

Atividade citotóxica do extrato de *Vitis labrusca* em culturas de *Trichomonas vaginalis*

Cytotoxic activity of *Vitis labrusca* extract in cultures of *Trichomonas vaginalis*

Marcos Serpa¹, Mariana Duarte², Niara da Silva Medeiros³, Mirian Salvador⁴, Tiana Tasca⁵, Caroline Dani⁶

¹ Biomédico pelo Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS; ² Estudante da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Porto Alegre, RS; ³ Mestre em Biociências e Reabilitação pelo Centro Universitário Metodista IPA, Responsável Técnica pelo Centro de Pesquisa do Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS; ⁴ Doutora em Química pela Universidad de La Republica del Uruguay, Pesquisadora do Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS; ⁵ Doutora em Ciências Biológicas pela UFRGS e pela University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, Estados Unidos da América, Professora Adjunta da Faculdade de Farmácia da UFRGS, Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Porto Alegre, RS; ⁶ Doutora em Biotecnologia pela UCS, Professora Titular do Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* do extrato de folhas de videira (*Vitis labrusca*) provenientes de cultivo convencional e orgânico.

Métodos: Extratos de folhas secas de videira, orgânico e convencional, foram elaborados com extrator Soxhlet. A composição fenólica total dos extratos foi avaliada por Folin-Cicoalteau e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A atividade antiparasitária dos extratos foi realizada em cultura de *T. vaginalis*. Os testes foram realizados em três concentrações finais: 5, 10 e 20 mg/mL. Os trofozoítos foram contados em hemocítmetro e sua densidade foi ajustada em meio de cultura *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM), de forma a se obter a concentração final de 1×10^5 trofozoítos/mL. Após incubação com os extratos por 24 horas a 37°C, foi feita a contagem dos trofozoítos com motilidade em hemocítmetro. Os controles do veículo foram realizados, adicionando-se água em substituição aos extratos.

Resultados: O extrato de folhas convencionais é rico em catequina e os orgânicos, em resveratrol. Os extratos de *V. labrusca* não apresentaram atividade anti-*T. vaginalis* nas concentrações de 5 e 10 mg/mL. Entretanto na concentração de 20 mg/L, o extrato de folhas secas convencionais reduziu em 100% e o extrato orgânico em 48% a sobrevivência dos trofozoítos. Os polifenóis catequina, quercetina e rutina estavam em maior concentração no extrato com maior eficácia, os quais podem ser os responsáveis pela ação anti-*T. vaginalis* do extrato convencional.

Conclusões: O extrato de folha de videira pode ser uma alternativa no combate a *T. vaginalis*. Estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para comprovar eficácia e segurança desta intervenção.

DESCRITORES: *Trichomonas vaginalis*; AGENTES ANTITRICHOMONAS; TRICHOMONÍASE; INFECÇÃO; POLIFENOL; *Vitis labrusca*.

ABSTRACT

Aims: To evaluate the anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the extract of organic and conventional leaves of *Vitis labrusca*.

Methods: Organic and conventional grapevine leaf extracts were prepared with extractor Soxhlet. The total phenolic extracts were evaluated by Folin-Cicoalteau and High-Performance Liquid Chromatography. The antiparasitic activity of the extracts was performed on growth of *T. vaginalis*. Tests were conducted at three final concentrations of 5, 10 and 20 mg/mL. The trophozoites were counted by hemocytometer and their density was adjusted in Trypticase-Yeast Extract-Maltose (TYM) growth environment in order to obtain a final concentration of 1×10^5 trophozoites/ml. After incubated with the extracts for 24 hours at 37°C, the count of motile trophozoites was taken by hemocytometer. The vehicle controls were performed by substituting the extract by water.

Results: The conventional leaf extract is rich in catechin and the organic in resveratrol. The extracts of *V. labrusca* showed no anti-*T. vaginalis* activity at concentrations of 5 and 10 mg/mL. However in the concentration of 20 mg/L conventional grapevine leaf extracts reduced by 100% and the organic extract by 48% the survival of trophozoites. Catechin polyphenols, quercetin and rutin were in higher concentration in the extract with greater efficacy, which may be the responsible for the anti-*T. vaginalis* action of the conventional extract.

Conclusions: The vine leaf extract may be an alternative to combat *T. vaginalis*. Pre-clinical and clinical studies are needed to confirm efficacy and safety of this intervention.

KEY WORDS: *Trichomonas vaginalis*; ANTITRICHOMONAL AGENTS; TRICHOMONAS INFECTIONS; INFECTION; POLYPHENOL; *Vitis labrusca*.

Recebido em novembro de 2013; aceito em março de 2014.

Endereço para correspondência / Corresponding Author:

CAROLINE DANI
Joaquim Pedro Salgado, 80 – Rio Branco
90420-060 Porto Alegre, RS, Brasil
Telefone: (51) 3316-1298
E-mail: Caroline.dani@metodistasul.edu.br



<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado causador da tricomoníase, uma doença sexualmente transmissível, que ataca o sistema urogenital humano. Este parasita pode causar prostatites e uretrites em homens; e vaginites ou cervicites em mulheres.¹ Em quadros graves, a tricomoníase pode levar a resultados adversos na gravidez, nascimentos prematuros,² infertilidade³ e a predisposição ao câncer de colo uterino,^{4,5} sendo também um cofator agravante no contágio e transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV).⁶⁻⁸ A doença tem ocorrência mundial, com cerca de 170 milhões de casos. A prevalência na região das Américas é de 0,6% em homens e 5,6% em mulheres.⁹

Os sintomas dependem da carga parasitária infectante, da imunidade do hospedeiro e da sexualidade. Em mulheres, quando não são assintomáticas, podem ocorrer inflamação e irritação da mucosa genital, com presença de corrimento.¹⁰ Já a maior parte dos homens tem doença assintomática, mas quando há grande infecção, pode haver casos de corrimentos, dificuldade para urinar, prurido e ulceração peniana.¹¹

O diagnóstico laboratorial da tricomoníase é geralmente realizado por exame microscópico a fresco da secreção do trato genital. A agência FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos) recomenda o uso de dois principais medicamentos para o tratamento de tricomoníase em humanos: Metronidazol e Tinidazol.¹² Entretanto, estudos laboratoriais vêm relatando que estes dois medicamentos, em longo prazo e em doses elevadas, podem provocar reações adversas importantes, além de causar resistência a esta terapia convencional.¹³⁻¹⁵

Por estas razões, a procura por tratamentos eficazes e de baixo custo e baixa toxicidade para a saúde dos infectados vem crescendo¹⁶⁻¹⁸. Neste contexto, as plantas se tornam importantes aliados no tratamento, na medida em que suas substâncias naturais são fontes de moléculas com potenciais medicinais e compostos bioativos.¹⁹⁻²¹

Estudos vêm demonstrando que derivados da videira, principalmente das espécies *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, como fruto, semente e folhas, possuem propriedades importantes para o ser humano, como no tratamento de gastroenterites, hepatites, hipertensão arterial e arteriosclerose.²²⁻³² Além disso, foi demonstrado efeito antibactericida de um extrato aquoso de *V. vinifera* L. contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio alginolyticus*.³³ Porém até o momento existem

poucos dados na literatura científica que atribuam outros usos ao extrato de folhas de videiras *V. labrusca*.

A *V. labrusca* é uma espécie de videira originária do Sul dos Estados Unidos, que atualmente é cultivada no estado do Rio Grande do Sul numa área plantada correspondente a 8.979 hectares, representando aproximadamente 45% de toda a uva produzida no Brasil, sendo seu principal destino a produção de vinho tinto e suco de uva.³⁴ Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* do extrato de folhas de *V. labrusca* provenientes de cultivo convencional e orgânico.

MÉTODOS

Obtenção e preparação do extrato

As folhas de *V. labrusca*, da variedade Bordô, de produção convencional (utilização de agrotóxicos durante o cultivo) e orgânica (não utiliza agrotóxico em seu cultivo), foram coletadas no final da floração, antes da frutificação. A planta foi identificada pelo Herbário do Centro Universitário Metodista do IPA (Porto Alegre, RS, Brasil). As videiras receberam a certificação orgânica ECOVIDA e as folhas foram secas à sombra e picadas a fim de uma obtenção de um pó para a extração²².

Para obtenção do extrato, as folhas foram colocadas com etanol a 70% em um circuito fechado a 70°C durante 20 horas em extrator Soxhlet. O solvente foi evaporado em banho-maria por cinco horas e os resíduos foram diluídos em água (0,1 g/mL) antes de cada teste.²² As soluções de trabalho foram preparadas a partir do produto obtido da extração adicionado de água na concentração de 100 mg/mL como solução mãe, sendo diluída até a concentração desejada para os tratamentos. Foram preparados dois extratos: extrato de folhas de videira orgânica seca (FOS) e extrato de folhas de videira convencional seca (FCS). Os extratos utilizados possuem a seguinte caracterização: Polifenóis totais (FOS: 20,2±1,80 mg ácido gálico/mL e FCS: 19,0±0,05 mg ácido gálico/mL); Flavonoides (FOS: 7,94±0,4 µg rutina/mL e FCS: 8,95±0,5); Catequina (FOS: 3,64±0,01 mg/g extrato bruto e FCS: 4,30±0,03); Resveratrol (FOS: 0,714±0,01 mg/g e FCS: 0,062±0,003 mg/g); Quercetina (FOS: 5,86±0,15 mg/g e FCS: 6,74±0,08); Rutina (FOS: 44,90±0,22 mg/g e FCS: 55,75±0,10 mg/g); Canferol (FOS: 1,37±0,10 mg/g e FCS: 1,43±0,15) e Naringina (FOS: Não identificado e FCS: 0,77±0,012 mg/g).

Cultura dos parasitos

Foram usados isolados de *T. vaginalis* 30236 (*American Type Culture Collection*) sensíveis a metronidazol, cultivados em meio específico (TYM médio), pH 6,0, suplementado com 10% (v/v) de soro humano inativado e incubado a 37°C ($\pm 0,5$)³⁵. Os organismos na fase logarítmica de crescimento e mostrando mais de 95% com motilidade e morfologia normais, foram colhidos, centrifugados, lavados três vezes com tampão PBS e ressuspensos em meio TYM para os testes de citotoxicidade. Os resultados foram obtidos a partir de, pelo menos, três experimentos independentes, em triplicata.

Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos de *V. labrusca* foi determinada in vitro para *T. vaginalis*. Os testes foram realizados em três concentrações finais 5, 10 e 20 mg/mL. Os trofozoítos foram contados em hemocítmetro e sua densidade foi ajustada, em meio TYM, de forma a se obter a concentração final de 1×10^5 trofozoítos/mL em cada microtubo com a adição de 400 μ L. Os trofozoítos foram incubados com os extratos por 24 horas a 37°C. Após esse período foi feita a contagem dos trofozoítos com motilidade em hemocítmetro. Os controles foram realizados com a adição de meio TYM no lugar dos extratos para se obter o valor no qual não há nenhum efeito anti-*T. vaginalis*, ou seja, 100% de trofozoítos com motilidade. Além disso, controles do veículo foram realizados, adicionando-se água no lugar dos extratos, para fim de verificar possível interferência do solvente na atividade citotóxica.

Análise estatística

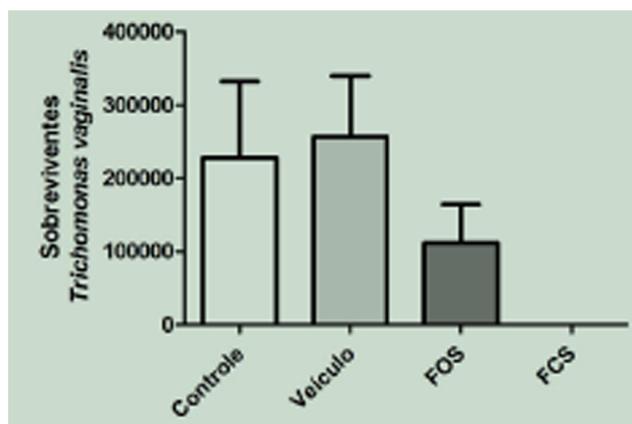
Foi avaliada a normalidade das variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnoff. Os dados foram identificados como paramétricos e submetidos à análise de variância (*One-Way ANOVA*). Relações entre as variáveis foram avaliadas pela correlação de Pearson. Os testes foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Foi utilizado *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 para todas as análises estatísticas.

RESULTADOS

Através da análise de compostos fenólicos pôde-se observar que não houve diferença estatística no

conteúdo fenólico total dos extratos. Entretanto, foram observadas diferenças significativas no conteúdo de flavonoides, onde o FCS apresentou maior conteúdo de flavonoides e somente este extrato apresentou naringinina na sua composição. Quanto ao conteúdo de resveratrol, o extrato orgânico apresentou-se mais rico ($0,714 \pm 0,01$ mg/g) quando comparado ao extrato convencional ($0,062 \pm 0,003$ mg/g). Além disso, podem-se observar correlações negativas entre o conteúdo de polifenóis isolados e a sobrevivência dos parasitos. Entre estas correlações estão com catequina ($r = -0,994$), quercetina ($r = -0,924$) e rutina ($r = -0,999$), e todas estas correlações foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os resultados dos testes anti-*T. vaginalis* com o extrato da *Vitis labrusca* em concentração de 5 mg/ml e 10mg/ml não demonstraram ação antiparasitária contra *T. vaginalis*, restando, 100% de trofozoítos com motilidade em todas as culturas. Entretanto, na concentração de 20 mg/mL, observou-se importante ação anti-*T. vaginalis*. Apenas o extrato FCS apresentou ação citotóxica, com supressão de 100% nos trofozoítos (**Figura 1**).



FOS: Extrato de folha seca de videira orgânico (sem agrotóxico em seu cultivo).
FCS: Extrato de folha seca de videira convencional (utilização de agrotóxicos durante o cultivo).

Figura 1. Sobrevivência de *Trichomonas vaginalis* após tratamento realizado na presença e/ou ausência dos extratos de videira *Vitis labrusca* provenientes de cultivo convencional e orgânico, em concentração de 20 mg/mL.

DISCUSSÃO

Existem na literatura estudos que mostram os efeitos benéficos do extrato de folha de videira *V. labrusca*, como cardioprotetor, nefroprotetor e hepatoprotetor,^{23,32} mas não existem estudos até o

momento que verifiquem a sua ação como agente anti-*Trichomonas*. No entanto, um estudo verificou a atividade anti-leishmania do extrato etanólico de folhas de *V. vinifera*, observaram que este extrato teve potencial ação contra promastigotas de *Leishmania infantum*, observando alterações globais das células com destruição citoplasmática e nuclear.³⁶

É importante ressaltar que na literatura científica existem estudos com outros tipos de extratos ricos em polifenóis, verificando a ação antiparasitária em *T. vaginalis*, podendo assim ser pertinente a sua comparação com o extrato utilizado neste estudo. Há estudos, como o de Fernandes et al. em 2005²⁰ demonstrando que a *Artemisia ludoviciana* extraída em meio de acetona e hexano tem atividade antiparasitária contra *Entamoeba histolitica* e *Giardia lamblia*. Ainda em testes com *G. lamblia*, Gadelha et al. conseguiram a inativação ou mortalidade de 93% dos parasitas com diferentes concentrações de extratos de *Hovenia dulcis* (Cajueiro-japones).²¹

No estudo de Omisore et al.¹⁶ foram testados dois tipos de extratos de *Dorstenia*, que mostraram forte ação antiparasitária, na qual a atividade dos componentes ativos isolados do extrato tiveram ação antioxidante e anti-*Trichomonas* na concentração de 0.121-31.25 µg/ml para *Trichomonas gallinarum*. Outro estudo apresentou uma atividade anti-*Trichomonas* resultante da concentração de compostos carbazóis encontrados no extrato da planta *Murraya koenigii*. Além disso, este demonstrou também efeito hepatoprotetor; mas, mesmo em dose moderada pode-se observar efeitos tóxicos a outros órgãos, por isso sua administração deve ser cautelosa.³⁷

Como observado no presente estudo, houve correlações negativas entre a sobrevivência dos parasitos e o conteúdo de alguns polifenóis presentes nos extratos. Através destes dados, é possível considerar a existência de uma atividade anti-*T. vaginalis* para alguns polifenóis existentes nos extratos, como, exemplo, flavonoides e catequinas, que são conheci-

dos principalmente por serem potentes antioxidantes, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação.³⁸ Estas informações remetem ao trabalho de Mukai et al.,³⁵ que demonstraram um potencial efeito anti-helmíntico dos polifenóis encontrados no chá verde. Esta atividade foi atribuída à elevada concentração de taninos (catequina, epicatequina e as procianidinas) no extrato de *Camelia sinensis* (chá verde).³⁹

Além disso, um estudo que avaliou a toxicidade dos extratos de *Eucalyptus camaldulensis* e *Myrtus communis* à *T. vaginalis* mostrou que ambos os extratos foram eficazes na morte do trofozoítos após 24 horas de incubação em concentrações maiores ou iguais a 20mg/mL, como também demonstrado no presente estudo.⁴⁰ É importante avaliar a dose de cada tipo de extrato; um estudo que utilizou extrato de *Arbutus unedo* verificou que uma dose de apenas 125 µg/mL já foi suficiente para inibir 75% dos trofozoítos de *T. vaginalis*.⁴¹

A utilização potencial de extratos no tratamento da tricomoníase pode ser relevante, já que existem alguns variações de *T. vaginalis* que podem ser resistentes ao tratamento convencional com metronidazol.⁴¹⁻⁴³ Dessa forma, um estudo que avaliou a atividade antiparasitária do extrato de *Hypericum polyanthemum* frente a *T. vaginalis* resistentes verificou que houve redução da motilidade do parasita com os extratos testados, porém não de forma relevante.⁴² Os extratos de *Commiphora molmol* e *Punica granatum* também foram capazes de inviabilizar cepas de *T. vaginalis* resistentes a metronidazol.³⁹ Esses estudos apontam que a utilização de extratos vegetais pode ser uma alternativa quando existir resistência ao metronidazol.⁴¹⁻⁴³

Em conclusão, extrato de folha de videira convencional de *V. labrusca* demonstrou ter ação antiparasitária para trofozoítos de *T. vaginalis*. Por ser um estudo preliminar e *in vitro*, são necessários novos estudos experimentais e clínicos para verificar a especificidade da ação desses extratos e as concentrações adequadas para combater a tricomoníase.

REFERÊNCIAS

1. Maciel GP, Tasca T, De Carli GA. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. J Bras Patol Med Lab. 2004;40(3):152-60.
2. Sobel JD. What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis? Infect Dis Clin North Am. 2005;19(2):387-406.
3. Nijhawan AE, Chapin KC, Salloway R, Andrea S, Champion J, Roberts M, Clarke JG. Prevalence and predictors of trichomonas infection in newly incarcerated women. Sex Transm Dis. 2012;39(12):973-8.
4. Yusof AM, Kumar S. Phenotypic 'variant' forms of *Trichomonas vaginalis* trophozoites from cervical neoplasia patients. Exp Parasitol. 2012;131(3):267-73.
5. Afzan MY, Suresh K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. Parasitol Res. 2012;111(1):371-81.

6. Silva LC, Miranda AE, Batalha RS, Monte RL, Talhari S. *Trichomonas vaginalis* and associated factors among women living with HIV/AIDS in Amazonas, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(6):701-3.
7. Sorvilho F, Smith L, Kerndt P, Ash L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(6):927-32.
8. Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison CS. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis*. 2008;197(4):548-54.
9. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. Geneva: WHO; 2008. Disponível em: <http://www.who.int/en>
10. Gómez-Barrio A, Nogal-Ruiz JJ, Montero-Pereira D, Rodríguez-Gallego E, Romero-Fernández E, Escario JA. Biological variability in clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(6):893-6.
11. Sobel JD. What's New in Bacterial Vaginosis and Trichomoniasis? *Infect Dis Clin N Am*. 2005;19(2):387-406.
12. Helms DJ, Mosure DJ, Secor WE, Workowski KA. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(4):370-7.
13. Sobel JD, Nyirjesy P, Brown W. Tinidazole therapy for metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1341-6.
14. Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):344-7.
15. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):783-93.
16. Omisore NOA, Adewunmi CO, Iwalewa EO, Ngadjui BT, Adenowo TK, Abegaz BM, Ojewole JA, Watchueng J. Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(7):1087-94.
17. Desrivot J, Waikedre J, Cabalion P, Herrenknecht C, Bories C, Hocquemiller R, Fournet A. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2007;112(1):7-12.
18. Lara-Díaz VJ, Gaytán-Ramos AA, Dávalos-Balderas AJ, Santos-Guzmán J, Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Barbosa-Quintana A, Sanson M, López-Reyes AG, Moreno-Cuevas JE. Microbiological and Toxicological Effects of Perla Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Extracts: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;104(2):81-6.
19. Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macedo RO. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Braz J Pharmacogn*. 2006;16(Supl.):696-720.
20. Fernández SS, Guerra MCR, Cárdenas BDM, Villarreal JV, Treviño LV. *In vitro* antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia*. 2006;76(5):466-8.
21. Gadelha APR, Vidal F, Castro TM, Lopes CS, Albarello N, Coelho MGP, Figueiredo SFL, Monteiro-Leal LH. Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. *Parasitol Res*. 2005;97(5):399-407.
22. Dani C, Oliboni LS, Agostini F, Funchal C, Serafini L, Henriques JA, Salvador M. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. *Bordo*) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(1):148-53.
23. Lívia, Oliboni LS, Dani C, Funchal C, Henriques JA, Salvador M. Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. *Bordo*) on Wistar rat tissues. *An Acad Bras Ciênc*. 2011;83(4):1403-11.
24. Oliboni LS, Henriques JA, Dani C, Salvador M. Antioxidant activity of *Vitis labrusca* grapevine leaves. *Ciênc Mov*. 2009;21:39-44.
25. Deliorman Orhan D, Orhan N, Özçelik B, Ergun F. Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves. *Turk J Biol*. 2009;33:341-8.
26. Monagas M, Hernández-Ledesma B, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *J Agric Food Chem*. 2006;54(2):319-27.
27. Orhan N, Asland M, Orhan DD, Ergun F, Yestilada E. *In-vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2006;108(2):280-6.
28. Vitali F, Bonina FP, Sajja A, Tomaino A, Fonte G, Pennisi C, Tita B. Studies on antidiarrhoeal activity of an extract of wine from *Jacquez* grapes in mice. *Phytother Res*. 2005;19(11):924-7.
29. Orhan DD, Orhan N, Ergun E, Ergun F. Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *J Ethnopharmacol*. 2007;112(1):145-51.
30. Kosar M, Küpeli E, Malyer H, Uylaser V, Türkben C, Baser KHC. Effect of brining on biological activity of leaves of *Vitis vinifera* L. (cv. *Sultani Cekirdeksiz*) from Turkey. *J Agric Food Chem*. 2007;55(11):4596-603.
31. Kang J, Lee W, Lee C, Yoon W, Kim N, Lee H, Park H, Han S and Yun J. Improvement of high-fat diet-induced obesity by a mixture of red grape extract, soy isoflavone and l-carnitine: Implications in cardiovascular and non-alcoholic fatty liver diseases. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(9):2453-8.
32. Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:146-61.
33. Mansour R, Ayed L, Hammami S, Mighri Z, Bakhrouf A and Mhenni F. Propriétés tinctoriales et Activités antibactériennes d'extraits de feuilles de *Vitis vinifera* L. de Tunisie. *Tunisian J Med Plants Natural Products*. 2011;6:126-32.
34. Rizzon LA, Miele A, Meneguzzo J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000;20(1):115-21.
35. Diamond LS. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol*. 1957;43(4):488-90.
36. Mansour R, Haouas N, Kahla-Nakbi AB, Hammami S, Mighri Z, Mhenni F, Babba H. The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infactum*. *Iran J Pharm Res*. 2013;12(3):349-55.

37. Adebajo AC, Ayoola OF, Iwalewa EO, Akindahunsi AA, Omisore NOA, Adewunmi CO, Adenowo TK. Anti-trichomonal, biochemical and toxicological activities of methanolic extract and some carbazole alkaloids isolated from the leaves of *Murraya koenigii* growing in Nigéria. *Phytomedicine*. 2006;13(4):246-54.
38. Schmitz W, Saito AY, Estevão D, Saridakis HO. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina*. 2005;26:119-30.
39. Mukai D, Matsuda N, Yoshioka Y, Sato M, Yamasaki T. Potential anthelmintics: polyphenols from the tea plant *Camellia sinensis* L. are lethally toxic to *Caenorhabditis elegans*. *J Nat Med*. 2008;62(2):155-9.
40. Mahdi NK, Gany ZH, Sharief M. Alternative drugs against *Trichomonas vaginalis*. *East Mediterr Health J*. 2006;12(5):679-84.
41. Ertabaklar H, Kivçak B, Mert T, Özenzoy Töz S. *In vitro* activity of *Arbutus unedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Turkiye Parazitol Derg*. 2009;33(4):263-5.
42. Cargin ST, Vieira PB, Cibulski S, Cassel E, Vargas RMF, Montanha J, Roehle P, Tasca T, Von Poser GL. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitol Int*. 2013;62(2):112-7.
43. El-Sherbiny GM, Sherbiny ET. The Effect of *Commiphora molmol* (Myrrh) in Treatment of *Trichomoniasis vaginalis* infection. *Iran Red Crescent Med J*. 2011;13(7):480-6. 