENEZES, I.R. de; COUTINHO, H.D.; ROCHA, J.B.; KAMDEM, J.P. Chemical Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Essential Oil. **Molecules**. v.21, n.2, p. 1-9, 2016.

BASSOLE, I.H.N.; NEBIE, R.; SAVADOGO, A.; OUATTARA, C.A.T.; BARRO, N.; TRAORE, S.A. Composition antimicrobial activities of the leaf and flower essential oil of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**. v.4, n.10, p.1156-1160, 2005.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K.; KAUR, S. Eucalyptus Essential Oil as a Natural Pesticide. **Forest Ecology and Management**, v.256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BENZIE, I.; STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BOAL, C. W.; MANNAN, R. W.; HUDELSON, K. S. Trichomoniasis in Cooper’s Hawk from Arizona. **Journal of Wildlife Diseases**, v.34, n.3, p. 590–593, 1998.

BONDURANT, R. H.; HONIGBERG, B. M. **Trichomonads of veterinary importance**. New York: Parasitic Protozoa Academic Press, p. 111–206, 1994.

BOYOM, F.F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P.H.A.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroon-nian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1269-1275, 2003.

BRANDÃO, J.; BEAUFRÈRE, H. Clinical update and treatment of selected infectious gastrointestinal diseases in avian species. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.22, n.2, p. 101-17, 2013.

BRASIL. ANVISA. **Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, [s. l.], 2007. Disponível em: . Acesso em: 22 abr. 2020.

BUNBURY N. Trichomonad infection in endemic and introduced columbids in the seychelles. **Journal of Wildlife Diseases**. v.47, n.3, p. 730-3, 2011.

BUNBURY, N.; JONES, C. G.; GREENWOOD, A. G.; BELL, D. J. *Trichomonas gallinae* in Mauritian Columbids: Implications for an endangered endemic. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 399–407, 2007.

BUNBURY, N.; JONES, C.G.; GREENWOOD, A.G.; BELL, D.J. Epidemiology and conservation implications of *Trichomonas gallinae* infection in the endangered Mauritian Pink Pigeon. **Biological Conservation**, v.141, n.1, p.153–161, 2008a.

BUNBURY, N.; STIDWORTHY, M.; GREENWOOD, A.; JONES, C.; SAWMY, S.; COLE, R.; EDMUNDS, K.; BELLET, D.J. Causes of mortality in free-living Mauritian pink pigeons *Columba mayeri*, 2002–2006. **Endanger Species Res** v.9, p.213–220, 2008b.

BUNBURY, N.; JONES, C.G.; GREENWOOD, A.G.; BELL, D.J. *Trichomonas gallinae* in Mauritian Columbids: Implications for an endangered endemic. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 399–407, 2007.

BUTCHER, G.D. Pigeon canker. VM 75, **Veterinary accordance with that of others** (Butcher, 2003; Medicine – Large Animal Clinical Science Department, McDougald, 2003). Carrier pigeons are known Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food to And Agricultural Science, University of Florida. EDIS Web transmit *Trichomonads* to their young during feeding. (2003).

CARDOSO, J.; SOARES, M.J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1026–1032, 2010.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.361-366, 2007.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p. 50-62, 2006.

CARVALHO JUNIOR, R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CAMPBELL, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M.A. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004,. p. 479-492.

CAYLOR, K.B.; CASSIMATIS, M.K. Metronidazole neurotoxicosis in two cats. **Journal of the American animal hospital association**, v. 37, n. 3, p. 258-262, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Trichomoniasis**. Disponível em . Acesso em: 04 out. 2021.

CEPICKA, I.; KUTIŠOVÁ, K.; TACHEZY, J.; KULDA, J.; FLEGR, J. Cryptic species within the *Tetragrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.11–21, 2005.

CHA, J.D.; JUNG, E.K.; KIL, B.S.; LEE, K.Y. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Artemisia feddei*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 2061-2065, 2007.

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. Brazilian. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.5, p.247-253, 2002.

CHAVEIRO, A.A.; QUEIROZ, D.C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v.16, n.3, p.224-228, 1993.

CHEN, W.; VILJOEN, A. Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.

CHIANG, L.; NG, L.T.; CHENG, P.W.; CHIANG, W.; LIN, C.C. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* v.32, n.10, p. 811-816, 2005.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.2, p. 213-220, 2002.

CODEVILLA, C.F.; BAZANA, M.T.; SILVA, C. de B. de; BARIN, J.S.; MENEZES, C.R de. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**. v.37, p.142 – 151, 2015.

COLE R.A. Trichomoniasis. In: Friend M.; Franson J.C.; editors. **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.

COOPER, J. E.; PETTY, S. J. Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n.1, p. 80-87, 1988.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Jaboticabal: FUNEP 2. ed.; 0. 151, 1994.
COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, v. 1, p. 1031, 1994.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B.; BERTOLUCCI, S.V.; PEDRO, H.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Revista de Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

CUDMORE, S.L.; DELGATY, K.L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S.F.; PETRIN D.P.; GARBER, G.E. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 783-793, 2004.

DE OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; DO NASCIMENTO, J.A.; PICCOLI, R.H. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and bioproducts processing**, v. 90, n. 4, p. 809-818, 2012.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2547–2565, 2007.

DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **Journal of Parasitology**, v. 43, n.4, p.488-499, 1957.

DINGSDAG, S.A.; HUNTER, N. Metronidazole: an update on metabolism, structure– cytotoxicity and resistance mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 265-279, 2018.

DONG, X.; ZHANG Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. **Biophysical journal**, v. 101, n. 10, p. 2525-2534, 2011.

DUNNE, R.L.; LINDA, A.D.; UPCROFT, P.; O'DONOGHUE, P.J.; UPCROFT, J.A. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell research**, v. 13, n. 4, p. 239-249, 2003.

DURAN, N.; MARCATO, P.D.; CONTI, R.; ALVES, O.A.; COSTA, F.T.M.; BROCCHI, M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.21, n.6, p. 6, 949-959, 2010.

EKUNDAYO, O. Composition of leaf volatile oil of *Cymbopogon citratus*. **Fitoterapia** (Milano), v.56, n.6, p. 339-342, 1985.

ELDIN, H.M.E.; BADAWEY, A.F. In vitro anti-*Trichomonas vaginalis* activity of Pistacia lentiscus mastic and Ocimum basilicum essential oil. **Journal of Parasitology Diseases**. v.39, n.3, p. 465–473, 2015.

EL-RAHMAN, A.B.D.; SEDDIEK, S.H.A.; SOLIMAN, A.S. Some Studies on Trichomoniasis of Pigeons at Qualiobia Governorate. **Egyptain Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology**, v. 21, n. 2, p. 123-141, 2008.

EL-SABER BATIHA, G.; MAGDY BESHBIHY, A.; G. WASEF, L.; ELEWA, Y.H.A.; A. AL-SAGAN, A.; ABD EL-HACK, M.E.; TAHA, A.E.; M. ABD-ELHAKIM, Y.; PRASAD DEVKOTA, H. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 872, 2020.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E.A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D.C.; HAAS, B.J.; TRAN, A.N.; WORTMAN, J.R.; ALSMARK, U.C.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.; BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J.M.; CERQUEIRA, G.C.; CREASY, T.; DELCHER, A.L.; DIKENG, A.; EMBLEY, T.M.; HAUSER, C.; IVENS, A.C.; KUMMERFELD, S.K.; PEREIRA-LEAL, J.B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.; SALZBERG, S.L.; SHALLOM, J.; SILVA, J.C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; MELVILLE, S.E.; DONELSON, J.E.; ANDERSSON, B.; STUART, K.D.; HALL, N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-409, 2005.

ESMAEILNEJAD, B.; TAVASSOLI, M.; ASRI-REZAEI, S.; DALIR-NAGHADEH, B.; MALEKINEJAD, H.; JALILZADEH-AMIN, G.; HAJIPOUR, N. Evaluation of antioxidant status, oxidative stress and serum trace mineral levels associated with *Babesia ovis* parasitemia in sheep. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 38-45, 2014.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FANG, L.; DU, D.; DING, G.Z.; SI Y.K.; YU S.S.; LIU Y.; WANG W.J.; MA S.G.; XU S.; QU J.; WANG J.M.; LIU Y.X. Neolignans and glycosides from the stem bark of *Illicium difengpi*. **Journal of natural products**, v. 73, n. 5, p. 818-824, 2010.

FAVORITO, P. A.; ECHER, M.M.; OFFEMANN, L.C.; SCHLINDWEIN, M.D.; COLOMBARE, L.F.; SCHINEIDER, R.P.; HACHMANN, T.L. Características produtivas do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento entre plantas e entre linhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 582-586, 2011.

FENEQUE, J. Nanotechnology: a new challenge contributing to the creation of changes in veterinary for veterinary medicine. **The Pet Tribune**, v. 6, n. 5, p. 16, 2000.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126- 30, 2007.

FERNANDES, P.C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; MARQUES, M.O.M. Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**. v.22, p. 260-264, 2004.

FIGUEIREDO, R. O.; DELACHIAVE, M. E. A. Effect of growth regulators in citral content in lemongrass in different seasons. **Acta Horticulturae**, v. 569, n. 22, p. 47-49, 2002.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FORRESTER, D.J.; FOSTER, G.W. (2009). **Trichomonosis**. In: Atkinson, C.T.; Thomas, N.J. & Hunter, D.B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds* (1ª Edição, pp.120-153). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

FORZÁN, M.J.; VANDERSTICHEL, R.; MELEKHOVETS Y.F.; MCBURNEY, S. Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces – An emerging disease. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 4, p. 391–396, 2010.

FRANÇA, I.S.X.; SOUZA, J.Á. de; BAPTISTA, R.S.; BRITTO, V.R. de S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L. and BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth.; Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista brasileira de farmacognosina**, v.15, n.3, pp.191-194, 2005.

FRANSSEN, F.F.J.; LUMEIJ, J.T. *In vitro* nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 409-415, 1992.

FRONZA, T.; CAMPOS, Á.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-556, 2004.

FURLAN, M.R.; Martins, R. C. C.; Rodrigues, E.; Scalco, N.; Negri, G.; & Lago, J. H. G. Variação dos teores de constituintes voláteis de (*Cymbopogon citratus* (DC) Staf), Poaceae, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.5, p.686-691, 2010.

FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, 2011.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. **Natural product communications**, v. 5, n. 1, p. 1934578X1000500137, 2010.

GASPAR DA SILVA, D.; BARTON, E.; BUNBURY, N.; LUNNESS, P.; BELL, D.J.; TYLER, K.M. Molecular identity and heterogeneity of trichomonad parasites in a closed avian population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 433-440, 2007.

GERHOLD, R. W.; TATE, C. M.; GIBBS, S. E.; MEAD, D. G.; ALLISON, A. B.; FISCHER, J. R. Necropsy findings and arbovirus surveillance in mourning doves from southeastern United States. **Journal of Wildlife Diseases**, v.43, n. 1, p. 129-135, 2007.

GERHOLD, R.; YABSLEY, M.; SMITH, A.; OSTERGAARD, E.; MANNAN, W.; CANN, J.; FISCHER, J.R. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae* morphologic complex in the United States. **Journal of Parasitology**. v.94, p. 1335-41, 2008.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 111-124, 2015.

GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. D. A.; BORIN, D.; CÔRREA, M.S.; DOS SANTOS, V.B.; VIANNA SANTOS, R.C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, L. M.; BONEZ, P. C.; ROSSI, G. G.; DE CAMPUS, M. M. A.; GOMES, P.; STEPPE, M. . Antimycobacterial, antimicrobial and antifungal activities of geranium oil loaded nanocapsules. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 414-419, 2015.

GIRARD, Y.A.; ROGERS, K.; GERHOLD, R.; LAND, K.M.; LENAGHAN, S.C.; WOODS, L.W.; HABERKERN, N.; HOPPER, M.; CANN, J.D.; JOHNSON, C.K. *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.

GIRI, T.P.; MUKHERJEE, P.; BARMAN, T.K.; MAITY, S. Nano-encapsulation of capsaicin on lipid vesicle and evaluation of their hepatocellular protective effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 88, p. 236-243, 2016.

GITERU, S.G.; COOREY, R.; BERTOLATTI, D.; WATKIN, E.; JOHNSON, S.; FANG, Z. Physicochemical and antimicrobial properties of citral and quercetin incorporated kafirin-based bioactive films. **Food chemistry**, v. 168, p. 341-347, 2015.

GODOI, S. N.; QUATRIN, P. M.; SAGRILLO, M. R.; NASCIMENTO, K. WAGNER, R.; KLEIN, B.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Evaluation of stability and *in vitro* security of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v.4, n.2, p. 137-144. 2003.

GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 101-3, 2004.

GRUNENWALD, C.; SIDOR, I.; MICKLEY, R.; DWYER, C.; GERHOLD, R. Tetratrichomonas e doença associada a trichomonas spp. em *Eiders comuns* de vida livre (*Somateria mollissima*) de Wellfleet Bay, MA e descrição dos genótipos da região ITS1. **Doenças aviárias**. vol. 62, n. 1, p. 117-23, 2018.

GRUNKEMEYER, Vanessa L. Advanced diagnostic approaches and current management of avian hepatic disorders. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 413-427, 2010.

GUIMARÃES, L.G.D.L.; CARDOSO, M.D.G.; SOUSA, P.E.D.; ANDRADE, J.D.; VIEIRA, S.S Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 464-472, 2011.

GÜNDEL, S. S.; SOUZA, M. E.; QUATRIN, P. M.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 268-276, 2018 (a).

GÜNDEL, S. S.; VELHO, M. C.; DIEFENTHALER, M. K.; FAVARIN, F. R.; COPETTI, P. M.; FOGAÇA, A. O.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; SAGRILLO, M. R.; OURIQUE, A. F. Basil oil-nanoemulsions: development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 378-383, 2018 (b).

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical society transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 2, p.170-3, 2008.

HANAA, A.M.; SALLAM, Y.I.; EL-LEITHY, A.S.; ALY, S.E. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 57, n. 2, p. 113-116, 2012.

HARLIN, R.; WADE, L. Bacterial and parasitic diseases of Columbiformes. **The Veterinary Clinics of North America: exotic animal practice – parasitic and infecious diseases**, v.12, n.3, p.453-73, 2009.

HOSSEINI, S.F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and *in vitro* release study. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 1, p. 50-56, 2013.

HU, R.; MA, S.; LI, H.; KE, X.; WANG, G.; WEI, D.; WANG, W. Effect of magnetic fluid hyperthermia on lung cancer nodules in a murine model. **Oncol Lett**, v. 2, n. 6, p. 1161-1164, 2011.

HUET, R. Les huiles essentielles d'agrumes. **Fruits**, v. 46, n. 4, p. 501-513, 1991.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; SHAHID, M.; ASHRAF, M.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 1, p. 78-84, 2010.

HUSSEIN, R.; EL-HALABI, M.; GHAITH, O.; JURDI, N.; AZAR, C.; MANSOUR, N.; SHARARA, A.I. Severe hepatotoxicity associated with the combination of spiramycin plus metronidazole. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 1, p. 44-47, 2011.

IBRAHIM, A.N. Comparison of *in vitro* activity of metronidazole and garlic-based product (Tomex®) on *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2063-7, 2013.

JAFFÉ, M.. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, 391-400, 1886.

JITVIRIYANON, S.; PHANTHONG, P.; LOMARAT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; PORNTRAKULPIPAT, S.; PARAKSA, N. *In vitro* study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 96-102, 2016.

JITVIRIYANON, S.; PHANTHONG, P.; LOMARAT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; PORNTRAKULPIPAT, S.; PARAKSA, N. *In vitro* and *in vivo* efficacy of extracts of leaves of *Eucalyptus globulus* on ovine gastrointestinal nematodes. **Parasitology Research**, v. 114, n. 1, p. 141-148, 2014.

KARMEN, A.; WRÓBLEWSKI, F.; LA DUE, J. **The Journal of clinical investigation**, v. 34, n. 1, p. 126-133, 1955.

KEPEPLER, D.; OETTLÉ, E. E. *Trichomonas gallinae* in wild raptors on the Cape peninsula. **South African Journal of Wildlife Research**, v. 22, n.1, p. 87–88, 1992.

KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus. officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, n.3, p. 776–781, 1994.

KHAJAVI, R.; ABBASIPOUR, M.; BARZI, M.G.; RAHIMI, M.K.; MIRZABABA, H.H. Eucalyptus essential oil-doped alginate fibers as a potent antibacterial wound dressing. **Advances in Polymer Technology**, v. 33, n. 2, p. 1-7, 2014.

KHATER, G. A. Influence of Cr₂O₃, LiF, CaF₂ and TiO₂ nucleants on the crystallization behavior and microstructure of glass-ceramics based on blast-furnace slag. **Ceramics International**, v. 37, n. 7, p. 2193-2199, 2011.

KHATER, H.F.; RAMADAN, M.Y.; MAGEID, A.D. Abdel. *In vitro* control of the camel nasal botfly, *Cephalopina titillator*, with doramectin, lavender, camphor, and onion oils. **Parasitology research**, v. 112, n. 7, p. 2503-2510, 2013.

KIETZMANN GE JR. **Host-parasite interactions of Trichomonas gallinae (Rivolta, 1878)**. PhD Thesis, Iowa State University, Ames, Iowa, p.143, 1988.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; LI, Q.; SHOEMAKER, B.A.; THIESSEN, P.A.; YU, B.; ZASLAVSKY, L.; ZHANG, J.;

BOLTON, E.E. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D1102-D1109, 2019.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p. 241-248, 2009.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v.5, p.120-132, 2010.

KOCAN, R.M. Various grains and liquid as potential vehicles of transmission for *Trichomonas gallinae*. The **Wildlife Disease Association**, v.5, n.3, p.148–9,1969.

KOUSHIK, O.; RAO, Y.; KUMAR, P.; KARTHIKEYAN, R. Nano drug delivery systems to overcome cancer drug resistance—a review. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* , v. 7, n. 378, p. 2, 2016.

KRONE, O.; ALTENKAMP, R.; KENNTNER, N. Prevalence of *Trichomonas gallinae* in northern goshawks from the Berlin area of northeastern Germany. *Journal of Wildlife Diseases*. v.41, n. 304–9, 2005.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

KUMARAN, A.M.; SOUZA, P.; AGARWAL, A.; BAKKOLLA, R.M.;
BALASUBRAMANIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 8, p. 957-957, 2003.

KUROHARA, M.L.; KWONG, M., LEBHERZ, T.B.;KLAUSTERMEYER, W.B.
Metronidazole hypersensitivity and oral desensitization. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 88, n. 2, p. 279-280, 1991.

LASKOWSKI, R.A.; JABŁOŃSKA, J.; PRAVDA, L.; VAŘEKOVÁ, R.S.;
THORNTON, J.M. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. **Protein science**, v. 27, n. 1, p. 129-134, 2018.
LASKOWSKI, R.A.;MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON J.M.
PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.
Journal of applied crystallography, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LAWSON, B.; CUNNINGHAM, A. A.; CHANTREY, J.; HUGHES, L. A.; JOHN, S.
K.; BUNBURY, N.; BELL, D. J.; TYLER, K. M. A clonal strain of *Trichomonas gallinae* is the aetiologic agent of an emerging avian epidemic disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n. 7, p. 1638–1645, 2011.

LEAL, T.C.A.B.; FREITAS, S.P.; SILVA, J.F.; CARVALHO, A.J.C. Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Revista Ceres**, v. 48, n.278, p. 445-453, 2001.

LEE, B-H.O.; ANNIS, P.C.; TUMAALII, F.; CHOI, W.S. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, p.553–564, 2004.

LEE, Y.; KIM, J.; SHIN, S.; LEE, S.; PARK, I.I. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour Fragrance Journal**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2008.

LEITE, N.S.; LIMA, A.P.; ARAÚJO-NETO, V.; ESTEVAM, C.S.; PANTALEÃO, S.M.; CAMARGO, E.A.; FERNANDES, R.P.M.; COSTA, S.K.P.; MUSCARÁ, M.N.; THOMAZZI, S.M. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 164-170, 2015.

LEONG, T.S.H.; WOOSTER, T.J.; KENTISH, S.E.; ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasound Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721-727, 2009.

LERTSATITTHANAKORN, P.; TAWEECHASUPAPONG, S.; AROMDEE, C.; KHUNKITTI, W. *In vitro* bioactivities of essential oils used for acne control. **International Journal of Aromatherapy**, v. 16, n. 1, p. 43-49, 200

LIEBHART, D.; NEALE, S.; GARCIA-RUEDA, C.; WOOD, A.; BILIC, I.; WERNSDORF, P.; JASKULSKA, B.; HESS, M. A single strain of *Tetratrichomonas gallinarum* causes fatal typhlohepatitis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to be distinguished from histomonosis. **Avian Pathology**, v. 43, n. 5, p. 473-80, 2014.

LIU, W.; XU, X.; ZHANG, R.; CHENG, T.; CAO, Y.; LI, X.; GUO, J.; LIU, H.; XIAN, M. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with

biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2016.

LOCKE, L. N.; JAMES, P. Trichomonad canker in the Inca dove, *Scardafella inca* (Lesson). **The Journal of Parasitology**, v.48, n.3, p. 497, 1962.

LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; MEESUNGNOEN, J.; JAYGERIN, J.P.; MANKHETKORN, S.J.R.P. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 323-331, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa:Instituti Plantarum, p. 512, 2002.

LUMEIJ, J.T.; ZWIJNENBERG, R.J.G. Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). **Avian Pathology**, v. 19, n. 1, p. 165-166, 1990.

MALLO, N.; LAMAS, J.; LEIRO, J.M. Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2476-2484, 2013.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, G. A.; CASTILLOHERRERA, R.; ROSARIO-CRUZ, J. M.; FLORESFERNANDEZ, J.; LOPEZ-RAMIREZ, R.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, E.; LUGO-CERVANTES, C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against

the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 108, n. 2, p. 481-487, 2011.

MARTINS, P. M.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; SANTOS, H. S.; MACHADO, M. C. Influence of temperature and air drying velocity on the content and chemical composition of essential oil of lemon grass. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 155-160, 2002.

MARUNO M.; ROCHA-FILHO, P.A. O/W nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 17-22, 2010.

MARUYAMA, N.; TAKIZAWA, T.; ISHIBASHI, H.; HISAJIMA, T.; INOUE, S.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1501-1506, 2008.

MARX, M.; REINER, G.; WILLEMS, H.; ROCHA, G.; HILLERICH, K.; MASELLO, J.F.; MAYR, S.L.; MOUSSA, S.; DUNN, J.C.; THOMAS, R.C.; GOODMAN, S.J.; HAMER, K.C.; METZGER, B.; CECERE, J.G.; SPINA, F.; KOSCHKAR, S.; CALDERÓN, L.; ROMEIKE, T.; QUILLFELDT, P. High prevalence of *Trichomonas gallinae* in wild columbids across western and southern Europe. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.

MASON, T.G.; WILKING, J.N.; MELESON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, S.M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p.6 35-666, 2006.

MATOS, F. J. DE; SOUSA, A. M. P.; MATOS, M.E.O.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes Químicos Ativos e Propriedades Biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras**. (2 edição). EDIÇÕES UFC, 2004.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

McKEON, T.; DUNSMORE, J.; RAIDAL, S.R. *Trichomonas gallinae* in budgerigars and columbid birds in the Perth, **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.9, p.652-5, 1997.

MEHLHORN, H.; WALLDORF, V.; KLIMPEL, S.; SCHMAHL, G.; AL-QURAI SHY, A.; WALLDORF, U.; MEHLHORN, B.; BÄTZA, H.J. Entomological survey on vectors of Bluetongue virus in North Rhine-Westphalia (Germany during 2007–2008). **Parasitology research**, v. 105, n. 2, p. 321-329, 2009.

MESA-ARANGO, A.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of *Colombian Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MORAIS L.A.S.; **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais**. Horticultura Brasileira, 2009.

MORALES, M.; NAVARRO, M.C.; MARTIN, J.; VALERO, A.; LARA, A.M.; BARÓN, S.; MORILLAS, F. Activity of different monoterpenic derivatives of natural origin against *Leishmania infantum* promastigotes. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología**, v. 68, n. 1, p. 65-72, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSTEGL, M.M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; DINHOPL, N.; KÜBBER-HEISS, A.; WEISSENBOCK, H. Identification of a putatively novel trichomonad species in the intestine of a common quail (*Coturnix coturnix*). **Veterinary Parasitology**. v.10, n.183, p.369-72, 2012.

MUNOZ, E.; CASTELLA, J.; GUTIERREZ, J. *In vivo* and sensitivity of *Trichomonas gallinae* to some nitroimidazole drugs. **Veterinary Parasitology**, v.31, n.4, p. 239-46, 1998.

NAIR, J.; CHRISTENSEN, D.; YU, P.; BEATTIE, A.D.; MCALLISTER, T.; DAMIRAN, D.; PRESTON, N.; FUHR, L.; MCKINNON, J.J. A nutritional evaluation of common barley varieties grown for silage by beef and dairy producers in western Canada. **Canadian Journal of Animal Science**, v.96, p. 598-608, 2016.

NAMBIAR, V.S.; MATELA, H. Potential functions of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) in health and disease. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives**, v. 3, n. 5, p. 1035-1043, 2012.

NASCIMENTO, I. B.; INNECCO R.; MARCO, C.A.; MATTOS, S.H.; NAGAO, E.O. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim santo. **Revista Ciência agrônômica**, v.34, n. 2, p. 169-172, 2003.

NASCIMENTO, L.B.; INNECCO R.; MARCO, C.A.; MATTOS, S.H.; NAGAO, E.O.
Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim-santo
(*Andropogum* sp). **Revista Caatinga**, v.19, n.2, p.123-127, 2006.

NAVARRO, M.C.; NOGUERA, M.A.; ROMERO, M.C.; MONTILLA, M.P.;
SELGAS, J.M.G.; VALERO, A. *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various
monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae *in vitro* and *in vivo*.
Experimental Parasitology, v.120, n.4, p. 295-299, 2008.

NAZ, F.; KHAN, F.I.; MOHAMMAD, T.; HAN, P.; MANZOOR, S.; HASAN, G.M.;
LOBB, K.A.; LUQMAN, S.; ISLAM, A.; AHMAD, F.; HASSAN, M.I. Investigation of
molecular mechanism of recognition between citral and MARK4: A newer therapeutic
approach to attenuate cancer cell progression. **International journal of biological
macromolecules**, v. 107, p. 2580-2589, 2018.

NAZIFI, S.; RAZAVI, S.M.; KIANIAMIN, P.; RAKHSHANDEHROO, E. Evaluation
of erythrocyte antioxidant mechanisms: antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and
serum trace elements associated with progressive anemia in ovine malignant
theileriosis. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 275-281, 2011.

NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E. C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical
composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9,
n.1, p.80-92, 2007.

NEMATOLLAHI, A.; EBRAHIMI, M.; AHMADI, A.; HIMAN, M. Prevalence of
Haemoproteus columbae and *Trichomonas gallinae* in pigeons (*Columba domestica*) in
Isfahan, Iran. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 36, n. 1, p. 141-142, 2012.

NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 372-378, 2010.

NIKPAY, A.; SOLTANI, M. In vitro anti-parasitic activities of *Pulicaria dysenterica* and *Lycopus europaeus* methanolic extracts against *Trichomonas gallinae*, **Journal of Herbmed Pharmacology**, v.7, n.2, p.112-118, 2018.

NORDIN, N.; YEAP, S.K.; RAHMAN, H.S.; ZAMBERI, N.R.; ABU, N.; MOHAMAD, N.E.; HOW, C.W.M.A.S.; MASARUDIN, J.; ABDULLAH, R.; ALITHEEN, N.B. *In vitro* cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2019.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 279-286, 1984.

OYEDAPO, A.O.; MAKANJU, V.O.; IWALEWA, E.O.; ADENOWO, T.K. Complementary and Alternative Medicines. **African Journal of Traditional**, v. 1, n. 1, p. 55-62, 2004.

PADILHA, F. P.; FARAGO, P. V.; CECCHIA, L. P. M.; HIROSE, K. M.; RIBAS, J. L. C. Estudo da ação repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth contra o *Anopheles Brasiliensis*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 376-378, 2004.

PARK, I.K.; CHOI, K.S.; KIM, D.H.; CHOI, I.H.; KIM, L.S.; BAK, W.C.; CHOI, J.W.; SHIN, S.C. Fumigant activity of plant essential oils and *components from horseradish (Armoracia rusticana), anise (Pinpinella anisum) and garlic (Allium sativum)* oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). **Pest Management Science**. v.62, p. 723-728, 2006.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G.A.; PAULUS, E. Teor e composição química do óleo essencial e crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla* em diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Revista Ceres**, v.60, n.3, p. 372-379, 2013.

PENGELLY, A. **The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine**. Oxon, United Kingdom: CABI Publishing, 2004.

PEREIRA, F de O, MENDES, JM, LIMA, IO, MOTA, KS de L, OLIVEIRA, WA de LIMA, EO de. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2015.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N./ PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

POLI, G.. Liver damage due to free radicals. **British medical bulletin**, v. 49, n. 3, p. 604-620, 1993.

POLI, G.; PAROLA, M.; LEONARDUZZI, G.; PINZANI, M. Modulation of hepatic fibrogenesis by antioxidants. **Molecular aspects of medicine**, v. 14, n. 3, p. 259-264, 1993.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.6, p.39, 2006.

PURPLE, K.; GERHOLD, R. Persistence of Two Isolates of *Trichomonas gallinae* in Simulated Bird Baths With and Without Organic Material . **Avian Diseases**, v.59, n.4, p.472-474, 2015.

RADÜNZ, L. L. **Secagem de alecrim pimenta, guaco e hortelã comum sobre diferentes temperaturas e sua influência na quantidade e qualidade dos princípios ativos**. Viçosa, MG. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

RAMAKRISHNA, V.; JAILKHANI, R.. Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. **Diagnostic pathology**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2007.

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.

REIN, M.F. *Trichomonas vaginalis*. 1995. In: Mandell, Douglas, Bennet. Principles and practice of infectious diseases (Eds.) Churchill Livingstone, 2493-7, New York.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American journal of clinical pathology**, v. 28, n. 1, p. 56-63, 1957.

RIBOLDI, B.M. **Nanotecnologia: fundamentos e aplicações**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Departamento de Física – Instituto de Geociências e Ciências Exatas. São Paulo, 2009.

RICE, P.J.; COATS, J.R. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 87, n.5, p. 1172-1179, 1994.

RIQUELME, N.; HERRERA, M.L.; MATIACEVICH, S.. Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: Effect of process and storage conditions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 104, p. 94-103, 2017.

RIVOLTA, S. Una forma di croup prodotta da um infusorio, nei polli. **Giornale di Anatomia, Fisiologia e Patologia Animale**, v.10, p. 149-158, 1878.

ROBINSON, R.A.; LAWSON, B.; TOMS, M.P.; PECK, K.M.; KIRKWOOD, J.K.; CHANTREY, J.; CLATWORTHY, I.R.; EVANS, A.D.; HUGHES, L.A.; HUTCHINSON, O.C.; JOHN, S.K.; PENNYCOTT, T.W.; PERKINS, M.W.; ROWLEY, P.S.; SIMPSON, V.R.; TYLER, K.M. The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant in British non-passerines. **Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds**, v.140 , n.10 , p. 1234- 1245, 2010.

ROSENFELD, R.N.; BIELEFELDT, J.; ROSENFELD, L.J.; TAFT, S.J.; MURPHY, R.K.; STEWART, A.C. Prevalence of *Trichomonas gallinae* in nestling Cooper's Hawks among three North American populations, **The Wilson Bulletin**, v.144, n.1, p. 145-147, 2002.

ROUFFAER, L.; ADRIAENSEN, C.; DE BOECK, C.; CLAEREBOU, E.; MARTEL, A. Racing pigeons: a reservoir for nitro-imidazole-resistant *Trichomonas gallinae*. **Journal of Parasitology**, v.100, n.3, p.360-3, 2014.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.V.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICEC, M.; BRUNID, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SALAMANCA-BUENTELLO, F.; PERSAD, D.L.; COURT, E.B.; MARTIN, D.K.; DAAR, A.S.; SINGER, P.A. Nanotechnology and the Developing World. **PLoS Med**, v.2, n.5, p.97, 2005.

SALEM W.; LEITNER, D.R.; ZINGL, F.G.; SCHRATTER, G.; PRASSL, R.; GOESSLER, W.; REIDL, J.; SCHILD, S. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.305, p. 85–95, 2015.

SALENTIN, S.; SCHREIBER, S.; HAUPT, V.J.; ADASME, M.F.; MICHAEL SCHROEDER, M. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W443-W447, 2015.

SALGADO, A.P.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.; PINTO, J.E. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de

Eucalyptus sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*.
Ciências Agrotécnicas, v. 27, p.249-254, 2003.

SAMOUR, J. H.; NALDO, J. L. Diagnosis and Therapeutic Management of Trichomoniasis in Falcons in Saudi Arabia. **Journal of Avian Medicine and Surgery**. v.17, n.3, p.136–143, 2003.

SANCHES, L.J.; MARINELLO, P.C.; PANIS, C.; FAGUNDES, T.R.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE-FREITAS-JUNIOR, J.C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L.; LUIZ, R.C. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1010428317695914, 2017.

SANSANO, J.; GARIJO, M.M.; GÓMEZ, M.T. **Prevalencia y Ribotipado de Trichomonas gallinae en Palomas y Aves de Presa en la Comunidad Valenciana**. Comunicação apresentada no X Congresso Ibérico de Parasitologia, Madrid. (2007).

SANSANO-MAESTRE J.; GARIJO-TOLEDO, M.M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. **Avian Pathol**.v. 38, p. 201-7, 2009.

SANTIN, M.R.; dos SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; FERREIRA, I.C.; UEDA-NAKAMURA, T. *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. 1489-1496, 2009.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; SALGADO, A.P.; MENA-BARRETO, R.F.; SOARES, M.J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and

thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology research**, v. 100, n. 4, p. 783-790, 2007.

SANTOS, P. M. D. S.; SILVA, S. G. N. D.; FONSECA, C. F. D.; OLIVEIRA, J. B. D. Parasitos de aves e mamíferos silvestres em cativeiro no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 788-794, 2015.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista brasileira de plantas medicinais**, vol.13, n.4, p.486-491,2011.

SATISH, S.; MOHANA, D.C.; RAGHAVENDRA, M. P.; RAVEESHA, K.A. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **Journal of Agricultural Technology**. v.3, n.1, p. 109-119, 2007.

SATTHANAKUL, P.; TAWEECHASUPAPONG, S.; PAPHANGKORAKIT, J.; PESEE, M.; TIMABUT, P.; KHUNKITTI, W. Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour micro-organisms and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 1, p. 11-17, 2015.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, HT. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SCHWEBKE, J.R.; BARRIENTES, F.J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.

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.

SCHIRMER, R.H.; SCHÖLLHAMMER, T.; EISENBRAND, G., KRAUTH-SIEGEL, RL. Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. **Free radical research communications**, v. 3, n. 1-5, p. 3-12, 1987.

SCHMALTZ C.; SANTOS, J.V.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: A imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v.16, p. 13- 14, 2005.

SCHUCK, V. J. A.; FRATINI, M.; RAUBER, C. S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E. E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.1, p.45, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLI, J. R.; CRUZ, M. E. R. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1-2, p.129-137.

SEDDIEK, S.A.; ALI, M.M.; KHATER, H.F.; EL-SHORBAGY, M.M.. Anthelmintic activity of the white wormwood, *Artemisia herba-alba* against *Heterakis gallinarum* infecting turkey poults. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3946-3957, 2011.

SEDDIEK, S.A.; KHATER, H.F.; EL-SORBAGY, M.M.; ALI, M.M.A. The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. **Parasitology Research**, v.113, n.4, p. 1319-1329, 2014.

SEKHAR, P. C.; SIMHA, S. S. Effect of helminthiasis on the total and differential leucocyte count in chicken blood. **Indian Veterinary Journal (India)**, 1985.

SENA-LOPES, Â.; DAS NEVES, R.N.; BEZERRA, F.S.B.; DE OLIVEIRA SILVA, M.T.; NOBRE, P.C.; PERIN, G.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; BEGNINI, K.R.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. **Biomed Pharmacother**, v.89, p.284-287. 2017.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. **Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional**. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 2001.

SETZER, M.S.; BYLER, K.G.; OGUNGBE, I.V.; SETZE, R.W.N. Natural products as new treatment options for trichomoniasis: a molecular docking investigation. **Scientia pharmaceutica**, v. 85, n. 1, p. 5, 2017.

SHUKLA R.; A. KUMAR, SINGH, P.; DUBEY, N.K. Efficacy of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil and its monoterpenes aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.165-170, 2009.

SILVA C.B.; S.S. GUTERRES, V. WEISHEIMER, E.E. SCHAPOVAL. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.12, p.1763-1766, 2008.

SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M. Das G.; NASCIMENTO, E.A.; NELSON, D.L.; SALES, J. De F.; MOL, D.J. De S. Influência do nível de irradiância no crescimento da planta, rendimento e composição do óleo essencial em carqueja. **Revista de Ciências e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2006.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.; MATOS, F.J. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.89, p. 277–283, 2003.

SILVA, T. E. S. **Estudo da prevalência e do impacto da tricomonose em aves silvestres**. 2017. DISSERTAÇÃO

SILVA.G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurologists**, v. 61, p. 216-220, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.1102p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**. Porto Alegre: UFRGS, 2000, p. 387-415.

SINGH, S.; FATIMA, Z.; AHMAD, K.; HAMEED, S. Fungicidal action of geraniol against *Candida albicans* is potentiated by abrogated CaCdr1p drug efflux and fluconazole synergism. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0203079, 2018.

SINHA, S.; JOTHIRAMAJAYAM, M.; GHOSH, M.; MUKHERJEE, A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71-77, 2014.

SIQUEIRA, A.A.; TURRINI, R.N.T, POVEDA, V. DE B. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*: uma alternativa aos antibióticos convencionais. **Scientia: Revista Centro Universitário de Vila Velha**. v.8, p. 199-214, 2007.

SOBEL, J.D.; KAYE, D. Urinary tract infections. In: Mandell Gl, Bennett JC, Dolin R., editors. Mandell, Douglas, and Bennett's: **Principles and Practice of Infectious Disease**. 7. Elsevier; PA, USA: 2010. p. 957–985.

SOLANS C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J.. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.10, p. 102-110, 2005.

SOLÓRZANO-SANTOS F.; MIRANDA-NOVALES, M.G.. EOs from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology** v.23, p. 136-41, 2011.

SONNEVILLE-AUBRUN O.; SIMONNET, J.T. F. Nanoemulsions a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.108-109, p. 145-149, 2004

SOUZA, A.C.S.; SILVA, L.K.; QUEIROZ, T.B.; MARQUES, E.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GAIVÃO, I.O.M.; MAISTRO, E.L. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. **Drug and chemical toxicology**, v. 43, n. 4, p. 435-440, 2020.

SOUZA, M. A. A ARAUJO, O.J.L.; FERREIRA, M.A.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Revista horticultura Brasileira**, v.25, n. 1, p.41- 48, 2007.

STABLER R.M. *Trichomonas gallinae*. A review. **Experimental Parasitology**. v.3, n.4, p.368–402, 1954.

STABLER, R.M. A survey of Colorado bandtailed pigeons, mourning doves, and wild common pigeons for *Trichomonas gallinae*. **The Journal of Parasitology**, v.37, n.5, p. 471–472, 1951.

STANDER-BREEDT, H.; SCHWALBACH, L.M.J.; GEYLING, J.P.C.; LOSKUTOFF, N.M. Effect of different cryodiluents and thawing methods on the post-thaw motility of African lion (*Panthera leo*) spermatozoa. **South African Journal of Animal Science**, v.34, p.74-76, 2004.

STOCKDALE, J.E.; DUNN, J.C.; GOODMAN, S.J.; MORRIS, A.J.; SHEEHAN, D.K.; GRICE, P.V.; HAMER, K.C. The protozoan parasite *Trichomonas gallinae* causes adult and nestling mortality in a declining population of European Turtle Doves, *Streptopelia turtur*. **Parasitology**, v.142, n.3, p.490–498, 2015.

SUN H.; K. LIU, W. LIU, W. WANG, C. GUO, B. TANG, J. GU, J. ZHANG, H. LI, X. MAO, Q. ZOU, H. ZENG, Development and characterization of a novel nanoemulsion drugdelivery system for potential application in oral delivery of protein drugs, **International Journal of Nanomedicine** , v.7, p. 5529–5543, 2012.

TABARI M.A.; YOUSSEFI M.R.; MOGHADAMNIA A.A. Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in Pigeon (*Columba livia domestica*), **British Poultry Science**, v.58, n.3, p.236-241, 2017.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Surface protection and secondary defense compounds.** In Plant Physiology. Redwood City: Benjamin Cummings, p.318-345, 1991.

TAJIDIN, N.E.; AHMAD, S.H.; ROSENANI, A.B.; AZIMAH, H.; MUNIRAH, M. Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 2685-2693, 2012.

TAO, N.; OUYANG, Q. JIA, L. "Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism," **Food Control**, v. 41, p. 116–121, 2014.

TASCA, T.; DE CARLI, G.A. **Trichomonas gallinae.** In: Animal health and Production Compendium. Wallingford: CAB International, Oxfordshire, v. 01, p. 1-20, 2006.

TASCA, TIANA, DE CARLI, GERALDO A. Prevalence of *Trichomonas gallinae* from the upper digestive tract of the common pigeon, *Columba livia* in the southern Brazilian State, Rio Grande do Sul. **Parasitology**, v.23, n.1-2, p.42-3, 1999.

TEMPLETON, W. An introduction of the chemistry of terpenoids and steroids. In: DUNKEL, F.V.; SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Ssp. vaseyana (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

TERZI, V.; MORCIA, C.; FACCIOLI, P.; VALE, G.; TACCONI, G.; MALNATI, M. *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p.613–618, 2007.

THRALL M.A., BACKER D.C., CAMPBELL T.W., DENICOLA D., FETTMAN M.J., LASSEN E.D., REBAR A. & WEISER G. 2007. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Roca, São Paulo. 592p.

TOMA, H. E. Interfaces e organização da pesquisa no Brasil: da Química à Nanotecnologia. **Química Nova**, v. 28, p.48-S51, 2005.

TRACY, J.W.; WEBSTER, L.T. 1996. **Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections**. In: Goodman and Gilman's (Eds.), The pharmacological basis of therapeutics.: McGraw-Hill Companies, p. 995-8, New York.

TRADOS T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and Interface Science**. v.108, p. 303-318, 2004.

TRAESEL, C.K.; WOLKMER, P.; SCHMIDT, C.; SILVA, C.B.; PAIM, F.C.; ROSA, A.P.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M.; LOPES, S.T.A. 2011. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. **Comparative Clinical Pathology**, v. 20, n. 5, p. 453-460, 2011.

TRIPATHI, A.K.; PRAJAPATI, V.; AGGARWAL, K.K.; KUMAR, S. Toxicity, Feeding Deterrence, and Effect of Activity of 1,8-Cineole from *Artemisia annua* on Progeny Production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 979-983, 2001.

TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 1, p. 150-164, 2001.

URQUHART G, ARMOUR J, DUNCAN J, JENNINGS F, DUNN A. **Veterinary Parasitology**. 2th ed. Escócia: Wiley-Blackwell, 1996. p.222.

VALDETARO, E. B.; CARVALHO, A. P. V.; GAMBA, O. S.; DEMOLINARI, M. D. S. M.; SILVA, E. Árvores geneticamente modificadas: técnicas, aplicações, riscos e os potenciais impactos associados a sua utilização. **Pesquisa Florestal Brasileira**. v. 31, n. 65, p. 51-61, 2011.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 367-382, 2006.

VILLAFUERTE-ROBLES, L. Nanotecnología **Farmacéutica**. **Revista Digital Razon y Palabra**, v.1 ,n.68, p. 01-20, 2008.

VILLANÚA, D.; HÖFLE, U.; RODRIGUEZ, S.; GORTÁZAR, C. *Trichomonas gallinae* in wintering Common Wood Pigeons *Columba palumbus* in Spain. **Ibis**, v. 148, p. 641 – 648, 2006.

VITTI, A.M.S, BRITO, J.O. **Óleos essenciais de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 26p. (Boletim Técnico, 17). Vitti, A.M.S.; Brito, J.O.; 2003. Óleo essencial de eucalipto (Documentos florestais). Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo 17.

WANG, W.; LIU, J. Efficient extraction, antioxidant activities and anti-inflammation of polysaccharides from *Notopterygium franchetii* Boiss. **Carbohydrate Polymers**, v. 248, p. 116783, 2020.

WANT, M.Y.; YADAV, P.; AFRIN, F. Nanomedicines for therapy of visceral leishmaniasis. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 16, n. 3, p. 2143-2151, 2016.

WARREN, L.G.; KITZMAN, W.B.; HAKE, E. Induced resistance of mice to subcutaneous infection with *Trichomonas gallinae*. **Journal of Parasitology**, v.47, p.533-537, 1961.

WEN-CHIEN L.; HUANG, D.W.; WANG, C.R.; YEH, C.H.; TSAI, J.C.; HUANG, Y.T.; LI, P.H. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, p. 82-89, 2018.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; STROUMTSOS, L.Y.; FERTIG, M.N. The Merck Index. In: DUNKEL, F.V.; SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, + Nutt. Ssp. vaseyana (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DiLABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, n.6, p.1173-1183, 2001.

XAVIER M.N.; ALVES, J.M.; CARNEIRO, N.S.; SOUCHIE, E.L.; SILVA, E.A.J.; MARTINS, C.H.G.; AMBROSIO, M.A.L.V.; EGEA, M.B.; ALVES, C.C.F.; MIRANDA M.L.D. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum*

calophyllum Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química**. v.8, p. 1433, 2016.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, v. 29, n. 20, p. 2588-2595, 2013.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W174-W181, 2015.

YOUSSEFI, M.R.; TABARI, M.A.; 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.

ZANETTI-RAMOS, B.G.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p.95-101, 2008.

ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. “Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*,” **Food Control**, v. 37, p. 277–283, 2014.

ZIMRE-GRABENSTEINER, E.; ARSHAD, N.; AMIN. A.; HESS, M. 2011. Genetically different clonal isolates of *Trichomonas gallinae*, obtained from the same bird, can vary in their drug susceptibility, an in vitro evidence. **Parasitology international**, v. 60, n. 2, p. 213-215, 2011.

Anexos

Anexo I



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61235-1	Data da Emissão: 08/02/2018 10:21	Data para Revalidação*: 10/03/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carolina Caetano dos Santos	CPF: 029.070.440-52
Título do Projeto: Infecção por Trichomonas gallinae em pombos (Columba livia) em áreas urbanas de Pelotas	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura e coleta de amostras	11/2017	02/2019
2	Cultivo in vitro	11/2017	02/2019
3	Análise histopatológica	11/2017	02/2019
4	Análise dos dados	11/2017	02/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, a atuação ou a pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO isene o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2016, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/legis .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	JULIANA MONTELLI PENALTI	Processamento de amostras	015.555.665-34	1059347359 RJ-RJ	Brasileira
2	Hugo Leonardo da Cunha Amaral	Captura e coleta de amostras	006.342.686-31	8072555265 RJ-RJ	Brasileiro
3	Nara Amélia da Rosa Farias	Coordenadora do Projeto	259.252.370-72	2004386578 SP-RJ	Brasileira
4	Paulo Roberto Silveira dos Santos	Captura e coleta de amostras	200.226.546-20	1017595715 SP-RJ-RJ	Brasileiro
5	Sara Patron da Mota	Captura e coleta de amostras/ Processamento	023.997.610-06	1087620967 SP-RJ	Brasileira
6	MIRIAN PINHEIRO BRUNI	Processamento de amostras	020.559.600-24	1079245518 SP-RJ	Brasileira
7	Luciana Siqueira Silveira dos Santos	Captura e coleta de amostras	007.495.820-81	1083473619 RJ-RJ	Brasileira
8	Bruna Baccaga	Captura e coleta de amostras/ Processamento	019.614.110-65	1099169146 RJ-RJ-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 84322749



Página 1/3

Anexo II

17/05/2018

SEMUPPel - 0143750 - Parecer



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PARECER Nº 60/2018/CEEA/REITORIA
PROCESSO Nº 23110.012860/2018-81
INTERESSADO: NARA AMELIA DA ROSA FARIAS

Pelotas, 15 de maio de 2018

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Fauna parasitária de *Columba livia* (GMELIN, 1789) (Aves: Columbidae) capturados no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil" registrada com o nº 23110.012860/2018-81, sob a responsabilidade de Nara Amélia da Rosa Farias - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 07/05/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	15/05/2018 a 31/03/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Columba livia</i>
Nº de animais	384
Idade	Jovens e Adultos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Praças públicas e prédios públicos e privados da área urbana de Pelotas/RS
Nº Sisbio	61235-1
Método de captura	Adultos serão capturados com auxílio de rede de neblina, enquanto que os jovens serão capturados manualmente dos ninhos

Anexo III

The screenshot shows a Gmail interface. On the left is a sidebar with navigation links: Compose, Inbox (114), Starred, Snoozed, Sent, Drafts (2), More, Meet (New meeting, Join a meeting), and Hangouts (Bruna). The main area displays an email titled "Reminder: Parasitology" from "Parasitology <onbehalfof@manuscriptcentral.com>" to the user, dated 18-Nov-2021 at 2:40 AM. The email body contains a reminder about a decision on PAR-2021-0266, a link to the manuscript and decision letter, and a signature from Alison Sage at the Parasitology Editorial Office.

Reminder: Parasitology

Parasitology <onbehalfof@manuscriptcentral.com>
to me
18-Nov-2021

Dear Professor/Dr Baccega,

Recently, you received a decision on PAR-2021-0266, entitled "Anti-Trichomonas gallinae properties of compounds citral and geraniol." The manuscript and decision letter are located in your Author Center at <https://mc.manuscriptcentral.com/par>

https://mc.manuscriptcentral.com/par?URL_MASK=afa65a317e454ba9819e5197f8229e6d

Sincerely,
Alison Sage
Parasitology Editorial Office
parasitology@cambridge.org