



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÀRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS  
CURSO DE MESTRADO**

**POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA  
*IN VITRO* DE SAPONINAS E FLAVONOIDES**

**ACIDÁLIA CARINE VIEIRA SANTOS**

**SALVADOR – BAHIA  
OUTUBRO DE 2017**

**ACIDÁLIA CARINE VIEIRA SANTOS**

**POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA  
*IN VITRO* DE SAPONINASE FLAVONOIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Ciência Animal nos Trópicos, da  
Universidade Federal da Bahia, como  
requisito parcial para obtenção do título  
de Mestre em Ciência Animal nos  
Trópicos.

Orientadora: Profa. PhD. Silvia Lima Costa  
Co-Orientadora: Profa. PhD. Maria José Moreira Batatinha

**SALVADOR – BAHIA  
OUTUBRO DE 2017**

Carine Vieira Santos, Acidália  
POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA IN VITRO DE  
SAPONINAS E FLAVONOIDES / Acidália Carine Vieira Santos. --  
Salvador, 2017.  
70 f. : il

Orientador: Prof<sup>a</sup>. PhD. Silvia Lima Costa.  
Coorientador: Prof<sup>a</sup>. PhD. Maria José Moreira Batatinha.  
Dissertação (Mestrado - Medicina Veterinária) --  
Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária  
da Universidade Federal da Bahia, 2017.

1. Sapogenina. 2. Aglicona. 3. Anti-helmíntico. 4. Cadeia de  
açúcares. 5. Toxicidade. I. Lima Costa, Prof<sup>a</sup>. PhD. Silvia.  
II. José Moreira Batatinha, Prof<sup>a</sup>. PhD. Maria. III. Título.

S237  
CDU 636.09

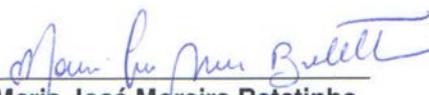
**“ POTENCIAL ANTI-HEMÍNTICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *in vitro* DE SAPONINAS E FLAVONOÍDES”**

**Acidália Carine Vieira Santos**

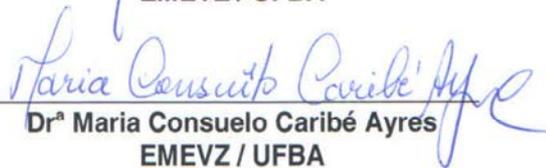
**Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos**

**Salvador, 27 de outubro de 2017**

**Comissão examinadora:**



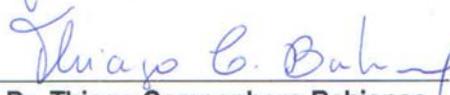
**Dr<sup>a</sup> Maria José Moreira Batatinha  
EMEVZ / UFBA**



**Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo Caribé Ayres  
EMEVZ / UFBA**



**Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva  
ICS / UFBA**



**Dr. Thiago Campanharo Bahiense  
ICS / UFBA**



**Dr<sup>a</sup> Sílvia Lima Costa  
Orientadora  
ICS/UFBA**

## **DEDICO**

Dedico primeiramente a Deus e a minha família por acreditarem e estarem sempre ao meu lado em toda esta fase de aprendizado e crescimento profissional.

Com muito amor e respeito, dedico esta mais nobre conquista aos meus pais, Anísio Hilário dos Santos Filho e Rose Maria Vieira Santos, que tanto me deram carinho, amor e conselhos nesta minha jornada tão conturbada e gratificante. A minhas irmãs (Michele Vieira Santos e Thais Vieira Santos) e aos meus sobrinhos, Gabriel, Adriele e Felipe, pela confiança a mim entregue e por saber que meus atos são exemplo para vocês e refletirá em suas vidas. Dedico a minha grande amiga irmã Nádia Carvalho, porque sem amigos não somos nada.

A vocês dedico minha eterna gratidão pela compreensão nos momentos difíceis, pela dedicação e por entender as minhas falhas e ausência.

## AGRADECIMENTO

À Deus, por tornar meu caminho mais leve.

Aos meus pais, Rose e Anísio, por serem o meu porto seguro, minha referência de vida; pelo amor incondicional, respeito, cuidado, carinho e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, refletindo na pessoa que sou hoje.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, que nos momentos de dificuldades sempre estiveram prontos a me receber e levantar meu astral.

À prof.<sup>a</sup> Maria José Batatinha pelas broncas que me fizeram amadurecer e aprimorar minha capacidade e pela orientação sempre presente que refletiu no sucesso deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Silvia Lima Costa pela confiança e por toda orientação para conclusão deste projeto.

À Prof.<sup>a</sup> Mariana Botura pela dedicação, paciência e orientação neste trabalho.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório, Francianne, Hélimar e Soraia, por todo auxílio e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Alessandro Branco e ao colega Euder Reis Dias pela colaboração na preparação e fornecimento das saponinas, sapogeninas e flavonoides.

Ao Prof. Jorge David, e aos colegas Klauber Cardoso e Eliezer Silva pela colaboração na preparação e fornecimento dos flavonoides, cedidos para realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório do cultivo celular, em especial Prof. Luis Fernando Pita e Gideão, pela grande colaboração no provimento das células para o teste de citotoxicidade.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição da resistência anti-helmíntica em relação ao rebanho de pequenos ruminantes no Brasil.....	18
<b>Figura 2</b> - Esquema de classificação estrutural das saponinas, (A) quanto a aglicona e (B) ausência da cadeia de açúcar .....	21
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da digitonina .....	24
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da hecogenina .....	25
<b>Figura 5</b> - Estrutura química do acetato de hecogenina .....	25
<b>Figura 6</b> - Estrutura química básica dos flavonoides .....	27
<b>Figura 7</b> - Obtenção das saponinas .....	31
<b>Figura 8</b> - Obtenção dos produtos de hidrólise ácida da escina e digitonina .....	31
<b>Figura 9</b> - Fluxograma de obtenção dos flavonoides. ....	32
<b>Figura 10</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (δ em ppm) dos produtos da hidrólise da escina. A região ampliada (1) é referente a região de 3-5ppm. ....	38
<b>Figura 11</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (δ em ppm) da digitogenina. A região ampliada (2) é referente a região de 3-5ppm. ....	38
<b>Figura 12</b> - Estruturas química da digitonina (A) e da digitogenina (B). ....	39
<b>Figura 13</b> - Percentual de inibição da eclosão de ovos (média ± desvio padrão) de nematódeos gastrintestinais tratados com saponinas e sapogeninas.....	40
<b>Figura 14</b> - Percentual de inibição da eclosão de ovos (média ± desvio padrão) de nematódeos gastrintestinais tratados com flavonoides .....	41
<b>Figura 15</b> - Percentual de larvas móveis (média ± desvio padrão) de nematódeos gastrintestinais no terceiro estágio após o tratamento com saponinas e sapogeninas. ....	42

<b>Figura 16</b> - Percentual de larvas móveis (média $\pm$ desvio padrão) de nematoides gastrintestinais no terceiro estágio após o tratamento com flavonoides.....	43
<b>Figura 17</b> - Percentual de viabilidade de células Vero (média $\pm$ desvio padrão), pelo teste MTT, após tratamento escina e digitonina.....	44
<b>Figura 18</b> - Percentual de viabilidade de células Vero (média $\pm$ desvio padrão), pelo teste IP, após tratamento escina e digitonina.....	45
<b>Figura 19</b> - Cultivo de célula Vero após 24h de exposição aos controles, positivo (RPMI) e negativo (Peroxido de Hidrogênio a 3%), teste de IP (Objetivas de 10x).....	45
<b>Figura 20</b> - Cultivo de célula Vero após 24h de exposição a escina em diferentes concentrações, teste de IP (Objetivas de 10x).....	46
<b>Figura 21</b> - Cultivo de célula Vero após 24h de exposição a digitonina em diferentes concentrações, teste de IP (Objetivas de 10x).....	47
<b>Figura 22</b> - Estruturas química da escina e sapogeninas.....	48

**LISTA DE SIGLAS**

C -	Controle Negativo
C +	Controle Positivo
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CC	Cromatografia em Coluna
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva para Inibir 50%
CE <sub>90</sub>	Concentração Efetiva para Inibir 90%
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória em 50%
IBGE	Instituto brasileiro de Geografia e Estatística
IP	Iodeto de Propídio
L1	Larvas de Primeiro Estádio
L2	Larvas de Segundo Estádio
L3	Larvas de Terceiro Estádio
L4	Larvas de Quarto Estádio
L5	Larvas de Quinto Estádio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenitetrazólio
µM	Micromol
µg	Micrograma
OPG	Ovos por Grama de Fezes
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TEO	Testes de Inibição da Eclosão de Ovos
TML	Teste de Motilidade Larvar
Vero	Linhagem Celular de Rim de Macaco Verde Africano

SANTOS, Acidália Carine Vieira. **Potencial anti-helmíntico e avaliação citotóxica *in vitro* de saponinas e flavonoides** 2017. 70 F. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

## RESUMO

A identificação de novos compostos com potencial antiparasitário tem sido alvo de intensas investigações. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito *in vitro* de saponinas e flavonoides sobre nematoides gastrintestinais de caprinos e em cultivos de células de linhagem celular de rim de macaco verde africano (Vero). Foram testados saponinas (digitonina e escina) e suas respectivos aglicona (sapogeninas); sapogenina acetilada (acetato de hecogenina) e os flavonoides (catequina, hesperedina, isocordoína, mistura de isocordoína e cordoína, e dímero de chalcona). A atividade anti-helmíntica destes compostos foi avaliada através dos testes de inibição da eclosão de ovos (TEO) e motilidade larvar (TML). A ação citotóxica foi verificada empregando-se os ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenitetrazólio (MTT) e iodeto de propídio (IP). Significativo percentual de inibição na eclosão de ovos ( $p < 0.05$ ), foi observado apenas nos tratamentos com a escina (99%) e a digitonina (45%). As  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$  da escina foram respectivamente 0.67 e 0.79 mg/mL. No TML, os compostos que reduziram significativamente a motilidade de larvas ( $p < 0.05$ ) foram a digitonina em 95% ( $CE_{50} = 0.03$  mg/mL e  $CE_{90} = 0.49$  mg/mL) e o acetato de hecogenina em 75%. As agliconas da digitonina e escina apresentaram baixa atividade ovicida (3 e 8%) e larvicida (2 e 2%), respectivamente. Todos os flavonoides apresentaram baixo efeito ovicida (4 a 20%) e larvicida (10 a 26%). Apenas a escina e a digitonina, que apresentaram eficácia anti-helmíntica igual ou acima de 95%, foram avaliados quanto à citotoxicidade; ambas demonstraram baixa toxicidade no teste de IP, sendo observado alto percentual de células integras de 94 e 96% respectivamente para a escina e digitonina, na maior concentração utilizada (0.03 mg/mL). No ensaio de MTT, estas saponinas foram citotóxicas, evidenciando 8% de células viáveis para a escina, na maior concentração (0.045 mg/mL) com  $CI_{50} = 0.20$  mg/mL, e 6% de células viáveis para digitonina na maior concentração (0.083 mg/mL) com  $CI_{50} = 0.0074$  mg/mL. Os resultados evidenciaram, que a escina e digitonina têm elevado efeito anti-helmíntico *in vitro* sobre nematoides gastrintestinais de caprinos, e que a presença das cadeias de açúcares ligada aos núcleos dessas saponinas, aumentou esse efeito farmacológico.

**Palavras chave:** Sapogenina, anti-helmíntico, aglicona, cadeia de açúcares, toxicidade.

SANTOS, Acidália Carine Vieira. ***In vitro* evaluation of the anthelmintic potential of saponins and flavonoids** 2017. 70 F. Dissertation (Master's degree of Animal Science in Tropics) – School of Veterinary Medicine and Livestock, Federal University of Bahia, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

The identification of new compounds with antiparasitic potential has been the target of intense investigations. This study aimed to evaluate the *in vitro* effect of saponins and flavonoids over gastrointestinal nematodes of goats and in cultured cells of the African green monkey kidney cell line (Vero). The tested compounds were saponins (digitonin and aescin) and their respective aglycone (sapogenin); the acetylated sapogenin (hecogenin acetate) and the flavonoids (catechin, hesperidin, isocordoin, a mixture of isocordoin and cordoin, Chalcone dimer). The anthelmintic activity of these compounds was evaluated through the inhibition of egg hatch assay (EHA) and larval motility assay (LMA). The cytotoxic action was verified through the employing of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and propidium iodide (PI) assay. Significant reduction in the egg-hatching inhibition percentual ( $p < 0.05$ ) was observed only in the treatments with aescin (99%) and digitonin (45%). The  $EC_{50}$  and  $EC_{90}$  of aescin were 0.67 and 0.79 mg/mL, respectively. In the LMA test, the compounds which significantly reduced the larval motility ( $p < 0.05$ ) were digitonin with 95% ( $EC_{50} = 0.03$  mg/mL and  $EC_{90} = 0.49$  mg/mL) and the hecogenin acetate with 75%. The sapogenins from digitonin and aescin did present low ovicidal (3 and 8%) and larvicidal (2 e 2%) activities, respectively. All the flavonoids showed a low ovicidal (4 to 20%) and larvicidal (10 to 26%) effect. Only the aescin and digitonin showed anthelmintic efficacy that was equal to or higher than 95% and, as such, were evaluated on their cytotoxicity; both showed low toxicity in the PI test, where a high percentage of whole cells 94% and 96%, for was observed aescin and digitonin, in the highest utilized concentration (0.03 mg/mL), respectively. In the MTT assay, these saponins showed cytotoxicity, with only 8% of the viable cells remaining after exposure to aescin in the highest concentration (0.045 mg/mL), with  $IC_{50} = 0.20$  mg/mL; and 6% of the viable cells remaining after exposure to digitonin in the highest concentration (0.083 mg/mL) with  $IC_{50} = 0.0074$  mg/mL. The results show that the aescin and digitonin have a pronounced *in vitro* anthelmintic effect over gastrointestinal nematodes of goats, and that the presence of sugar chains, bound to the core of these saponins, increased this pharmacological effect.

**Keywords:** sapogenin, anthelmintic, aglycone, sugar chains, toxicity

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
<b>3 HIPOTESE.....</b>	<b>15</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
4.1 Parasitoses gastrintestinais de caprinos.....	15
4.2 Plantas com atividade anti-helmíntica em pequenos ruminantes.....	18
4.3 Metabolitos secundários de plantas.....	19
4.3.1 Saponinas.....	20
4.3.2 Flavonoides .....	27
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
5.1 Obtenção das saponinas e sapogeninas .....	30
5.2 Obtenção dos flavonoides .....	32
5.3 Avaliação anti-helmíntica <i>in vitro</i> .....	33
5.3.1 Ensaio de eclosão de ovos .....	34
5.3.2 Ensaio de motilidade larvar .....	34
5.4 Avaliação de citotóxica .....	34
5.4.1 Cultivos de células Vero.....	35
5.4.2 Ensaio de viabilidade celular.....	35
5.4.3 Ensaio de integridade da membrana celular .....	36
5.5 Análise estatística.....	37

<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
6.1	Obtenção das sapogeninas.....	37
6.2	Avaliação anti-helmíntica <i>in vitro</i> .....	39
6.2.1	Atividade da inibição de eclosão ovos .....	39
6.2.2	Atividade da motilidade larvar .....	41
6.3	Avaliação de citotóxica .....	43
6.3.1	Viabilidade celular .....	43
6.3.2	Integridade de membrana celular .....	44
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura tem se consolidado na região Nordeste do Brasil, com um efetivo de 8,9 milhões de cabeças, representando 92.7 % do rebanho caprino nacional. O Estado da Bahia é considerado o maior detentor deste rebanho, com uma participação de 27% (IBGE, 2015). A expansão desta atividade pecuária é, no entanto, comprometida por fatores relacionados ao manejo inadequado, propiciando a ocorrência de doenças como as nematodioses gastrintestinais (ALENCAR et al., 2010). Estas parasitoses causam retardo do crescimento, redução da conversão alimentar, diminuição da qualidade e rendimento da carcaça, baixa produção de leite e alterações reprodutivas do rebanho (VILELA et al., 2012).

Dentre os principais nematódeos gastrointestinais que acometem pequenos ruminantes no Nordeste brasileiro, destaca-se o *Haemonchus contortus*, caracterizado por sua elevada prevalência associada ao hematofagismo, alta patogenicidade e capacidade de proliferação (ANGULO-CUBILLÁN et al., 2010; COSTA et al., 2011).

O método de controle mais utilizado para estas nematodioses é o emprego de anti-helmínticos comerciais. Entretanto, este método tem sido limitado pelos elevados níveis de resistência dos parasitos a estes produtos (SINGH et al., 2016), além de provocar prejuízos ambientais e de saúde pública (COOPER et al., 2011). A utilização de extratos e compostos isolados de plantas tem sido objeto de investigação crescente no tratamento antiparasitário (HOSTE e TORRES-ACOSTA, 2011).

As saponinas e os flavonoides, são metabólitos secundários de plantas, que têm sido investigados quanto às suas propriedades farmacológicas; Estes compostos foram identificados em diversas espécies vegetais, incluindo *Ziziphus joazeiro* (Juazeiro) (GOMES et al., 2016), *Agave sisalana* (Sisal) (SANTOS et al., 2015), *Bowdichia virgilioides* (Sucupira-preta) (LEITE et al., 2014) e *Astronium graveolens* (aroeirão) (HERNÁNDEZ et al., 2014). Atividade antiparasitária atribuída a estes compostos foram evidenciadas nestas espécies vegetais.

Estudos prévios realizados por Botura et al. (2013) e Gomes et al. (2016) demonstraram que frações ricas em saponinas esteroidais e triterpênicas obtidas de extratos da *Agave sisalana* e *Ziziphus joazeiro* apresentaram atividade ovicida e larvicida, respectivamente. A presença de flavonóides em extratos de plantas também tem sido

relacionado à atividade antiparasitária. Santos et al. (2017) correlacionaram a atividade anti-helmíntica do extrato de acetato de etila de *Digitaria insularis* à presença de flavonas (tricina e diosmetina) neste extrato. E a atividade sobre as larvas do *Aedes aegyptis*, também já foram atribuídas à presença de flavonóides no extrato etanólico de *Bowdichia virgilioides* (BEZERRA-SILVA et al., 2015).

Diferenças na atividade biológica entre saponinas (moléculas contendo glicona ligada ao núcleo) e sapogeninas (núcleos de saponinas sem glicona) têm sido descritas para atividade anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (YE et al., 2013). Segundo Wang et al. (2007), o tipo de aglicona, o número e composição das cadeias de açúcar e seu sítio de ligação nas saponinas podem estar relacionados as atividades biológicas destes compostos.

A escassez de informações sobre a atividade anti-helmíntica de saponinas e flavonoides isolados de plantas, e diferenças na efetividade em função da sua composição estrutural das saponinas justificou a realização deste estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliação a atividade anti-helmíntica *in vitro* de saponinas (escina e digitonina), e seus respectivos aglicona (sapogeninas); sapogenina acetilada (acetato de hecogenina) e flavonoides (catequina, hesperedina, isocordoína, mistura contendo isocordoína e cordoína, e dímero de chalcona) sobre nematoides gastrintestinais de caprinos, bem como, investigar a toxicidade em culturas de células Vero.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obtenção das sapogeninas a partir da hidrólise das saponinas escina e digitonina respectivamente, e avaliação do perfil químico destes compostos.

- Avaliar, *in vitro*, a atividade anti-helmíntica de saponinas (escina e digitonina), e suas respectivas agliconas; acetato de hecogenina (sapogenina acetilada) e flavonoides (catequina, hesperedina, isocordoína, mistura de isocordoína e cordoína, e dímero de chalcona) sobre nematoides gastrintestinais, em ensaios de inibição da eclosão de ovos e motilidade larvar.
- Avaliação *in vitro* da toxicidade em cultivos de célula Vero das saponinas, sapogeninas e/ou flavonoides que revelaram atividade anti-helmíntica.

### **3 HIPOTESE**

As saponinas (escina e digitonina), a sapogenina acetilada (acetato de hecogenina) e os flavonoides (hesperedina, catequina, isocordoína, mistura de isocordoína e cordoína, e dímero de chalcona) são eficazes no tratamento *in vitro* contra nematoides gastrintestinais de caprinos.

### **4 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **4.1 Parasitoses gastrintestinais de caprinos**

O rebanho caprino brasileiro concentra-se na região nordeste, com destaque para o Estado da Bahia, detentor do maior número de animais (IBGE, 2015). Apesar da grande importância sócio-econômica da caprinocultura, as condições sanitárias inadequadas desta atividade agropecuária, estão associadas a ocorrência dos parasitos gastrointestinais, responsáveis por significativos prejuízos econômicos na criação de pequenos ruminantes devido a redução da produtividade animal (HOSTE e TORRES-ACOSTA, 2011; VILELA et al., 2012).

No Nordeste brasileiro as nematodioses gastrintestinais em caprinos, ocorre mais frequentemente entre o final do período de chuvas e o início do período seco (COSTA et al., 2011; RIET-CORREA et al., 2013). As infecções naturais por nematoides são mistas

e geralmente causadas pelas espécies *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongylus papillosus* e *Oesophagostomum colubianum*. Estes parasitos são de maior importância econômica na produção de pequenos ruminantes (COSTA et al., 2011; VIEIRA et al., 2014), contudo, a alta frequência e patogenicidade faz do *Haemonchus contortus* a espécie de maior relevância nesta região do Brasil (ANGULO-CUBILLÁN et al., 2010; COSTA et al., 2011).

O *Haemonchus contortus* tem ação hematófaga e a alta infecção cursa com hipoproteinemia severa, expressa clinicamente por edema submandibular nos caprinos e letargia (RIET-CORREA et al., 2006). Os grupos mais acometidos por *H. contortus* são os animais jovens imuno incompetentes, adultos com imunidade comprometida por outras enfermidades, ou aqueles indivíduos expostos a níveis elevados de infecção por este parasito (ZAJAC, 2006).

Os nematoides da família Trichostrongylidae apresentam ciclo biológico direto, consistindo em uma fase de vida livre e outra parasitária no hospedeiro. Inicialmente há a eliminação dos ovos nas fezes do hospedeiro, no ambiente, tornam-se embrionados, eclodem e liberam as larvas no estágio L1, evoluindo para L2 e em seguida para o estágio infectante (L3). Ocorre a migração da L3 do bolo fecal para pastagem, pela qual o hospedeiro se infecta por ingestão. Dentro do organismo do animal, a larva infectante migra para o abomaso ou intestino, invade a mucosa e evolui para a fase L4 e depois a L5 (parasito adulto). Na forma adulta, há a cópula e liberação dos ovos nas fezes do animal, reiniciando o ciclo (TAYLOR et al., 2010). Geralmente todo o ciclo biológico decorre aproximadamente três semanas, desde infecção do animal até a ovopostura (RIET-CORREA et al., 2006).

No nordeste brasileiro, as helmintoses em pequenos ruminantes são intensificadas por fatores como: a capacidade do parasito de se estabelecer e multiplicar em ambiente de clima tropical (VIGNAU et al., 2005; VIEIRA et al., 2014), fatores de resistência genética dos hospedeiros aos parasitos (BRESSANI et al., 2014; ZVINOROVA et al., 2016), tipo de resposta imunológica dos hospedeiros (NEVES et al., 2014) e características intrínsecas ao animal, como: raça, idade, sexo e higidez (BURKE et al., 2009; BATISTA et al., 2014). Batista et al. (2014) avaliaram entre janeiro de 2009 e dezembro de 2011, em Teresina, a sensibilidade a parasitos gastrointestinais de matrizes caprinas Anglo Nubiano em diferentes estágios fisiológicos (lactantes e não lactantes) e

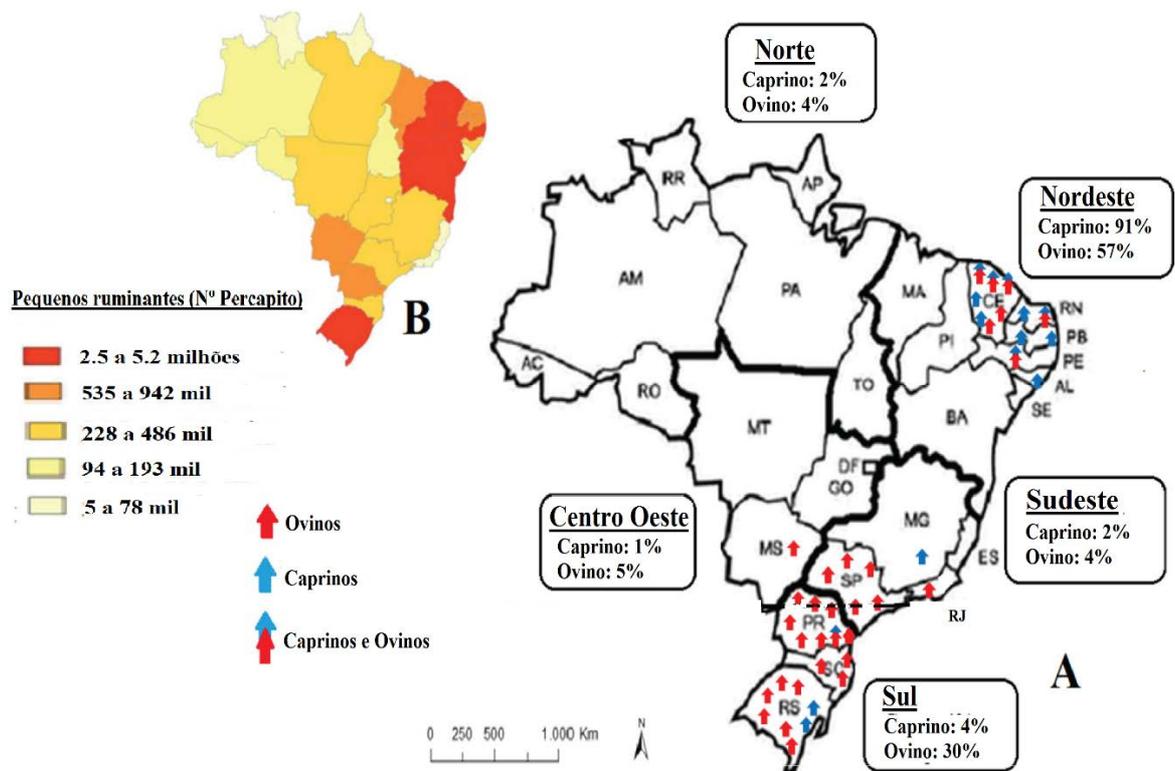
de idades (faixa média: 2.2 anos cabras novas, 4.4 anos intermediárias e 7.2 anos cabras velhas), e observaram o estado imunológico das cabras em relação a contagem de ovos por grama de fezes (OPG). As cabras lactantes apresentaram maior contagem nas três faixas etárias, havendo uma relação direta entre a quantidade de ovos e a elevação da idade. Neste mesmo estudo foi observado que nos períodos de maior umidade, o índice de infecções pelos gêneros *Haemonchus* e *Trichostrongylus* foi aumentado.

O controle dos parasitos gastrintestinais é realizado quase exclusivamente com administração de anti-helmínticos comerciais. O uso contínuo e inadequado desses produtos tem conduzido a resistência destes parasitos (VIEIRA, 2005; BICHUETTE et al., 2015), reduzindo as alternativas químicas eficazes no controle dos nematoides (SALGADO e SANTOS, 2016), especialmente do *H. contortus* (COSTA et al., 2011). A resistência aos compostos químicos é desenvolvida por uma evolução patógeno-hospedeiro, em que o parasito é exposto a doses e frequências de tratamento inadequado, havendo a seleção dos parasitos. Esta população passa a se reproduzir, mantendo os indivíduos mais resistentes, principalmente naqueles rebanhos em que estas doses não são estabelecidas adequadamente (ZVINOROVA et al., 2016).

Salgado e Santos (2016) revisaram os estudos realizados no Brasil sobre resistência dos nematoides a diferentes drogas (benzimidazol, imidazotiazol, lactona macrocíclica e nitrofenol) em caprinos e ovinos, e observaram alta resistência nas principais regiões de criação, com percentual de resistência de 91% em nematoides de caprinos na região nordeste (Fig. 1). Segundo estes autores, os dados sobre resistência em localidades do Estado da Bahia ainda são escassos. No entanto, o mapeamento da resistência a compostos anti-helmínticos (albendazol, ivermectina, levamisol, moxidectina e closantes) realizada por Borges et al. (2015) no bioma da caatinga e da mata atlântica baiana, demonstraram elevada resistência de *Haemonchus sp.* e *Trichostrongylus sp.* em caprinos.

Além da ocorrência de resistência, prejuízos ambientais e de saúde pública também são observados em decorrência da presença de resíduos no meio ambiente e em produtos de origem animal (carne e leite) (COOPER et al., 2011). Estudos em busca do desenvolvimento de novas estratégias de controle desses parasitos, incluindo os compostos isolados de plantas, têm sido intensivamente conduzidos.

**Figura 1** - Distribuição da resistência anti-helmíntica em relação ao rebanho de pequenos ruminantes no Brasil.



(A) As setas indicam pesquisas sobre a resistência anti-helmíntica determinada pelo teste de redução da contagem de ovos nas fezes em pequenos ruminantes no Brasil, e porcentagem dos caprinos e ovinos resistentes por região. (B) Rebanhos de pequenos ruminantes no Brasil, por estado, em 2013. Fonte: Elaborado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA (2014) com base em dados publicados pelo IBGE (2013). \*Total de cabras no Brasil: (8,779,213 cabeças) e de ovelhas: (17,290,519 cabeças), do IBGE (2013). **Fonte:** SALGADO E SANTOS, 2016

#### 4.2 Plantas com atividade anti-helmíntica em pequenos ruminantes

No Brasil, os produtos originários de plantas são frequentemente utilizados empiricamente na terapêutica de animais e humanos, principalmente devido a biodiversidade da flora brasileira. Diversas plantas vêm sendo empregadas por produtores rurais para o tratamento de enfermidades, incluindo as parasitoses (NUNES-PINHEIRO et al., 2003; TORRES-ACOSTA e HOSTE, 2008; TORRES-ACOSTA et al., 2012). O uso de plantas medicinais contra parasitos é antigo, e o interesse por métodos naturais de controle tem aumentado e contribuído para os estudos sobre a redução dos efeitos

adversos e resistência a compostos químicos comerciais (ATHANASIADOU et al., 2007; DOMINGUES et al., 2013).

Plantas adaptadas ao clima e solo das regiões brasileiras são investigadas quanto às suas propriedades farmacológicas (ROQUE et al., 2010; OLIVEIRA e MENINI NETO, 2012). Algumas espécies como *Ananas comosus* (abacaxi), *Allium sativum*(alho), *Chenopodium ambrosioides* (mastruz), *Cymbopogon citratus* (Capim cidreira), *Mangifera indica* (Manga), *Musa* spp. (Banana) e *Oryza latifolia*(capim arroz), foram amplamente estudadas através de testes *in vitro* e/ou *in vivo*, apresentando eficácia no controle de nematoides gastrintestinais. ( NERY et al., 2009; FONSECA et al., 2014 ).

Ao avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro*, do extrato aquoso e etanólico da *Artemisia campestre* sobre *H. contortus*, Akkari et al. (2014) obtiveram 100% de inibição do ovo na concentração de 2 mg/mL, em ambos os extratos. O extrato etanólico foi mais eficaz por apresentar menor concentração efetiva de 50% ( $CE_{50} = 0.82$  mg/mL) em relação ao extrato aquoso ( $CE_{50} = 1.00$  mg / mL). Os autores também avaliaram a eficácia dos extratos no parasita adulto nos períodos de 8 e 24 horas, e observaram que na maior concentração testada (2mg/mL), houve inibição de 91.3 e 100% (extrato etanólico) e de 3.22 e 70.96% (extrato aquoso), respectivamente. O estudo do perfil químico destes extratos revelou a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides.

Segundo Torres et al. (2014), as plantas possuem vasta quantidade de compostos bioativos que devem ser explorados e testados como uma alternativa para o controle de parasitos. Desta forma, os produtos oriundos de plantas constituem uma importante fonte de matéria prima de compostos químicos para obtenção de drogas potencialmente mais ativas e mais seguras (RATES, 2001). Com isso, estudos sobre atividades biológicas realizados acerca dos metabolitos presentes em plantas e seu isolamento, tornaram-se mais expressivos.

#### 4.3 Metabolitos secundários de plantas

Atividades farmacológicas de plantas podem ser atribuídas de um ou mais compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário do vegetal. As plantas apresentam em sua constituição uma variedade de metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloides, cumarinas, lignoides, triterpenos, saponinas, polifenóis e taninos

(SANTOS, 2010), que podem estar relacionados com diferentes efeitos biológicos, incluindo anti-helmíntico.

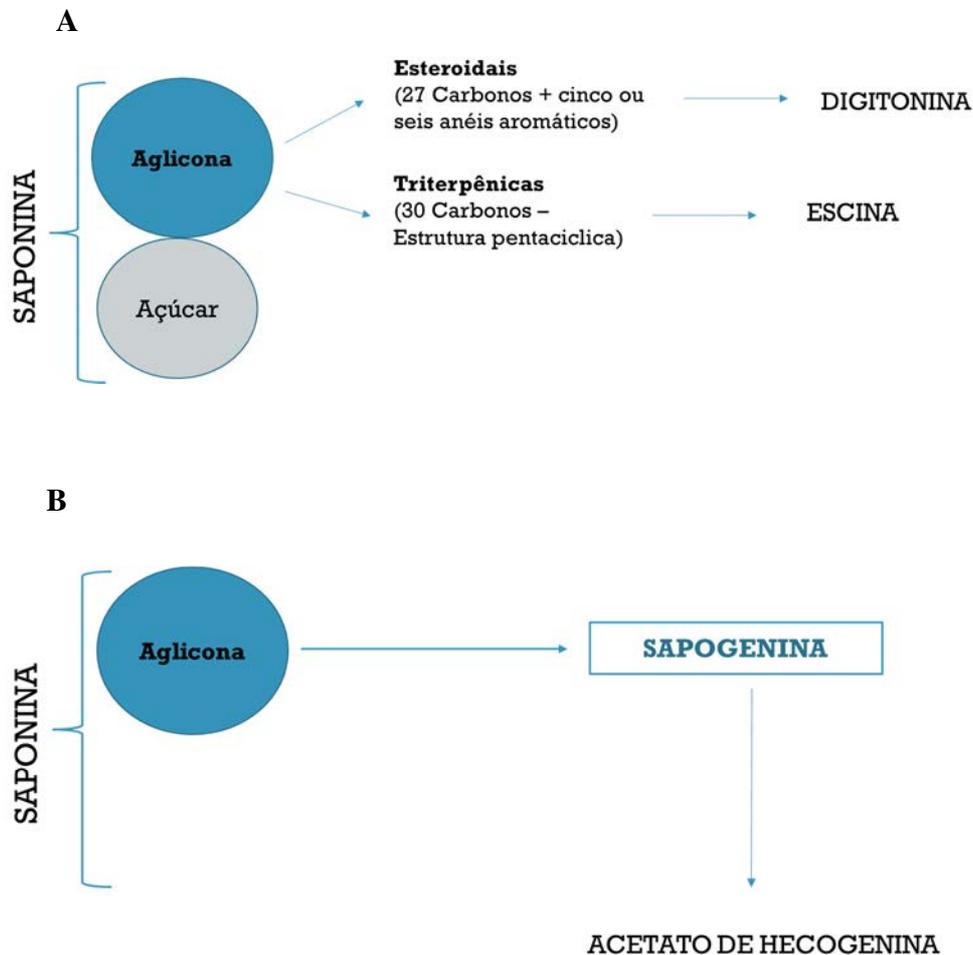
Dentre estes constituintes químicos, as saponinas e os flavonoides são importantes metabólitos secundários encontrados em diversas espécies vegetais, incluindo *Astronium graveolens* (Aroeirão) (BONIFACIO et al., 2015), *Agave sisalana* (Sisal) (SANTOS et al., 2015) e *Bowdichia virgilioides* (Sucupira-preta) (LEITE et al., 2014). Atividades antiparasitária atribuídas a estes compostos foram identificadas nas duas últimas espécies vegetais supracitadas, principalmente ações ovicida e larvicida sobre nematoides gastrointestinal de caprinos para o Sisal e, sobre as larvas do *Aedes aegypti* para Sucupira-preta (SILVA et al., 2007; BOTURA et al., 2013; BEZERRA-SILVA et al., 2015). Investigações sobre a correlação entre estas atividades farmacológicas e os componentes químicos isolados dessas classes de metabólitos secundários são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos fármacos.

#### 4.3.1 Saponinas

As saponinas são moléculas compostas por uma porção hidrofílica (açúcar) e outra hidrofóbica (aglicona), ligadas por interações glicosídicas, Fig. 2-A. Quando removido os açúcares, são denominadas de sapogenina e esta separação ocorre através da hidrólise ácida ou básica (SCHENKEL et al., 2010; SIDANA et al., 2016), Fig. 2-B. A complexidade estrutural da saponina surge da variabilidade da estrutura da aglicona, da natureza das cadeias laterais e da posição de fixação da glicona-aglicona (DAS et al., 2012).

A classificação das saponinas pode ser feita de acordo com o núcleo fundamental da aglicona, denominados de saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas (SCHENKEL et al., 2010). As saponinas esteroidais possuem 27 carbonos em seu esqueleto com cinco ou seis anéis aromáticos, classificados como: furostano e espirostano, respectivamente. Enquanto que os triterpenóides apresentam 30 carbonos e sua estrutura é pentacíclica (SPARG et al., 2004; VINCKEN et al., 2007), Fig. 2-A.

**Figura 2** – Esquema de classificação estrutural das saponinas, (A) quanto a aglicona e (B) ausência da cadeia de açúcar



Outra classificação desse grupo de compostos químicos, refere-se ao número de cadeias de açúcar ligada a aglicona (SCHENKEL et al., 2010). As saponinas apresentam um número variável de monossacarídeos ligados entre si, em cadeia linear ou ramificada. Os principais monossacarídeos encontrados são D-glicose, D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-frutose e os ácidos glicurônico e galacturônico. As ligações interglicosídicas podem ocorrer na forma  $\alpha$  ou  $\beta$  e os monossacarídeos podem estar na forma de piranose ou furanose (SCHENKEL et al., 2010). Quando a aglicona está ligada a um glicosídeo é denominado de saponinas monodesmosídica, enquanto que os compostos formados por duas cadeias de açúcares, bidesmosídicas (AGRAWAL et al., 1995).

A distribuição e ocorrência das saponinas esteroidais e triterpênicas são diferentes no reino vegetal. As saponinas esteroidais são encontradas em plantas monocotiledôneas, principalmente nas famílias Liliaceae, Dioscoreaceae, Solanaceae e Agavaceae; as saponinas triterpênicas são distribuídas predominantemente em dicotiledôneas, incluindo as famílias Sapindaceae, Hippocastanaceae, Polygalaceae, Caryophyllaceae, Primulaceae e Araliaceae (SCHENKEL et al., 2010).

Atividades biológicas de plantas das famílias Dioscoreaceae, Asparagaceae, Amaryllidaceae, Solanaceae, Liliaceae e Agavaceae, incluindo ações inseticida (SANTIAGO et al., 2005; BAGAVAN et al., 2008), moluscicida (GARCES e LOPEZ, 1996), antibacteriana (DOUGHARI e SUNDAY, 2008), antifúngica (BONIFÁCIO et al., 2015), antiviral (FRANCIS et al., 2002; CHEN et al., 2015), anti-carcinogênica e citotóxica (RAO e SUNG, 2009), e anti-helmíntica (DOLIGALSKA et al., 2011; BOTURA et al., 2013) tem sido atribuídas aos compostos saponínicos.

Gomes et al. (2016) avaliaram a atividade anti-helmíntica *in vitro* da fração de saponinas de *Ziziphus joazeiro* sobre nematoides de caprinos e observaram elevada inibição na eclosão de ovos. Esta atividade foi atribuída à presença de dois compostos saponínicos triterpênicos: Joazeirosideo B e Lotosideo A. Resultados de estudo realizado por Botura et al. (2013) utilizando a fração saponínica de *Agave sisalana* (Sisal), revelaram eficácia larvicida (L3) de 64% sobre helmintos de caprinos, sendo este efeito antihelmíntica, relacionada à presença de saponinas esteroidais contendo o núcleo hecogenina.

As saponinas triterpênicas e esteroidais podem ter atividade em diferentes estágios dos nematoides, como observado nos estudos de Botura et al. (2013) e Gomes et al. (2016). No entanto, o mecanismo de ação das saponinas ainda não é claramente elucidado. Sugere-se que a atividade biológica destes compostos seja atribuída às características anfifílica, que pode desestabilizar a estrutura da membrana, tornando-a mais permeável, ou causando a sua lise (VINCKEN et al., 2007; SCHENKEL et al., 2010; BOTTGER et al., 2012).

A atividade das saponinas pode variar sobre as diferentes fases de desenvolvimento dos nematóides, por estes apresentarem morfologias complexas e distintas, e pela presença de proteínas e lipídios, além das glicoproteínas (P-gp) na membrana destes organismos (DOLIGALSKA et al., 2011; KOTZER, 2012).

A estrutura da membrana dos ovos de *H. contortus* é composta por três camadas: uma membrana interna formada por lipídios e proteínas, uma camada média quitinosa, e uma camada externa vitelínica (MANSFIELD et al., 1992). Estas estruturas de membranas protegem os fluidos enzimáticos responsáveis por iniciar o processo de desenvolvimento do ovo, no entanto alterações na estrutura de membrana comprometem a ação dessas enzimas podendo reduzir a taxa de eclosão (ROGERS e BROOKS, 1977; MANSFIELD et al., 1992).

A estrutura da membrana das larvas de nematoides é composta de quatro camadas: uma camada de glicano, rica em mucina; uma camada rica em lipídios; a cutícula composta de colágeno e a epiderme celular ou hipoderme. Estas camadas têm a função de proteger os nematoides da desidratação, controlar a taxa de transporte de água e soluto, e proteger contra o sistema imune do hospedeiro (KOTZER, 2012). A ação das saponinas sobre L3 pode alterar a estrutura da cutícula através da absorção dessas substâncias pela membrana, alterando o turgor, causando o rompimento e extravasamento do conteúdo interno dos nematoides (HO et al., 1990; DOLIGALSKA et al., 2011).

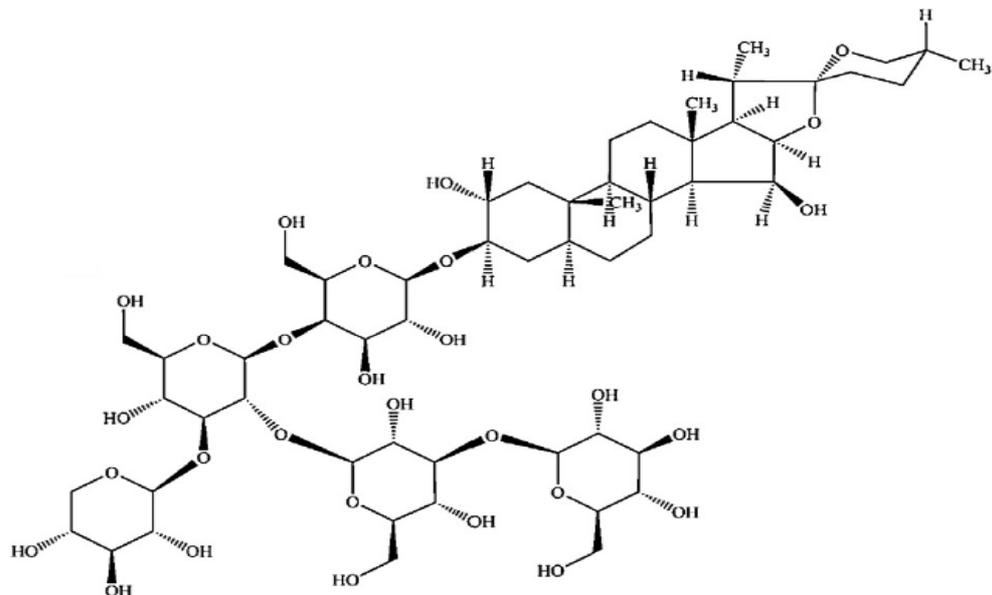
Diversas saponinas são utilizadas como componentes para ação de drogas e/ou como adjuvantes na formulação de fármacos com grande importância medicinal; dentre elas, são incluídas as saponinas escina, digitonina, glicirrizina, gisenosideo Ro e gipsogenina (SCHENKEL et al., 2010) e as sapogeninas hecogenina, sisalasaponina D, agamoside J (CERQUEIRA et al., 2012; SIDANA et al., 2016), tigogenina, e diosgeninas (SIDANA et al., 2016).

A escina (aescina) é um metabólito secundário extraído da *Aesculus hippocastanum* (Castanha-da-índia), caracterizado estruturalmente por uma mistura de saponinas triterpênicas derivadas da aglicona protoescigenina (SIRTORI, 2001). Atribuem-se a escina diversas atividades biológicas, destacando-se ação anti-inflamatória (MATSUDA et al, 1997; SIRTORI, 2001), redução de edema e aumenta o tônus venoso (SIRTORI, 2001), hepatoprotetor (KUCÇUKKURT et al., 2010; JIANG et al, 2011), tripanocida, *in vitro*, sobre *Trypanosoma evansi* (BALDISSERA et al., 2014), e ação leishmanicida, *in vitro*, sobre os macrófagos infectados por *Leishmania infantum* (VEN et al., 2011).

Outra saponina de destaque é a digitonina, identificada na semente das plantas do gênero *Digitalis*, mas comumente encontrada na espécie *Digitalis purpurea* (Dedaleira)

(KAWASAKI e NISHIOKA 1964; KEMERTELIZE e SULAKVELIDZE, 1992). Consiste em uma saponina esteroidal monodesmosídica composta por um penta-sacarídeo (Fig. 3) (KIMBERLY, 1912; KORCHOWIEC et al., 2015). Por atuar na membrana das células, a digitonina pode apresentar ações adjuvante e sinérgica, favorecendo o aumento da permeabilidade e passagem de diferentes drogas (HERRMANN e WINK, 2011; EID et al., 2012). Estudos mostraram efeito sinérgico da digitonina com quimioterápicos, aumentando a citotoxicidade em células cancerígenas (EID et al., 2012); e com alcaloides, aumentando a ação tripanocida sobre *Trypanosoma brucei brucei* (KRSTIN et al., 2015).

**Figura 3** - Estrutura química da digitonina

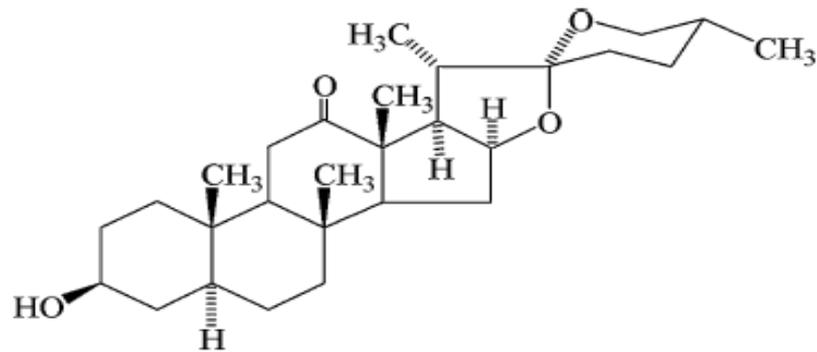


Fonte: EID et al., 2013

As saponinas também são moléculas com atividades biológicas comprovadas. A hecogenina (C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>) é um exemplo de saponina esteroidal (Fig. 4) com funções terapêuticas distintas e frequentemente encontradas em diversas espécies de plantas, principalmente na *A. sisalana*, *A. cantalae* e *A. Aurea* (QUINTANS et al., 2016; SIDANA et al., 2016). Este composto é precursor de drogas esteroidais, como corticosteroides, hormônios sexuais esteroidais e diuréticos, amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica (SCHENKEL et al., 2010; CERQUEIRA et al, 2012; BOTURA et al, 2013).

São também atribuídas à hecogenina, atividade gastroprotetora (CERQUEIRA et al., 2012) e genotoxicidade (CRUZ et al., 2016).

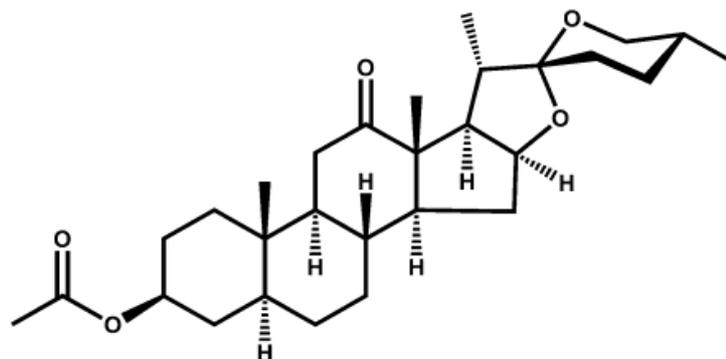
**Figura 4-** Estrutura química da hecogenina



Fonte: GHOGHARI e RAJANI, 2006

As saponinas reagem facilmente com anidrido acético em meio ácido (acetólise) fornecendo a respectiva aglicona acetilada. Neste contexto podemos citar que a saponina da *A. sisalana* (Sisal) também pode se apresentar na forma acetilada como o acetato de hecogenina (Fig. 5) (PIMENTEL et al., 2008). Este composto acetilado, apresenta atividades biológicas como anti-hiperalgesia (QUINTANS et al., 2016), anticâncer (GASPAROTTO et al., 2014) e antinociceptiva (GAMA et al., 2013).

**Figura 5** – Estrutura química do acetato de hecogenina



Fonte: GAMA et al, 2013

#### 4.3.1.1 Aspectos de toxicidade

Os principais aspectos de toxicidade das saponinas triterpênicas e esteroidais têm sido relacionados à atividade citotóxica e a hemolítica destes compostos (PODOLAK, et al., 2010; BOTTGER et al., 2012). A ação citotóxica é atribuída a estrutura química das saponinas, característica anfifílica, e da membrana alvo (WANG et al., 2007; BOTTGER et al., 2012), anteriormente citada.

Em um levantamento realizado por Sirtori (2001), os resultados de diferentes trabalhos evidenciaram que tratamentos *in vivo* com a saponina triterpênica escina, resultou em excelentes respostas clínicas sobre insuficiência crônica venosa (ICV), redução de edema e ação anti-inflamatória nos mais diferentes modelos experimentais em animais, embora tenha mostrado alta citotoxicidade, *in vitro*, sobre células de cancro renal humano (786-O e Caki-1), cujo mecanismo de ação descrito é por via intrínseca-mitocondrial (YUAN et al., 2017).

A saponina esteroidal digitonina tem ação tanto na membrana, quanto na via mitocondrial, como observado por Swiss et al. (2013), ao demonstrarem através de ensaios de integridade de membrana (ToxGlo™) e de viabilidade celular, pela determinação dos níveis de ATP, sobre linhagem celular de leucemia mielóide imortalizada humana (K562) em meio contendo glicose, a  $CI_{50}$  de 2.04 e 2.96  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

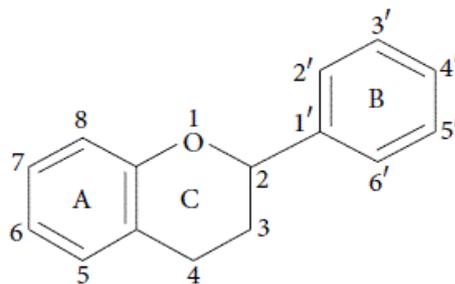
A citotoxicidade das sapogeninas pode também variar em função da sua estrutura química e da célula alvo. Resultados da avaliação de 17 sapogeninas esteroidais isoladas do extrato etanólico de *Cynanchum wilfordii*, demonstraram variação de 2.49 a  $> 50 \mu\text{M}$  na  $CI_{50}$ , entre os diferentes compostos, bem como, variação nas células alvo, com  $CI_{50}$  entre 2.49 a  $>50 \mu\text{M}$ , para HL-60; 2.89 a  $>50 \mu\text{M}$  para MCF-7; e 11.11 a  $>50 \mu\text{M}$ , para K-562 (HUANG et al., 2015). A hecogenina não se mostrou citotóxica nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  sobre células HepG2 (linhagem de células de hepatoma humano), através do teste de MTT, embora Cruz et al., (2016), tenham observado leve inviabilidade (30%) em concentração mais altas (100  $\mu\text{M}$ ).

### 4.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos que apresentam formas estruturais diversas, já havendo sido identificados, cerca de 5000 compostos diferentes (KERBOEUF et al., 2008). A estrutura química básica dos flavonoides é constituída por 15 átomos de carbonos em seu núcleo, que consiste em dois anéis benzeno (A e B) ligados através de um anel pirano heterocíclico (C), como ilustrado na figura 6 (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010; KUMAR e PANDEY, 2013). São compostos responsáveis pelo controle hormonal de vegetais, inibição de enzimas, proteção contra raios ultravioleta e visíveis, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, além de influenciar na atração dos animais para a polinização (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

As principais classes dos flavonoides segundo as características químicas e biossintéticas são: flavonas, flavonóis, flavonoides heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, di-hidroflavonóides, isoflavonóides, flavanas, neoflavonóides e biflavonóides (SUZART et al., 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Diferenciam-se estruturalmente, pelo grau de polimerização, nível de oxidação, grau de hidroxilação, presença de açúcar e na substituição do anel C. Os compostos individuais dentro de cada classe diferem na substituição dos anéis A e B (KERBOEUF et al., 2008; KUMAR e PANDEY, 2013).

**Figura 6** - Estrutura química básica dos flavonoides



**Fonte:** KUMAR e PANDEY (2013)

Os di-hidroflavonóides são representados pelas flavanonas (ou di-hidroflavonas), di-hidroflavonóis (ou flavanonóis ou 3-hidroxi-flavanona) e di-hidrochalconas (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010). Estes compostos são produtos intermediários da

biossíntese dos flavonoides, sendo hesperidina, quercetina, catequina, epicatequina, prunina, lecotina e kaempferol os mais comumente identificados (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010; KUMAR e PANDEY, 2013). Mondal et al. (2015) demonstraram atividade ovicida e larvicida do extrato etanólico de *Alternanthera sessilis* sobre *H. contortus*. Neste estudo, foi identificada a presença de ácido eládico, rutina e dois dihidroflavonóides (catequinas e quercetina). Taninos concentrados e o grupamento Flavan-3-ol (estrutura pertencente aos compostos catequina e epicatequina) (KUMAR e PANDEY, 2013), também apresentaram atividade anti-helmíntica, *in vitro*, sobre a L1 e L3 de *Ostertagia ostertagi* e *Cooperia oncophora* (DESRUES et al., 2016).

Outra classe de flavonóides de importância farmacológica tem sido referida, as chalconas apresentam-se com núcleo principal, 1,3-diarilpropano, modificado pela presença da ligação olefínica, um grupamento cetona e/ou de um grupamento hidroxila. A isomerização desses compostos pode ocorrer através da hidrólise ou pelo processo de isolamento. A importância desta classe de constituintes químicos nos vegetais é destacada pela sua ação de atrair insetos e/ou pássaros às plantas, conduzindo à polinização e perpetuação das espécies vegetais no ecossistema (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

As atividades biológicas das chalconas são relacionadas à ação bactericida (NOWAKOWSKA, 2007; KHAN et al., 2013), anti-inflamatório (NOWAKOWSKA, 2007), antiparasitária (CASTRO et al., 2015), leishmanicida (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009), terapia cardiovascular (MAHAPATRA e BHARTI, 2016), anticâncer (MAHAPATRA et al., 2015) e antinematóide sobre *Caenorhabditis elegans* (ATTAR et al., 2011), além de potencializar a ação de outros fármacos como benzimidazol. A conjugação do benzimidazoli com uma chalcona (benzimidazole-chalcona), resultou na obtenção de 26 compostos híbridos com atividade sobre *H. contortus* e os resultados obtidos da atividade larvicida (Lc100) variaram entre 0.002 e 0.0092 µg / ml; neste estudo, os quatro compostos (6a, 6g, 6w e 6y) que apresentaram melhor atividade, tiveram a substituição do anel benzimidazole nas posições 5 e / ou 6 (OUATTARA et al., 2011).

A busca de compostos bioativos na classe dos flavonóides deve-se ao fato que estes constituintes químicos apresentam de forma geral, reduzida toxicidade e baixo potencial residual no organismo vivo e no ambiente (KERBOEUF et al., 2008). Leite et al. (2014) relataram a presença de compostos flavonóides no extrato etanólico e fração hexânica das cascas e do cerne de *Bowdichia virgilioides* (Sucupira - preta), com

atividade antibacteriana. Eficácia antinociceptiva, anti-inflamatória (THOMAZZI et al, 2010), fungicida (SOUZA et al., 2016), antimicrobiana, antiviral (ORHAN et al., 2010), antiparasitária (AYERS et al., 2008; LAKSHMI et al., 2010), e larvicida contra *Aedes aegypti* (BEZERRA-SILVA et al, 2015) também já foram relatadas para flavonóides.

A atividade anti-helmíntica em caprinos da fração flavonoídica do extrato acetato de etila de *A. sisalana* foi observada por Botura et al., (2013). Neste estudo, foram obtidos altos percentuais de inibição na eclosão de ovos que variaram de 18.6 a 100% nas concentrações de 0.02 a 0.32 mg/mL. Apesar de diferentes extratos de plantas contendo flavonoides apresentarem atividade antiparasitária comprovadas, as evidências científicas que confirmem a eficácia desses compostos isolados contra helmintos ainda são escassas (KERBOEUF et al., 2008).

#### 4.3.2.1 Aspectos de toxicidade

A utilização de flavonóides na dieta tem sido associada à redução do risco de câncer. Alta atividade citotóxica sobre células cancerígenas humanas de linhagem A549 e MCF-7 foi observada 24 horas após o tratamento com o extrato de *Potellila reptans* com  $CI_{50}$  de 89 e 130  $\mu\text{g/mL}$ , e baixa a moderada atividade foi evidenciada após o tratamento com o extrato aquoso de *P. speciosa*, com  $CI_{50}$  de 705 e 710  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, quando comparando com o controle positivo doxorrubicina ( $CI_{50}$  de 22.4 e 7.8  $\mu\text{g/mL}$ ) (UYSAL et al., 2017).

Os flavonoides são considerados como compostos de baixo potencial citotóxico, embora também possam apresentar efeitos de maior ou de menor toxicidade de acordo com a estrutura química e com sua biotransformação nos diferentes sistemas orgânicos. Visto que, alguns desses compostos podem sofrer hidrólise, liberando seu núcleo (glicona), influenciando a sua biodisponibilidade, e conseqüentemente, pode aumentar e/ou diminuir sua toxicidade (KERBOEUF et al., 2008).

Resultados de pesquisas *in vitro* com culturas de células, revelaram que os flavonóides podem produzir oxigênio reativos (ROS), que atuam como "pró-oxidantes" na presença de metais redox-ativos, como cobre ou ferro e oxigênio. Estes metabolitos (ROS) podem danificar o DNA, lipídios e outras moléculas biológicas. No entanto, nos

estudos *in vivo*, os iões produto da interação redox-reativos são catalisados em reações com radicais livres, perdendo o efeito citotóxico (KERBOEUF et al., 2008).

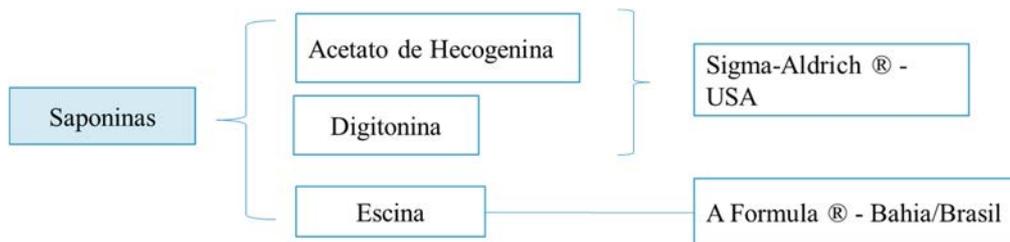
Actis-Goretta et al. (2008) ao avaliarem o efeito citotóxico de três monômeros (catequina; epicatequina e epigalocatequina), três galato monômeros (catequina galato; epicatequina galato e epigalocatequina galato) e dois dímeros de flavonoides; confirmaram que a estrutura química destes compostos pode influenciar sobre sua atividade biológica. Estes autores observaram que o dímero galato flavanol teve maior efeito citotóxicos em múltiplas linhagens celulares de câncer humano (14 linhagens testadas), que os monómeros.

Estudos sobre os flavanoide indicam que o efeito citotóxico também pode modificar com o tipo de célula alvo. Esta afirmativa foi observada por Ramos et al. (2011), ao avaliarem a ação citotóxica de três catequinas (epicatequina, epicatequina-galato e procianidina) em duas linhagens de células cancerígenas de cólon humanas, Caco-2 e SW480, demonstrando diferentes potenciais anticarcinogênicos de acordo com a linhagem de célula. Neste estudo, o tratamento de ambas linhagens celulares com epicatequina não apresentou efeito citotóxico. No entanto, o tratamento com epicatequina-galato induziu a apoptose na linhagem de célula SW480, porém foi ineficaz contra células da linhagem Caco-2; diferentemente do que ocorreu com as células SW480 expostas a procianidina, que aumentou os níveis das enzimas fosfo-AKT e fosfo-ERK, causando proliferação celular.

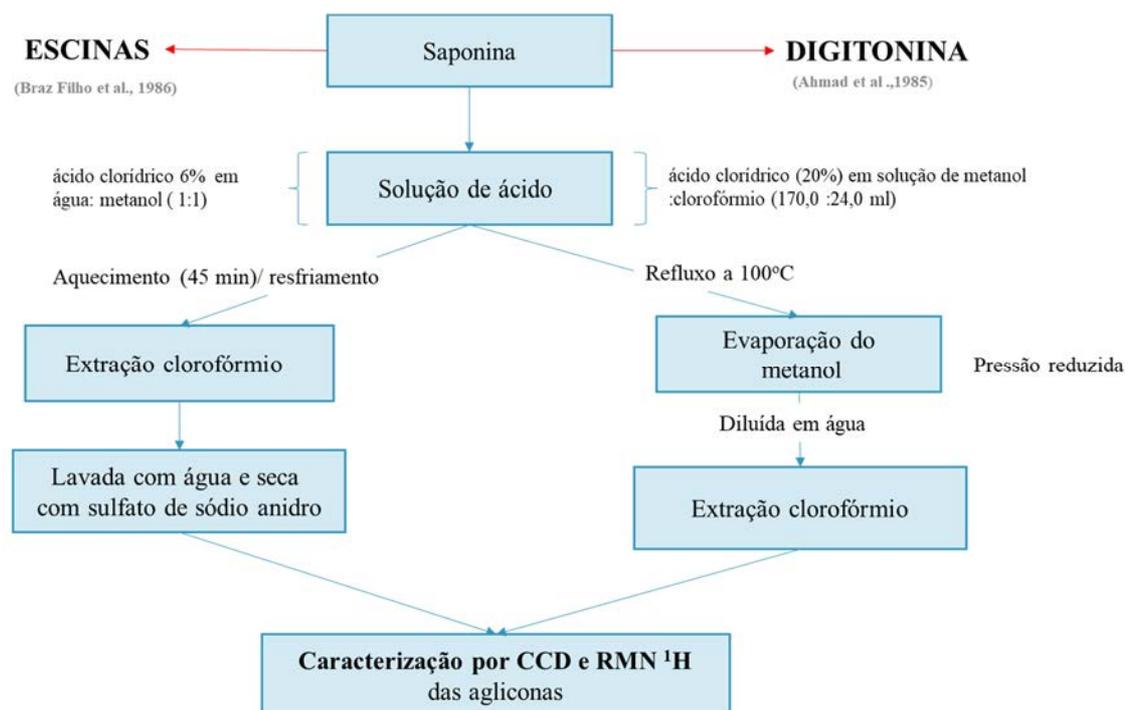
## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção das saponinas e sapogeninas

A saponina digitonina, a sapogenina acetilada, acetato de hecogenina, foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich® (USA). A escina foi adquirido comercialmente da farmácia de manipulação A Formula® (Bahia - Brasil) (Fig. 7).

**Figura 7** - Obtenção das saponinas

A escina e digitonina foram submetidas hidrólise ácida para obtenção das suas respectivas aglicona (Fig. 8). A hidrólise da escina foi realizada de acordo com Braz Filho et al. (1986). Foram utilizados 300 mg dessa saponina, para a obtenção de 231.2 mg do produto de hidrólise. A hidrólise da digitonina foi realizada segundo a metodologia descrita por Ahmad et al. (1985) modificada. Essa saponina (140 mg) foi hidrolisada em meio ácido (122.0 ml de ácido clorídrico (20%) em 194.0 ml de uma solução de metanol-clorofórmio (170.0: 24.0 ml)) sob refluxo (100°C) durante 5 horas. Após esse período, o metanol foi evaporado sob pressão reduzida. A mistura da solução ácida e a digitonina obtida foi diluída em água (72.7 ml) e extraída cinco vezes com clorofórmio. A fase clorofórmica foi coletada e evaporada, obtendo-se 47.0 mg de digitogenina.

**Figura 8** – Obtenção dos produtos de hidrólise ácida da escina e digitonina

A reação de hidrólise, das reações citadas acima, foi confirmada através da análise por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando acetato de etila como fase móvel e solução 10% de ácido sulfúrico como revelador.

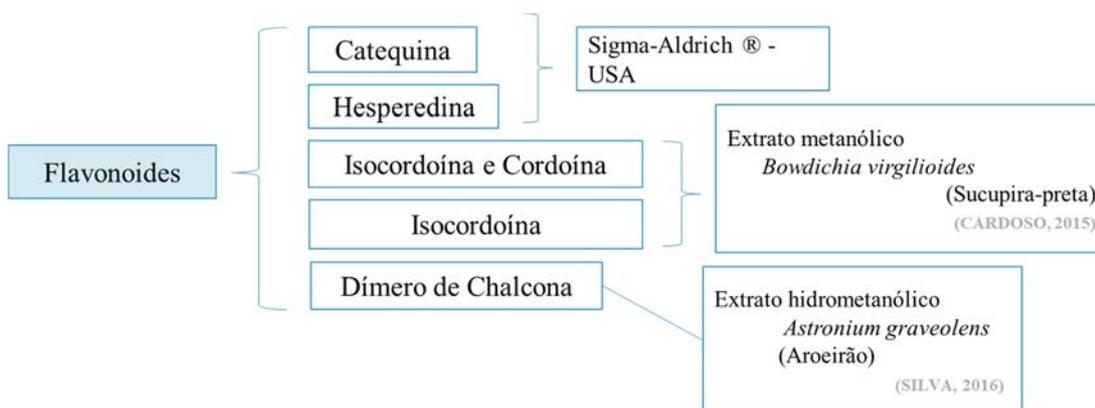
A caracterização química dessas sapogeninas foram realizadas por RMN  $^1\text{H}$  utilizando espectrômetro Bruker, modelo AC-400, operando a 400MHz, utilizando-se as seguintes solventes deuterados: metanol- $d_4$  (Escina) e clorofórmio- $d$  (Digitonina). Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna. O deslocamento químico ( $\delta$ ) foi obtido em partes por milhão (ppm).

## 5.2 Obtenção dos flavonoides

Os flavonoides catequina e hesperidina, foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich  $\text{\textcircled{R}}$ . Os flavonoides isocordoína e mistura de isocordoína e cordoína foram obtidos das raízes da planta *Bowdichia virgilioides* (Anexo 1), enquanto o dímero de chalcona foi extraído das folhas e caules da *Astronium graveolens* (Anexo 2) (Fig. 9). A seleção destas plantas foi realizada em função do amplo conteúdo de compostos fenólico, incluindo flavonóides relacionados às atividades farmacológicas já comprovadas, e a sua ampla distribuição no nordeste Brasileiro.

A extração, isolamento e identificação dos compostos flavonóides obtidos das espécies *B. virgilioides* e da *A. graveolens* foi realizado por Cardoso (2015) e Silva (2016), respectivamente, no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Bahia, e cedidos pelo Prof. Dr. Jorge Mauricio David.

**Figura 9-** Fluxograma de obtenção dos flavonoides.



### 5.3 Avaliação anti-helmíntica *in vitro*

Foram utilizadas amostras de fezes obtidas de dois caprinos adultos, fêmeas, infectados naturalmente com nematoides gastrintestinais, oriundo da Fazenda Escola de Entre Rios da Universidade Federal da Bahia e mantido no Hospital da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEVZ). Os caprinos foram mantidos a pasto, alimentado com feno, ração, forragem fresca (quando estabulados), e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados com estes animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da EMEVZ-UFBA (Protocolo nº 37/2016), Anexo 3.

A recuperação dos ovos das fezes foi realizada como descrito por Hubert e Kerbeoef (1992), utilizando 10 g de fezes homogeneizadas com água destilada e filtradas em tamis de 1 mm, 100, 75, 55 e 25 mm. Os ovos retidos no último tamis, foram coletados com água destilada e realizada centrifugação por um período de cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionada solução de cloreto de sódio saturada, seguindo-se de nova centrifugação pelo mesmo período. O sobrenadante foi filtrado no tamis de 25 µm e lavado com água destilada para a coleta dos ovos.

As suspensões de larvas infectantes foram obtidas a partir de coproculturas cultivadas em estufa B.O.D a 27°C, no período de 7 dias (UENO E GONÇALVES, 1998). As culturas de fezes indicaram a presença de 80% de infecção por *Haemonchus* spp., 15% *Oesophagostomum* spp. e 5% *Trichostrongylus* spp. Estudos anteriores demonstraram resistência desses nematódeos à ivermectina, tiabendazol e levamisol, no estado da Bahia (BORGES et al., 2015).

A determinação das concentrações das saponinas e flavonoides, há serem utilizadas, foi realizada de acordo com os resultados obtidos de estudos pilotos, iniciados com a maior concentração de 1mg/mL para os testes de inibição da eclosão de ovos (TEO) e motilidade larvar (TML). Os compostos que apresentaram eficácia de inibição igual ou superior a 95%, foram testados em diferentes concentrações: escina (0.5; 0.6; 0.7; 0.84; 1.0 mg/mL - TEO) e digitonina (0.003; 0.015; 0.06; 0.25; 1.0 mg/mL - TML). Foram preparados dois controles negativos: água destilada e Tween 80 (1%). Como controle positivo utilizou o tiabendazol (0.025mg/mL) para TEO, e levamisol (0.25 mg/mL) para TML.

### 5.3.1 Ensaio de eclosão de ovos

O ensaio de inibição da eclosão de ovos foi realizado de acordo com a metodologia preconizada por Coles et al. (1992). Para tanto, o volume da suspensão de ovos foi ajustado para uma concentração média de 100 ovos/100 µL e colocados em microplacas de 96 poços (100 ovos/100µL/poço), com adição de 7% de meio nutritivo (*Escherichia coli* liofilizada - ATCC 9637 Sigma - 70%; extrato fermentativo – 28%; Anfotericina B – 2%) para favorecer a eclosão. A preparação do meio nutritivo foi realizada conforme protocolo descrito por Chagas et al. (2011).

Nestas placas, foram adicionadas as substâncias teste (100 µL) em diferentes concentrações. Os cultivos foram incubados em estufa B.O.D. a 27° C e Umidade Relativa (UR) 80% durante 48 horas. Após esse período, acrescentou-se lugol para interromper a reação. Realizou-se então a contagem de larvas eclodidas (L1) e ovos em cada poço. O percentual de inibição da eclosão de ovos foi determinado por meio da relação: número de ovos/ (número de ovos + número de L1) x 100.

### 5.3.2 Ensaio de motilidade larvar

Para a ensaio da motilidade larvar, utilizou-se uma suspensão de larvas infectantes (L3) seguindo a metodologia descrita por Ferreira et al. (2013). A suspensão (50 larvas/100 µL) foi distribuída em microplacas de 24 poços e adicionadas 100 µL dos compostos em diferentes concentrações. As placas foram incubadas a 27°C em B.O.D., durante 24h e contadas as larvas móveis e imóveis. O movimento das larvas foi estimulado antes da contagem por meio da agitação das placas e exposição a uma fonte de luz. Esses resultados foram expressos com o percentual de larvas móveis.

## 5.4 Avaliação de citotóxica

A avaliação citotóxica foi realizada através dos ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT) e iodeto de propídio (PI), utilizando as duas saponinas (escina e a digitonina) que apresentaram eficácia anti-helmíntica igual ou acima de 95%.

#### 5.4.1 Cultivos de células Vero

Foram utilizadas células da linhagem Vero (ATCC CCL81), provenientes de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) mantidas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro fetal equino e antibióticos (100 UI/mL penicilina G, 100 mg/mL estreptomicina) a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas em frascos de cultivo com 25 cm<sup>2</sup> contendo 5 mL de meio, que foi substituído três vezes por semana. A escolha dessa linhagem celular foi realizada em função da sua ampla utilização como modelo de triagem para testes de citotoxicidade de compostos isolados de plantas, serem facilmente disponíveis e por terem sido utilizadas na avaliação de outros compostos associados a estudos anti-helmínticos de ruminantes (NCHU et al., 2011; ADAMU et al., 2013).

#### 5.4.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT) segundo Hansen et al. (1989). É um método colorimétrico baseado no princípio da conversão do MTT (coloração amarela) em cristais de formazan de cor violácea através da atividade de uma enzima mitocondrial (succinato desidrogenases) de células vivas.

As células foram distribuídas em microplacas de 96 poço, obedecendo a concentração de  $3.5 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, foi removido o meio do cultivo, e as células foram submetidas ao tratamento dos compostos (100 µl) nas concentrações de 0.011; 0.016; 0.023; 0.032; 0.045 mg/mL para escina e de 0.001; 0.003; 0.0092; 0.027; 0.083 mg/mL para digitonina, estabelecidas a partir de um teste piloto. Após 24 horas o meio de cultura contendo o tratamento foi removido e adicionado aos poços 100 µL de solução de MTT em meio RPMI (1 mg/mL). Após duas horas de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram acrescentados 100 µL/poço de um tampão de lise, contendo 20% de SDS (duodecil sulfato de sódio) e 50% de DMF (dimetilformamida) (pH=4.7), mantendo-se as placas a 37 °C por 12 horas consecutivas. A absorbância óptica foi medida utilizando leitor de placas de comprimento de onda de 405-600 nm. Os resultados foram apresentados como o percentual de

viabilidade celular (média e desvio padrão) em relação ao controle, considerado como 100%.

#### 5.4.3 Ensaio de integridade da membrana celular

A integridade de membrana foi avaliada pelo teste de iodeto de propídio (PI) segundo CHEN et al. (2015), adaptado. Este é um método fluorimétrico, baseado no princípio da impermeabilidade da membrana celular ao IP. A presença de rompimento da membrana celular, em células mortas ou em apoptose tardia, permite a passagem deste composto intercalador do DNA (IP) para o interior das células, que passam a emitir fluorescência vermelha sob microscopia de fluorescência (RIEGER et al., 2011; VERMES et al., 2000).

As células foram distribuídas em microplacas de 24 poços, obedecendo a concentração de  $3.5 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e remoção do meio do cultivo, as células foram submetidas ao tratamento com as saponinas escina e digitoninas por 24h. Foram estabelecidas três concentrações obtidas a partir da CI<sub>50</sub> do teste de MTT, com intervalo numérico fixo e semelhante ao utilizado no teste MTT. Foram utilizadas 0.013; 0.02 e 0.03 mg/mL para a escina e 0.003; 0.010 e 0.03 mg/mL para a digitonina. Como controle negativo utilizou meio de cultivo e como controle positivo Peroxido de Hidrogênio a 3%.

Após a exposição das células às saponinas, o meio de cultura contendo o tratamento foi removido e adicionado 500 µL/poço de IP na concentração de 5µg/mL, diluída em RPMI sem Soro fetal bovino. Após uma hora de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, a solução de IP foi desprezada e os poços lavados 3 vezes com PBS-glicose (0.6%). A placa foi vedada com para-filme e levada para visualização em microscópio de fluorescência invertido, capitado no comprimento de onda de 536 nm e emite a 617 nm.

Foi realizado um experimento com três replicatas. Foram selecionados nove campos aleatórios em cada replicata para imagens de cores brilhantes e coloração IP. O número total de células e o número de células IP-positivas foram contados em cada campo. Os dados foram apresentados como porcentagens de células IP-negativas (células viáveis) para realização da análise estatística.

## 5.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software GraphPadPrism® (versão 5.0 para Windows). A diferença entre grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, considerando o nível de significância  $\geq 5\%$  para a rejeição da hipótese nula. As determinações das  $CE_{50}$ ,  $CE_{90}$  (ensaios parasitológicos) e  $CI_{50}$  (teste de viabilidade celular), foram realizadas através da análise de regressão não-linear. Para os ensaios foram realizados cinco experimentos independentes com mínimo de três replicatas, exceto para o teste de integridade celular, que foi realizado um experimento em triplicata.

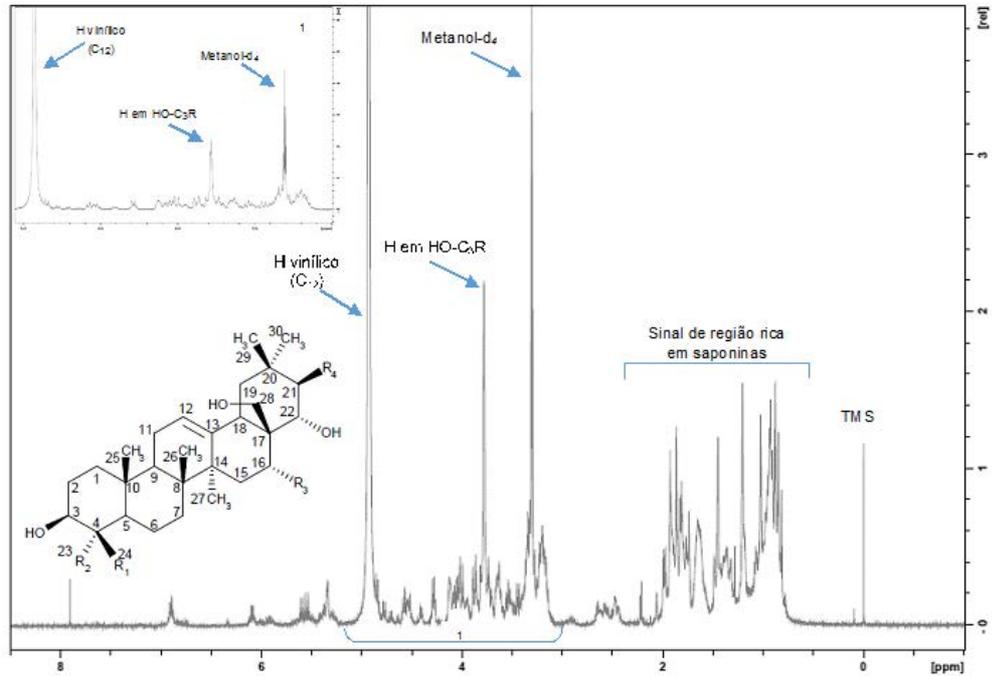
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Obtenção das sapogeninas

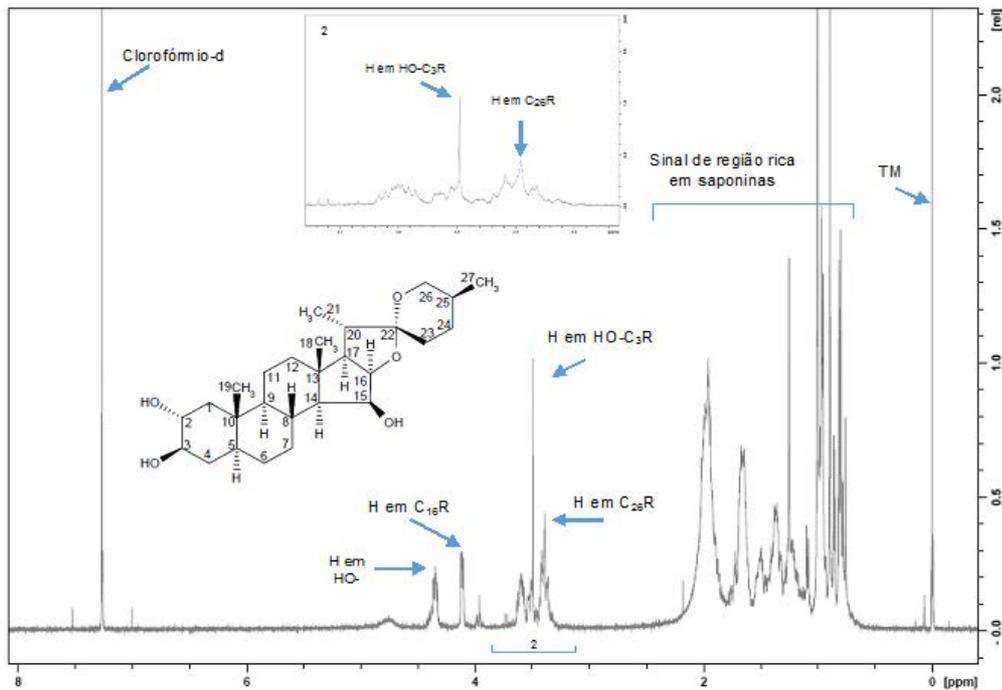
As saponinas escina e digitonina foram submetidas a hidrólise ácida e, ao final do processo, obteve-se um rendimento das sapogeninas de 77.06% e 33.57%, respectivamente (p/p).

Os espectros do RMN  $H^1$  dos produtos da hidrólise apresentaram intensos sinais na região de campo alto (0.8-3.0ppm) que são devido aos prótons metílicos e metilênicos do núcleo das agliconas das saponinas. Os sinais presentes na região de 3-5 ppm correspondem aos prótons H3 ( $\delta$  3.19 ppm) e H12 ( $\delta$  5.33 ppm) (Figura 6) e H3 ( $\delta$  3.49 ppm), H15 ( $\delta$  4.33 ppm), H16 ( $\delta$  4.11 ppm) e H26 ( $\delta$  3.49/3.37 ppm) (Figura 7) nas agliconas da escina e da digitonina, respectivamente. Os deslocamentos químicos dos solventes estão destacados nos espectros. A estrutura molecular da saponina digitonina e sua respectiva sapogenina está representada na Figura 8.

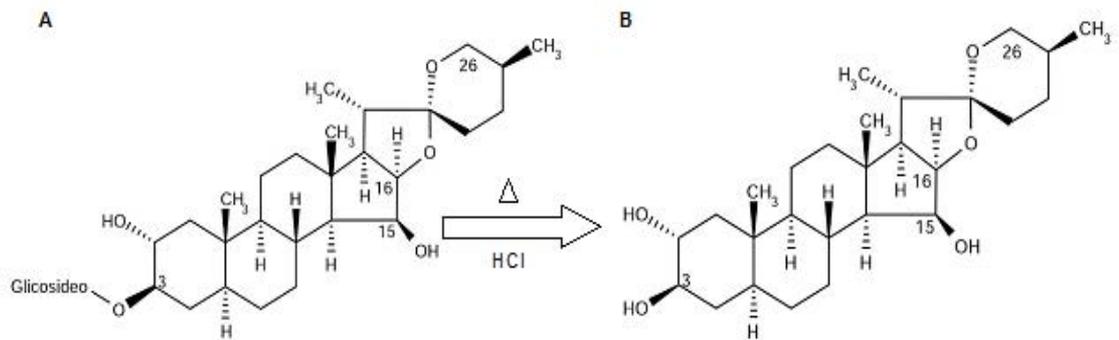
**Figura 10** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm) dos produtos da hidrólise da escina. A região ampliada (1) é referente a região de 3-5ppm.



**Figura 11** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm) da digitogenina. A região ampliada (2) é referente a região de 3-5ppm.



**Figura 12-** Estruturas químicas da digitonina (A) e da digitogenina (B).

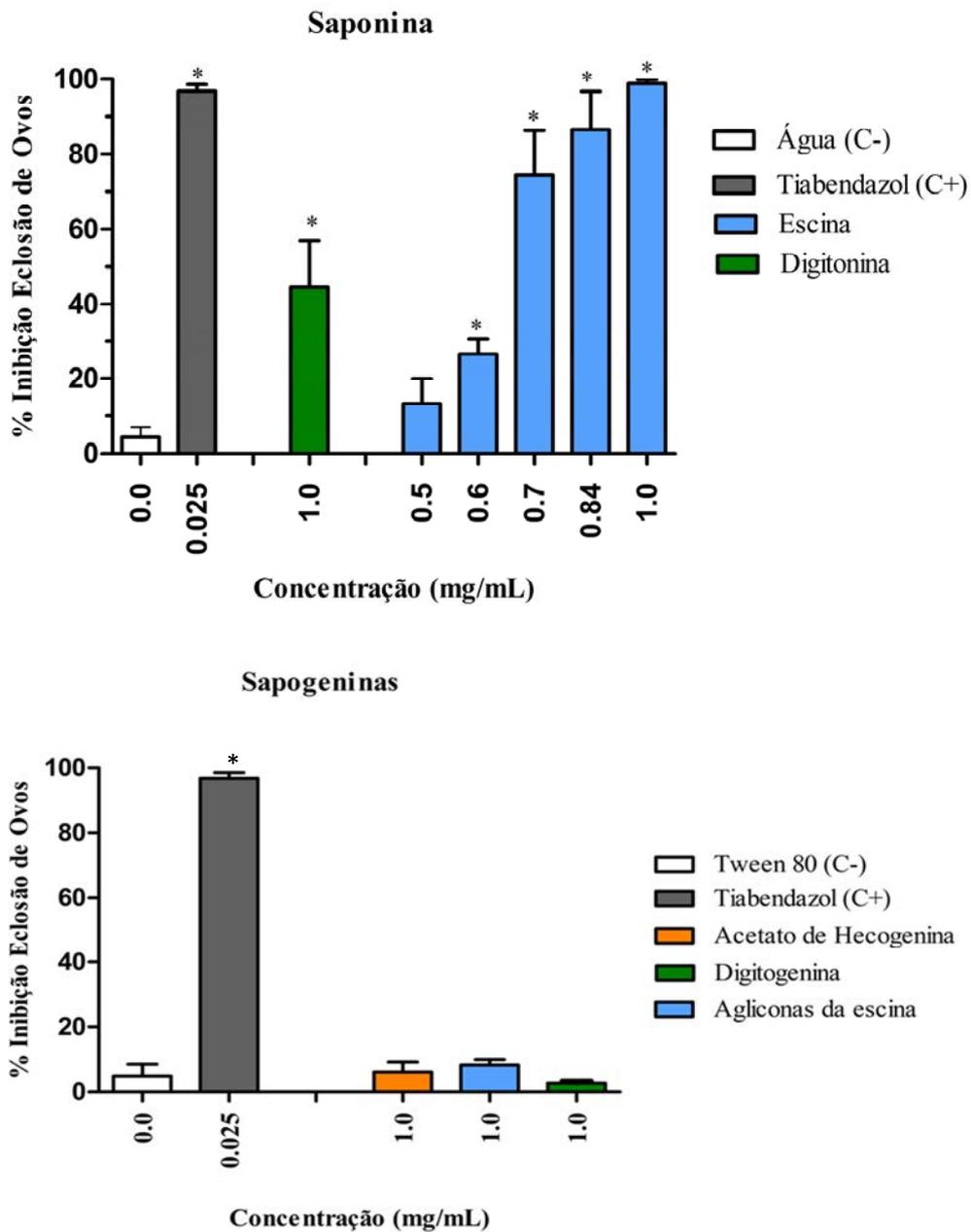


## 6.2 Avaliação anti-helmíntica *in vitro*

### 6.2.1 Atividade da inibição de eclosão ovos

As saponinas escina e digitonina inibiram significativamente ( $p < 0.05$ ) a eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos em relação ao controle negativo, embora apenas a escina ter se mostrado eficaz com percentual de inibição de eclosão em 99%,  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$  de 0.67 e 0.79 mg/mL, respectivamente. O tratamento com as duas maiores concentrações desta saponina (1.0 e 0.84 mg/mL) não diferiu ( $p > 0.05$ ) do controle positivo tiabendazol (0.025 mg/mL) (Fig. 13). As sapogeninas na forma de acetato de hecogenina, agliconas da escina; e digitogenina (aglicona da digitonina) não interferiram neste estágio do parasito, inibindo em média 6%, 8% e 3%, respectivamente.

**Figura 13** - Percentual de inibição da eclosão de ovos (média  $\pm$  desvio padrão) de nematódeos gastrintestinais tratados com saponinas e sapogeninas



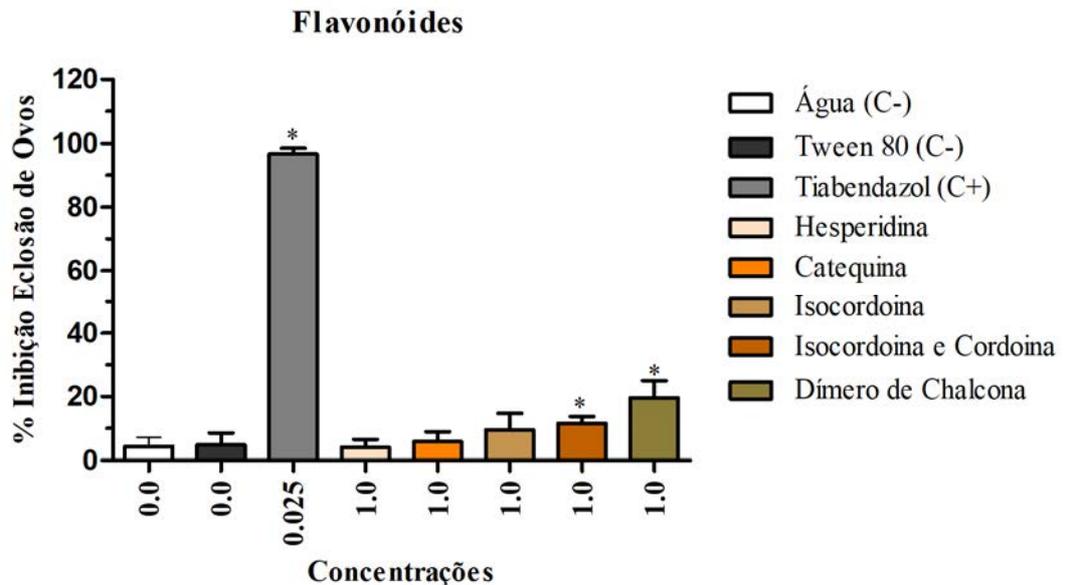
(C -) Controle Negativo; (C+) Controle Positivo

\* Diferença significativa em comparação com controle negativo ( $p < 0.05$ )

Dentre os flavonoides avaliados, apenas o dímero de chalcona e a mistura de cordoína e isocordoína promoveram redução significativa da taxa de eclosão de ovos em comparação com o controle negativo ( $p < 0.05$ ), embora com baixos percentuais de inibição, correspondentes a 4, 6, 9, 12, 20%, respectivamente, para hesperedina,

catequina, isocordoína, mistura de flavonoide (cordoína + isocordoína) e dímero de chalcona (Fig. 14).

**Figura 14** - Percentual de inibição da eclosão de ovos (média  $\pm$  desvio padrão) de nematódeos gastrintestinais tratados com flavonoides



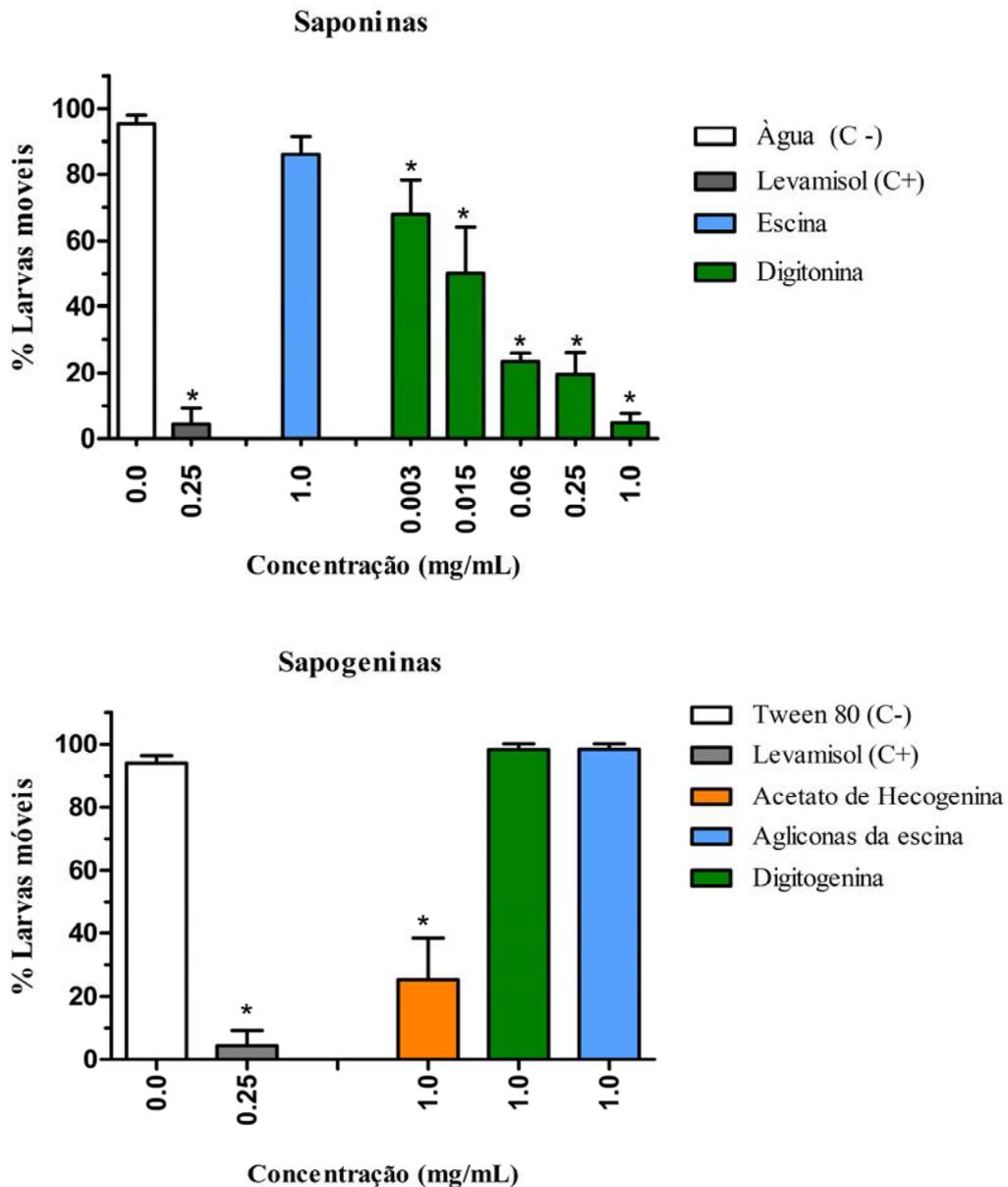
(C -) Controle Negativo; (C+) Controle Positivo

\* Diferença significativa em comparação com controle negativo ( $p < 0.05$ )

### 6.2.2 Atividade da motilidade larvar

A digitonina e o acetato de hecogenina, na concentração de 1 mg/mL, apresentaram atividade inibitória significativa sobre a motilidade de larvas L3 ( $p < 0.05$ ), com percentuais de larvas móveis de apenas 5 e 25%, respectivamente. A digitonina apresentou efeito larvicida de forma concentração-dependente, com valores da  $CE_{50}$  de 0.03mg/mL e  $CE_{90}$  de 0.49 mg/mL. Todas as concentrações testadas da digitonina foram estatisticamente diferentes do controle negativo ( $p < 0.05$ ), mas somente o grupo tratado com a maior concentração (1 mg/mL) foi igual ao controle positivo (levamisol 0.25 mg/mL). O tratamento com saponina esina e as sapogeninas digitogenina e agliconas da escina, não resultou em alteração na motilidade de larvas infectantes, cujo percentual de larvas móveis foi de 86, 98 e 98%, respectivamente (Figura 15).

**Figura 15** - Percentual de larvas móveis (média  $\pm$  desvio padrão) de nematódeos gastrintestinais no terceiro estágio após o tratamento com saponinas e sapogeninas.

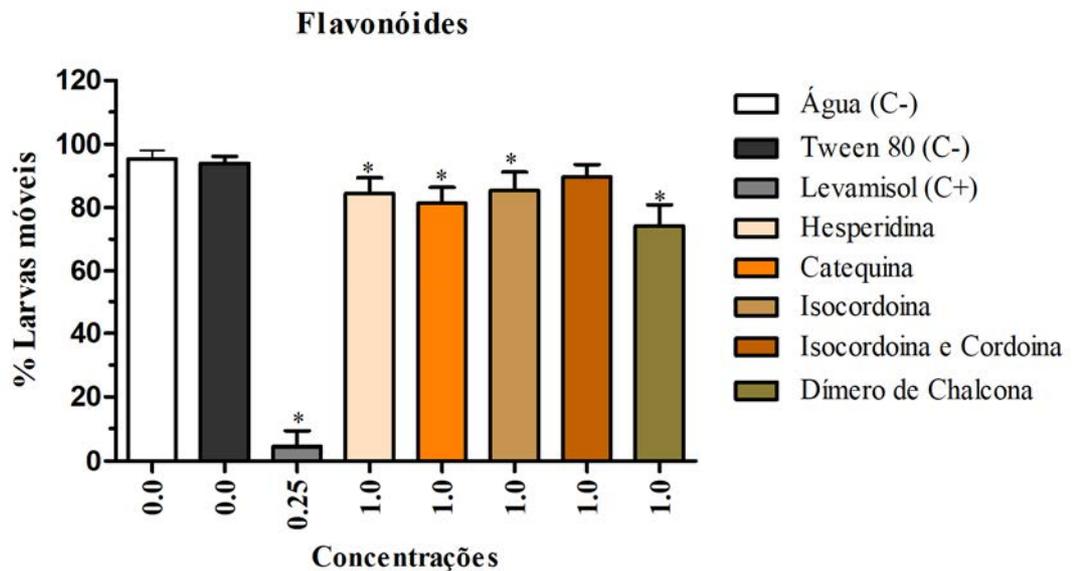


(C -) Controle Negativo; (C+) Controle Positivo

\* Diferença significativa em comparação com controle negativo ( $p < 0.05$ )

Os flavonoides demonstraram percentuais de larvas móveis (1mg/mL) de 74% (dímero de chalcona), 81% (catequina), 85% (hesperidina e isorcordoína) e 90% (mistura cordoína e isocordoína), embora tenham diferido do controle negativo, com exceção do último tratamento (Fig. 16).

**Figura 16** - Percentual de larvas móveis (média  $\pm$  desvio padrão) de nematoides gastrintestinais no terceiro estágio após o tratamento com flavonóides.



(C -) Controle Negativo; (C+) Controle Positivo

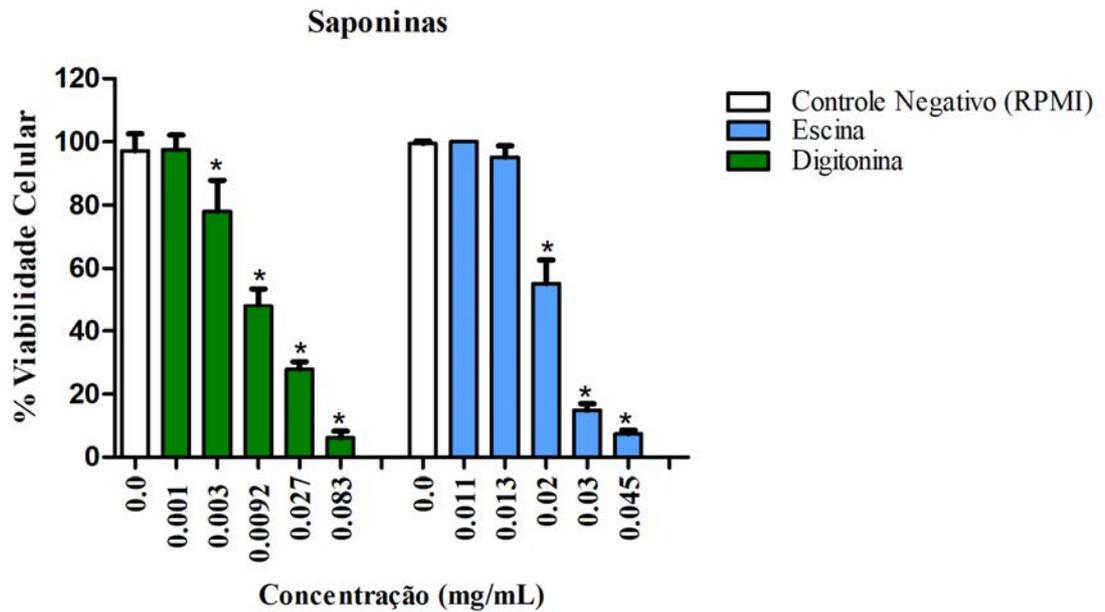
\* Diferença significativa em comparação com controle negativo ( $p < 0.05$ )

### 6.3 Avaliação de citotóxica

#### 6.3.1 Viabilidade celular

As saponinas escina e digitonina reduziram a viabilidade celular (MTT) de forma concentração-dependente ( $p < 0.05$ ). A  $CI_{50}$  da escina (0.02 mg/mL ou 18  $\mu$ M) foi aproximadamente 3 vezes maior que a digitonina, (0.0074 mg/mL ou 5.7  $\mu$ M). Os percentuais de viabilidade celular, entre a maior e menor concentração testada, variaram de 8 a 97% para a escina e 6 a 97% para digitonina (Fig. 17).

**Figura 17** - Percentual de viabilidade de células Vero (média±desvio padrão), pelo teste MTT, após tratamento escina e digitonina

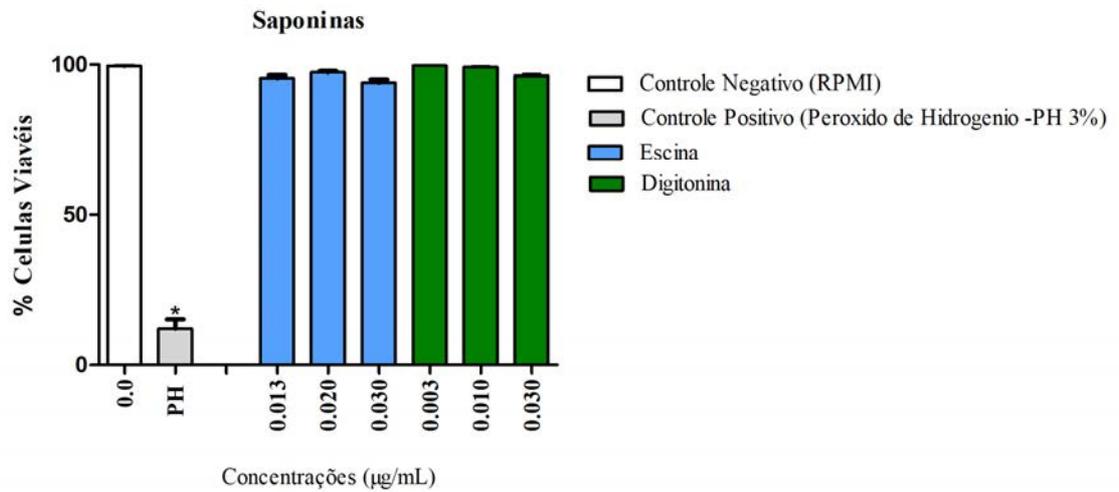


\* Diferença significativa em comparação com controle negativo ( $p < 0.05$ )

### 6.3.2 Integridade de membrana celular

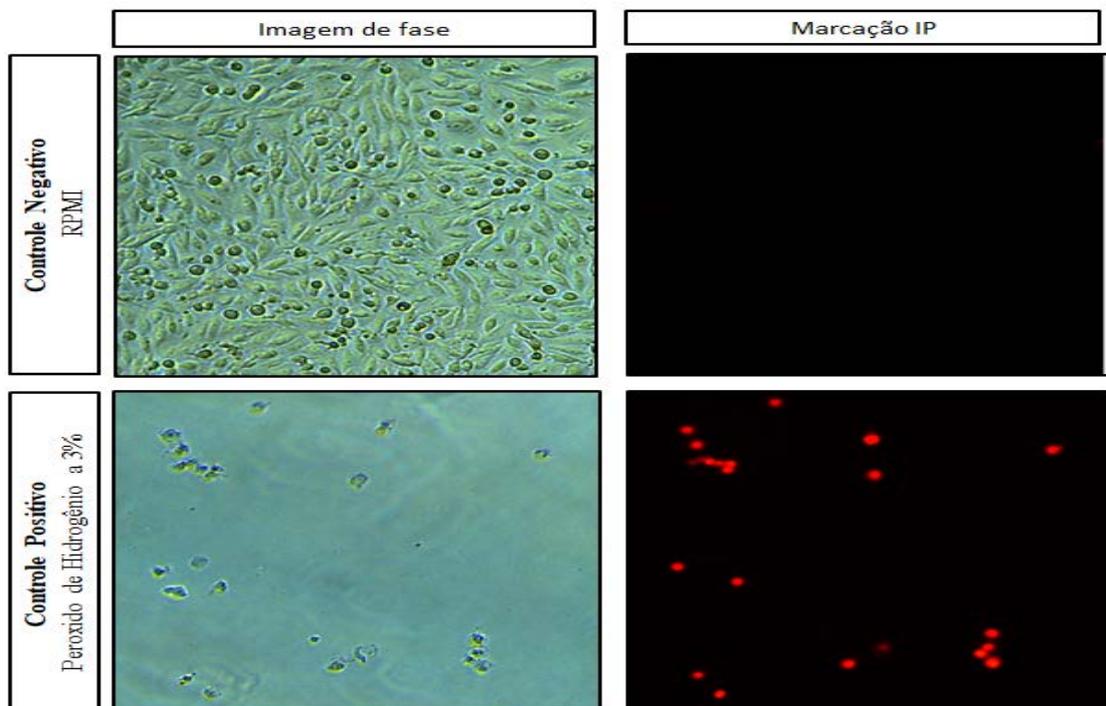
Através do teste de iodeto de propídeo (IP), observou-se que, o tratamento de células Vero com ambas as saponinas (escina ou digitonina) resultou em altos percentuais de viabilidade celular em todas as concentrações testadas, e não diferiu do grupo controle negativo. Os percentuais de viabilidade celular variaram entre 96 a 99% para digitonina e de 94 a 97% para a escina (Fig. 18); alterações na morfologia, células esféricas, e redução da confluência no tapete celular foi, no entanto, observado ao comparar os controles (Fig 19) a ambos os tratamentos (Fig. 20 e 21).

**Figura 18** - Percentual de viabilidade de células Vero (média  $\pm$  desvio padrão), pelo teste IP, após tratamento escina e digitonina

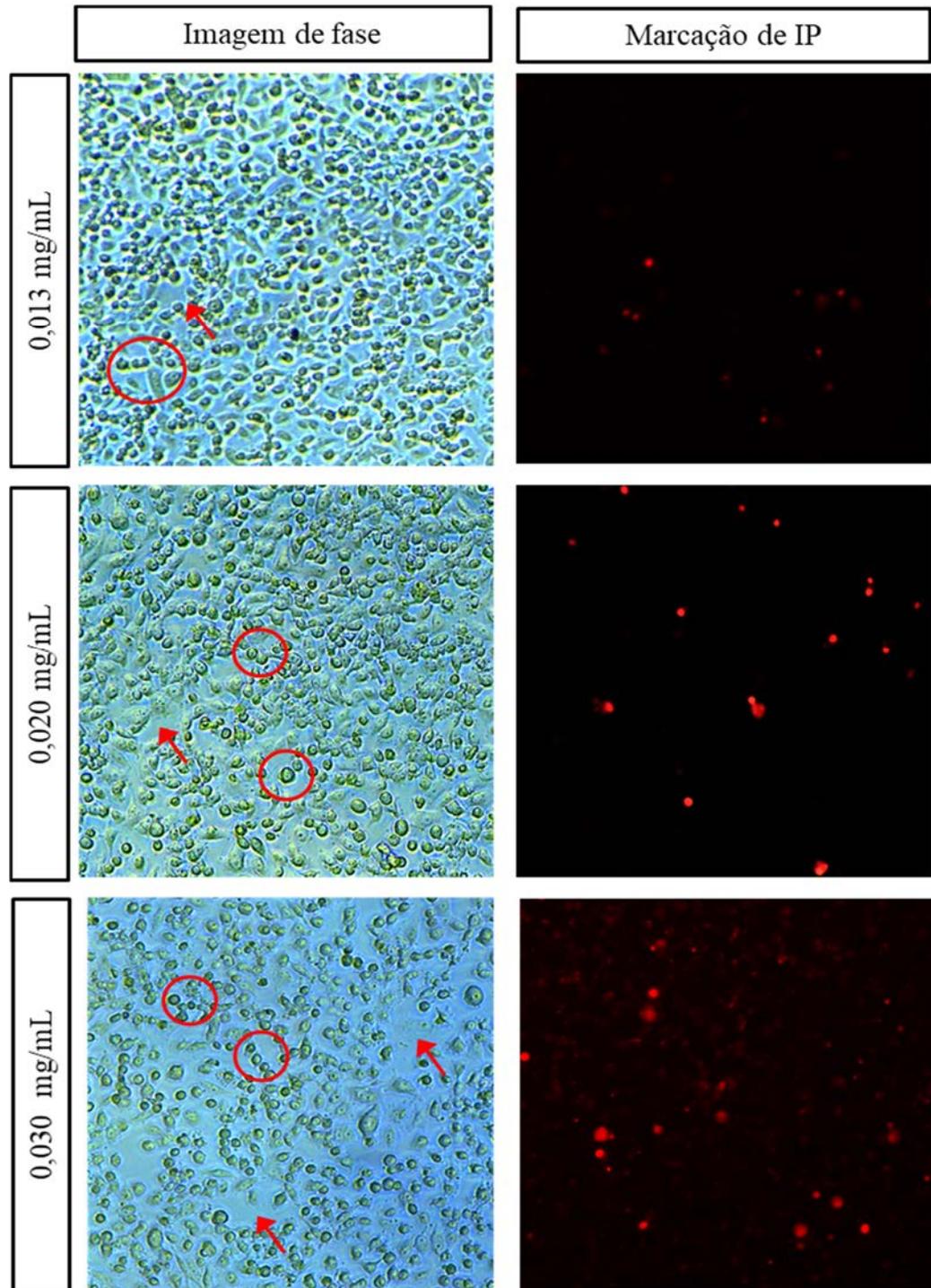


\* Diferença significativa em comparação com controle negativo ( $p < 0.05$ )

**Figura 19** - Cultivo de célula Vero após 24h de exposição aos controles, positivo (RPMI) e negativo (Peroxido de Hidrogênio a 3%), teste de IP (Objetivas de 10x).

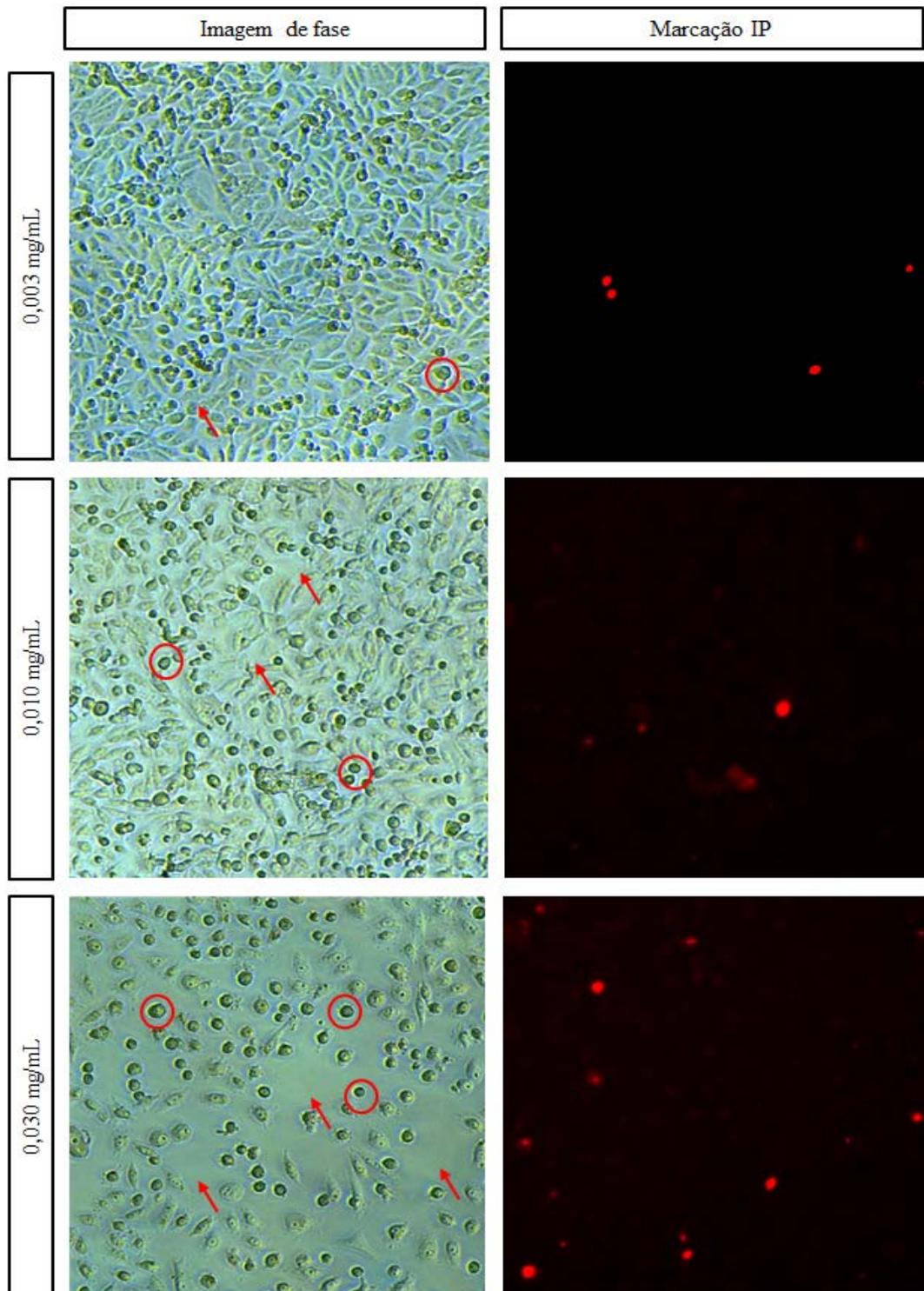


**Figura 20** - Cultivo de célula Vero após 24h de exposição a escina em diferentes concentrações, teste de IP (Objetivas de 10x).



(Seta vermelha) Perda da confluência celular; (Circulo vermelho) Celulas Vero com morfologia esférica.

**Figura 21** - Cultivo de célula Vero após 24h de exposição a digitonina em diferentes concentrações, teste de IP (Objetivas de 10x).

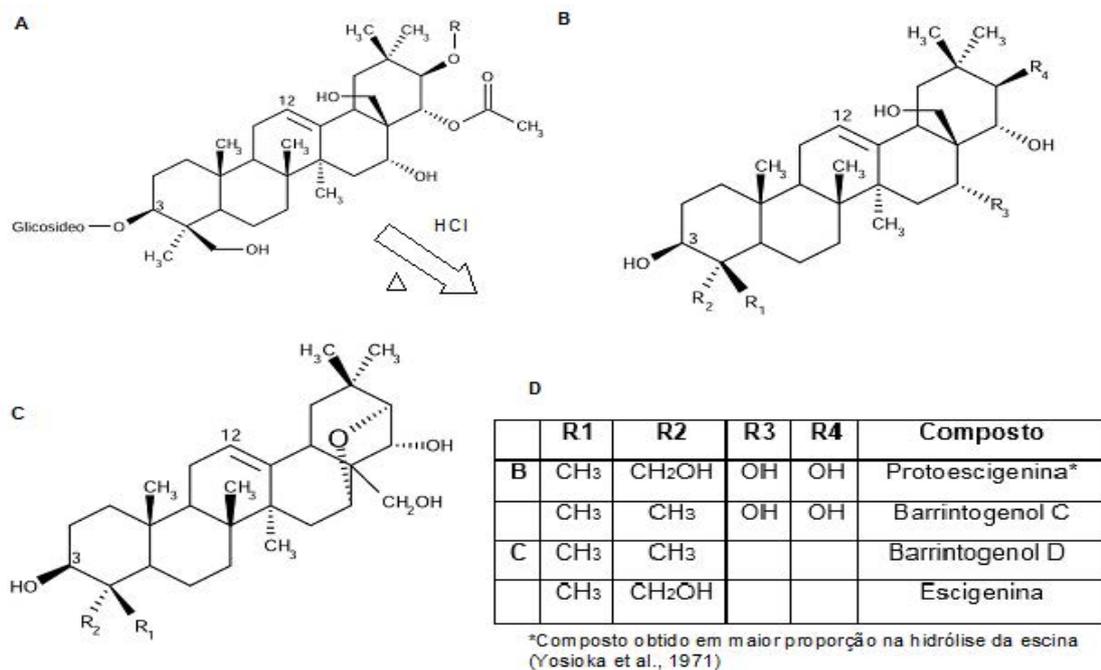


(Seta vermelha) Perda da confluência celular; (Circulo vermelho) Celulas Vero com morfologia esférica.

## 7 DISCUSSÃO

O método de hidrólise ácida foi eficiente para obter as agliconas da escina e digitonina. Os dados RMN  $^1\text{H}$  de produtos hidrolisados estavam de acordo com a informação descrita na literatura para escina e digitonina agliconas (MUHR et al., 1996; GLENSK et al., 2011; FARAG et al., 2015). As moléculas de saponinas glicosiladas presentes apresentam sinais amplos na região intermediária-média deste espectro (seção que fica aproximadamente entre 3-5 ppm) (VLIEGENTHART et al., 1983; PRESS et al., 2000). Estes sinais não foram observados neste estudo, o que confirma a hidrólise da escina e digitonina (Figura 6 e 7). Estudos anteriores relataram que o complexo de saponinas de escina é composto de protoescigenina (composto principal: 50%), escigenina e barrintogenóis C e D (Fig.22) (GRYNKIEWICZ et al., 2015).

**Figura 22** - Estruturas químicas da escina e saponinas



(A) Estrutura química da escina; (B e C) Estrutura química das agliconas obtidas pela hidrólise; (D) Nomenclaturas das saponinas de acordo com a estrutura química.

Os testes farmacológicos dos compostos saponínicos, neste estudo, evidenciaram atividade anti-helmíntica *in vitro* das saponinas escina e digitonina; e sapogenina acetilada, acetato de hecogenina, contra helmintos gastrintestinais de

caprinos. Dentre estes compostos, apenas a escina e digitonina apresentaram eficácia acima de 90%, percentual exigido pela portaria nº 48, de 12 de maio de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para que um fármaco anti-helmíntico seja considerado efetivo (BRASIL, 1997).

A saponina triterpênica escina exibiu elevada atividade ovicida ( $CE_{90}= 0.79$  mg/mL), porém não atuou sobre o estágio de larva infectante ( $L_3$ ). Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Gomes et al 2016, os quais observaram que a fração de saponinas triterpênicas obtidas do extrato aquoso de *Z. joazeiro*, inibiu a eclosão de ovos ( $CE_{90}=1.79$  mg/mL) desses parasitos. Entretanto, atividades anti-helmínticas, *in vivo*, também foi reportada por Liu et al. (2010), à presença da escina no extrato metanólico de *Aesculus chinensis*, sobre larvas adultas de *Dactylogyrus intermedius* em peixes dourados.

A saponina digitonina e a sapogenina acetilada, acetato de hecogenina, esteroidais foram mais ativas sobre larvas  $L_3$ , com inibição da motilidade de 95% e 75%, respectivamente quando testadas na maior concentração utilizada (1 mg/mL). Os resultados corroboram com estudos realizados por Botura et al. (2013), que demonstraram eficácia larvicida *in vitro* da fração de saponinas esteroidais da *A. sisalana* contendo hecogenina, embora este efeito tenha sido menor (64%), mesmo sendo utilizado uma concentração mais alta (2.5 mg/mL). A diferença entre os resultados pode estar relacionada ao grau de pureza dos isolados, além da interferência de outros compostos existentes na fração saponínica do sisal.

O percentual larvicida da digitonina foi 20% maior que o observado no tratamento com o acetato de hecogenina, ambos utilizados na mesma concentração (1mg/mL). Apesar destes compostos terem núcleos (aglicona) semelhantes, a redução da eficácia da sapogenina pode ser atribuído à ausência das cadeias laterais de açúcar na estrutura do acetato de hecogenina. A comparação do efeito anti-helmíntico da digitonina e escina com as suas respectivas agliconas também demonstram uma sensível redução da eficácia com a remoção da porção de açúcares.

Diferenças nas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória (YE et al., 2013), antibiótica (AVATO et al., 2006), antifúngica (Yang et al., 2006) e hemolítica (LIU et al., 2013; PODOLAK, et al., 2010), já foram relatadas entre saponinas e sapogeninas. Yang et al., (2006), ao avaliarem atividade fungicida de 22 saponinas e seis

sapogeninas esteroidais, constataram que a presença de açúcares aumentava a efetividade destes compostos. Estes autores atribuem a eficácia das saponinas à sua estrutura formada pela porção aglicona, e ao número e composição das unidades de monossacarídeos das cadeias de açúcar. Atividades biológicas de saponinas têm sido associadas à sua característica anfipática, que facilita a formação de complexos entre a porção lipofílica (aglicona) e hidrofílica (açúcar), com os componentes de membrana celular (esteroides, proteínas, colesterol, glicoproteína-P e fosfolipídios) levando a formação de poros e consequentemente aumento da permeabilidade das membranas (BOTTGER et al., 2012; DOLIGALSKA et al., 2011; FUCHS et al., 2009). O mecanismo de ação nematicida das saponinas pode estar associado com sua capacidade de atuar sobre estes componentes celulares presentes nos envoltórios de diferentes estádios de nematoides (DOLIGALSKA et al., 2011).

Baixa toxicidade da escina e digitonina foi evidenciada no teste de IP, na maior concentração utilizada de 0.03 mg/mL (24.4 e 26.5  $\mu$ M, respectivamente), sendo observado alto percentual de viabilidade celular de 94 e 97%, respectivamente para ambas as saponinas; alteração na morfologia celular, formas esféricas, e redução da confluência no tapete celular, no entanto, foi observado em ambos os tratamentos. A redução aparente da célula, aumento de volume e a forma esférica pode ser indicio de morte celular por apoptose (PARIS et al., 2011). Estes achados provavelmente podem decorrer do aumento na permeabilidade da membrana, causado por estas saponinas podendo não ocorrer o rompimento da mesma (PLATONOVA et al., 2015; KOLTSOLVA et al., 2011). Segundo Puttonen et al., (2008), a alta viabilidade celular observada devem ser confrontadas com outros ensaios, como o MTT. O IP atua como intercalador de DNA, marcando o DNA da célula morta com rompimento de membrana (RIEGER et al., 2011; VERMES et al., 2000) e não avalia reações enzimáticas que também possam indicar mecanismos de morte celular (PUTTONEN et al., 2008).

No teste do MTT, foi observado que ambos os tratamentos com as saponinas escina e digitonina promoveram citotoxicidade. A escina apresentou,  $CI_{50}$  de 0.02 mg/mL (18 $\mu$ M), concentração inferior ao encontrado por Yuan et al., (2017), ao testar este mesmo composto em células de cancro renal humano, linhagens 786-O ( $CI_{50}$  = 40.6  $\mu$ M) e Caki-1 ( $CI_{50}$  = 35.0  $\mu$ M). Estes autores concluíram que a escina causa disfunção do potencial de membrana da mitocôndria, que produz espécies de oxigênio reativo (ROS) e

consequentemente induz a apoptose por via mitocondrial, promovendo citotoxicidade. Embora se trate de diferentes tipos e linhagens de células, os resultados encontrados em nosso estudo revelaram maior evidência de toxicidade para ambas as saponinas (escina e digitonina) apenas no ensaio de MTT, ao contrário dos resultados encontrados no ensaio de IP, onde foram encontrados altos percentuais de células viáveis, sugerindo um possível mecanismo de ação tóxica envolvendo a via mitocondrial, de forma semelhante ao observado no estudo destes autores.

A digitonina se mostrou mais tóxica que a escina, apresentando  $CI_{50}$  igual a 0.0074 mg/mL (5.7  $\mu$ M), valor também observado por Gulden et al., 2015, ao avaliarem, no ensaio de MTT em células da linhagem Balb/c 3T3, a relação entre efeito citotóxico e a interferência na biodisponibilidade desta saponina após ligação da mesma com a membrana das células, obtendo efetividade em concentrações que variaram entre 5 a 21  $\mu$ M. O tratamento de células da linhagem A549 (carcinoma pulmonar humana) com concentração semelhante da digitonina (5.0  $\mu$ M) resultou na elevação da pressão osmótica intracelular, aumentando volume celular e conseqüente alterações enzimáticas e morte, sem no entanto causar o rompimento de membrana (PLATONOVA et al., 2015).

Diferenças de mecanismo de toxicidade entre os diversos grupos de saponinas têm demonstrado diferentes graus de toxicidade, conforme o tipo de célula utilizada. Isto pode estar associado às propriedades de seletividade e especificidade desses componentes de acordo com as moléculas ou células alvo, uma vez que estas particularidades possivelmente estão relacionadas às diferenças químicas e estruturais existentes entre as saponinas (WANG et al., 2007). Resultados de pesquisa realizada por Khanna e Kannabiran (2009) utilizando saponinas triterpênicas isoladas de *Gymnema sylvestree* e *Eclipta prostrata*, na concentração de 0.05 mg/mL demonstrou ação sobre células tumorais, mas não em células Vero.

Embora a concentração citotóxica ( $CI_{50}$ ) da escina e da digitonina, tenha sido menor que a concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) para a atividade ovicida e larvicida, respectivamente, resalta-se que, apenas os ensaios *in vitro* não são suficientes para avaliar seu potencial terapêutico e toxicológico, havendo a necessidade de estudos *in vivo* (THAKUR et al., 2011). Efeitos adversos podem ser observados em todo medicamento, natural ou sintética, dependendo da concentração, dose e organismo alvo (JAESCHKE, 2012).

Os flavonoides apresentaram baixa atividade anti-helmíntica sobre ovos e larvas de nematoides. Resultados semelhantes foram relatados por Desrues et al. (2016), os quais demonstraram que a catequina não foi ativa contra larvas L<sub>1</sub> de *Ostertagia ostertagi* e *Cooperia oncophora* de bovinos. Entretanto, a atividade anti-helmíntica *in vitro* da fração flavonoídica do extrato acetato de etila de *A. sisalana* foi observada por Botura et al., (2013) ao obter altos percentuais de inibição na eclosão de ovos que variaram de 18,6 a 100% nas concentrações de 0.02 a 0.32 mg/mL. A ação anti-parasitaria sobre apenas ovos de *H. contortus* também foi atribuída a flavonóis (treicin e diosmetin) presentes no extrato de acetato da *Digitalia insularis* (SANTOS et al., 2017). Diferenças químicas e estruturais entre estes compostos, também podem interferir nas atividades biológicas dos flavonoides (KERBOEUF et al., 2008; KUMAR e PANDEY, 2013). Apesar da variedade de investigações sobre a atividade anti-helmíntica de extratos de plantas contendo flavonoides, as informações sobre a ação desses compostos isolados ainda são escassas (KERBOEUF et al., 2008).

## 8 CONCLUSÃO

A escina e digitonina evidenciaram elevada atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre nematoides gastrintestinais de caprinos, e a presença da glicona ligada aos núcleos dessas saponinas, aumentou esse efeito farmacológico, demonstrando a importância da cadeia de açúcar ligada ao núcleo nesta atividade. No entanto, os flavonoides analisados tiveram reduzido efeito anti-helmíntico. A baixa toxicidade, *in vitro*, das saponinas com ação anti-helmíntica foi observada no ensaio de IP, embora tenha apresentado citotoxicidade no teste de MTT, os dados sugerem a necessidade de complementações em outros tipos de células e testes *in vivo*.

## 9 REFERÊNCIAS

ACTIS-GORETTA, L.; ROMANCZYK, L.J.; RODRIGUEZ, C. A.; KWIK-URIBE, C.; KEEN, C. L. Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human cancer cell lines. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.9, p. 797–808.e2, 2008.

ADAMU, M., NAIDOO, V., ELOFF, J.N. Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **BMC Veterinary Research**, V.9, p. 01-08. 2013

AGRAWAL, P.K., JAIN, D.C., PATHAK, A.K. NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins: an update. **Magnetic Resonance in Chemistry**, V.33, p.923 – 953, 1995.

AHMAD, V.U.; BAQAI, F.T.; AHMAD, R. A Diosgenin Tetrasaccharide from *Cestrum nocturnum*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v.50, n.7, p.1104-1110, 1995.

AKKARI, H.; RTIBI, K.; B'CHIR, F.; REKIK, M.; DARGHOUTH, M. A.; GHARBI, M. In vitro evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Research Communications**, V. 38, N. 3, p.249–255, 2014.

ALENCAR, S. P.; MOTA, R. A.; COELHO, M. C. O. C.; NASCIMENTO, S. A.; ABREU, S. R. DE O; CASTRO, R. S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 131-140, jan./mar, 2010.

ANGULO-CUBILLÁN, F.J.; GARCÍA-COIRADAS, L.; ALUNDA, J.M.; CUQUERELLA, M.; LA FUENTE, C. Biological characterization and pathogenicity of three *Haemonchus contortus* isolates in primary infections in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 99-105. 2010.

ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, v.1, n.9, p. 1392–1400, 2007.

ATTAR, S.; O'BRIEN, Z.; ALHADDAD, H.; GOLDEN, M. L.; CALDERÓN-URREA, A. Ferrocenyl chalcones versus organic chalcones: A comparative study of their nematocidal activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v.19, n.6, p. 2055-2073, 2011.

AYERS, S.; ZINK, D. L.; MOHN, K.; POWELL, J. S.; BROWN, C. M.; MURPHY, T.;R.; PRETORIUS, S;STEVENSON, D.; THOMPSON, D.; SINGH, S. B. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity in vitro. **Phytochemistry**, v.69, n.2, p. 541-545, 2008.

AVATO, P., BUCCI, R., TAVA, A., VITALI, C., ROSATO, A., BIALY, Z., JURZYSTA, M., Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure–activity relationship. **Phytotherapy Research**, v.20, 454–457, 2006

BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A.A.; KAMARAJ, C.; GEETHA, K. Larvicidal activity of saponin from *Achyranthes aspera* against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 103, p. 223–229, 2008.

BALDISSERA, M. D.; BOTTARI, N. B.; GRANDO, T. H.; SANTOS, R. C. V.; DALCIN, A. J. F.; GOMES, P.; RAFFIN R. P.; ZIMMERMAN, C. E. P.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G.; DA SILVA, A. S. In vitro and in vivo trypanocidal action of aescin and aescin liposomes against *Trypanosoma evansi* in experimental mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.12, p. 947-951, 2014.

BATISTA, J. F.; CAMPELO, J. E. G.; MORAIS, M. F.; SILVA, P. O.; MAGALHÃES, P. C.; BARÇANTE, F. P. S.; MENDONÇA, I. L. Endoparasitismo gastrointestinal em cabras da raça Anglo Nubiano. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v.15, n.2, p.318-326 abr./jun., 2014.

BEZERRA-SILVA, P.C.; SANTOS, J.C.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K.A.; SANTANA, A.L.B.D.; MARANHÃO, C.A.; NASCIMENTO, M.S.; NAVARRO, D.M.A.F; BIEBER, L.W. Extract of *Bowdichia virgilioides* and maackiain as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito. **Experimental Parasitology**, n. 153, p. 160–164, 2015.

BICHUETTE, M. A.; LOPES, W. D. Z.; GOMES, L. V. C.; FELIPPELLI, G.; CRUZ, B. C.; MACIEL, W. G.; TEIXEIRA, W. F. P.; BUZZULINI, C.; PRANDO, L.; SOARES, V. E.; CAMPOS, G. P.; COSTA, A. J. Susceptibility of helminth species parasites of sheep and goats to different chemical compounds in Brazil. **Small Ruminant Research**, n. 133, p. 93–101, 2015.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; LOPES, É. O.; SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T.M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p. 5081–5092, 2015.

BORGES-ARGÁEZ, R.; VELA-CATZÍN, T.; YAM-PUC, A.; CHAN-BACAB, M. J.; MOO-PUC, R. E.; CÁCERES-FARFÁN, M. Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. **Planta Medica**, v.75, n. 12, p. 1336-1338, 2009.

BORGES, S. L.; OLIVEIRA, A. A.; MENDONÇA, L. R.; LAMBERT, S. M.; VIANA, J. M.; NISHI, S. M.; JILÍÃO, F. S.; ALMEIDA, M. A. O. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.7, p. 643-648, julho 2015.

BÖTTGER, S.; HOFMANN, K.; MELZIG, M. F. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: a correlation?. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v.20, n.9, p. 2822-2828, 2012.

BOTURA, M.B.; SANTOS, J.D.G.; SILVA, G.D.; LIMA, H.G.; OLIVEIRA, J.V.A.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M.; BRANCO, A. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 211-217, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Aprova como anexo o Regulamento Técnico a ser observado na produção, no controle e no emprego de anti-parasitários de uso veterinário.

BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, H. E.; MOURÃO, A. P.; MIRNADA, C. A. S3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosilespinasterol, um novo glicosídeo esteroidal isolado de *Amarthospermum schomburghinana* (Miq) Baehni. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.58, p. 363-367, 1986

BRESSANI, F.A.; TIZIOTO, P.C.; GIGLIOTI, R.; MEIRELLES, S.L.C.; COUTINHO, R.; BENVENUTI, C.L.; MALAGÓ-JR, W.; MUDADU, M.A.; VIEIRA, L.S.; ZAROS, L.G.; CARRILHO, E.; REGITANO, L.C.A. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with gastrointestinal nematode infection in goats. **Genetics and Molecular Research**, V.13, N.4, p.8530–8536, 2014.

BURKE, J.M.; WELLS, A.; CASEY, P.; KAPLAN, R.M. Herbal dewormer fails to control gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 168-170, 2009.

CARDOSO, K. V. **Estudo químico das raízes de *Bowdichia virgilioides* (FABACEAE)**. 2015. 134f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, instituto de Química da UFBA, Salvador, Bahia.

CASTRO, C. C. B.; COSTA, P. S.; LAKTIN, G. T.; CARVALHO, P. H. D.; GERALDO, R. B.; MORAES, J.; PINTO, P. L. S.; COURI, M. R. C; PINTO, F.P.; SILVA FILHO, A. A. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piperaduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, n.22, p. 921-928, 2015.

CERQUEIRA, G. S.; SANTOS E SILVA, G.; VASCONCELOS, E. R. V.; FREITAS, A. P. F.; MOURA, B. A.; MACEDO, D. S.; SOUTO, A. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; LEAL, L. K. A.; BRITO, G. A. C.; SOUCCAR, C.; VIANA, G. S. B. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.683, p. 260–269, 2012.

CHAGAS, A.C.S.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. **Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.153p.

CHEN, L.; GAO, X.; ZHAO, SHU; HU, WEIPENG; CHEN, J. The Small-Molecule TrkB Agonist 7, 8-Dihydroxyflavone Decreases Hippocampal Newborn Neuron Death After Traumatic Brain Injury. **Journal Neuropathol and Experimental Neurology**, v.74, n.6, p.557–567, 2015.

COLES, G. C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F. H. M., GEERTS, S., KLEI, T. R., TAYLOR, M. A., e WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n.1, p.35-44, 1992.

COOPER, K.M.; WHELAN, M.; DANAHER, M.; KENNEDY, D.G. Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 2, p.155–165, 2011

COSTA, V. M.M.; SIMÕES, S. V.D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n.1, p. 65-71, janeiro 2011.

CRUZ, M. S.; BARROSO, S. C.; NAVONI, J. A.; TELES, M. M. R. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DE OLIVEIRA ROCHA, H. A.; DO AMARAL, V. S. Effect of Hecogenin on DNA instability. **Toxicology Reports**, n.3, p.539-543, 2016.

DAS, T. K.; BANERJEE, D.; CHAKRABORTY, D.; PAKHIRA, M. C.; SHRIVASTAVA, B.; KUHAD, R. C. Saponin: Role in Animal system. **Veterinary World**, v.5, n.4, p. 248-254, 2012

DESRUES, O., FRYGANAS, C., ROPIAK, H. M., MUELLER-HARVEY, I., ENEMARK, H. L., & THAMSBORG, S. M. Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on in vitro anthelmintic activity against bovine nematodes. **Parasitology**, v. 143, n. 4, p. 444-454, 2016.

DOLIGALSKA, M.; JOŹWICKA, K.; KIERSNOWSKA, M.; MROCZEK, A.; PACZKOWSKI, C.; JANISZOWSKA, W. Triterpenoid saponins affect the function of P-glycoprotein and reduce the survival of the free-living stages of *Heligmosomoides bakeri*. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.144–151, 2011.

DOMINGUES, L. F.; GIGLIOTI, R.; FEITOSA, K. A.; FANTATTO, R. R.; RABELO, M. D.; DE SENA OLIVEIRA, M. C.; BECHARA, G. H.; DE OLIVEIRA, G. P. ;DE SOUZA CHAGAS, A. C. In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**, v.197, n.1, p. 263-270, 2013.

DOUGHARI, J.H.; SUNDAY, D. Antibacterial activity of *Phyllanthus muellerianus*. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n. 6, p.400-405. 2008.

EID, S. Y; EL-READI, M. Z; WINK, M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. **Phytomedicine**, v.19, p. 1307– 1314, 2012

EID, S. Y; EL-READI, M. Z; ELDIN, E. E. M. N.; FATANI, S. H.; WINK, M. Influence of combinations of digitonin with selected phenolics, terpenoids, and alkaloids on the expression and activity of P-glycoprotein in leukaemia and colon cancer cells. **Phytomedicine**, v.21, p. 47– 61, 2013

- FARAG, M.A.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L.A. Unraveling the active hypoglycemic agent trigonelline in *Balanites aegyptiaca* date fruit using metabolite fingerprinting by NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.115, p.383–387, 2015.
- FERREIRA, L.E.; CASTRO, P.M.N.; CHAGAS, A.C.S.; FRANÇA, S.C.; BELEBONI, R.O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v.134, p.327-332, 2013.
- FONSECA, L.D.; VIEIRA, T.M.; LÁZARO, S.F.; SILVA, M. L. F.; FERREIRA, A. V. P.; BASTOS, G. A. B.; Morais-Costa, F.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Eficácia *in vitro* de extratos aquosos de plantas no controle de nematódeos gastrintestinais de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v..55, n..38, pp.1–8, 2014
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587–605, 2002.
- FUCHS, H.; BACHRAN, D.; PANJIDEH, H.; SCHELLMANN, N.; WENG, A.; MELZIG, M. F.; SUTHERLAND, M.; BACHRAN C. Saponins as tool for improved targeted tumor therapies. **Current drug targets**, v.10, n. 2, p. 140-151, 2009.
- GAMA, K. B.; QUINTANS, J. S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR; SANTANA, W. A.; BRANCO, A.; SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the antinociceptive effect of hecogenin acetate. **Journal of Natural Products**, n. 76, p. 559-563, 2013.
- GARCÉS, R.L.; LOPEZ, J.R.F. Efecto de las dosis letales de plantas de la familia Agavaceae sobre la actividad cardíaca y La oviposición de *Biophalaria havanensis* (Mollusca: Planorbidae). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 48, p. 15-20, 1996.
- GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; KUNZLER, A.; GIRARDI, C. S.; PASQUALI, M. A. B.; RAMOS, V. M.; SIMOES-PIRES, A.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; BRANCO, A.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Hecogenin acetate inhibits reactive oxygen species production and induces cell cycle arrest and senescence in the A549 Human Lung Cancer Cell Line. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.14, p.1128-1135, 2014.
- GHOUGHARI, A. M.; RAJANI, M. Densitometric Determination of Hecogenin from *Agave americana* Leaf Using HPTLC. **Chromatographia**, v. 64, n. ½, p. 113-116, 2006.
- GILABERT-ORIOU, R. ; MERGEL, K. ; THAKUR, M. ; VON MALLINCKRODT, B. ;MELZIG, MATTHIAS F.; FUCHS, H.; WENG, A. Real time analysis of membrane permeabilizing effects of oleananesaponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, n.8, p. 2387-2395, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.061>

GLENSK, M.; WLODARCZYK, M.; BASSARELLO, C.; PIZZA, C. Aescin determination in seeds and capsules of three pure and hybrid *Aesculus* species. **Chemistry of Natural Compounds**, v.47, n.1, p. 142-144, 2011.

GOMES, D. C.; LIMA, H. G.; VAZ, A. V.; SANTOS, N. S.; SANTOS, F. O.; DIAS, E. R.; BOTURA, M. B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M. J. M. *In vitro* anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. **Veterinary Parasitology**, v.226, p. 10-16, 2016.

GRYNKIEWICZ, G.; GRUZA, M.M; JATCZAK, K. Vegetable sources of chemical and pharmaceutical intermediates. Example of triterpene isolated from horse chestnut. **Chemik**, v. 69, n.2, p.75–80, 2015.

GÜLDEN, M.; SCHREINER, J.; SEIBERT, H. *In vitro* toxicity testing with microplate cell cultures: Impact of cell binding. **Toxicology**, v.332, p. 41-51, 2015.

HANSEN, M.B., NIELSEN, S.E., BERG, K., Re-examination and further Top of the development needs and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. **Journal Immunological Methods**, v.119, p.203-210. 1989.

HERNÁNDEZ, V.; MALAFRONTÉ, N.; MORA, F.; PESCA, M.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T. Antioxidant and antiangiogenic activity of *Astronium graveolens* Jacq. Leaves, **Natural Product Research**, v. 28, n.12, p. 917–922, 2014.

HERRMANN, F.; WINK, M. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. **Phytomedicine** v.18, p. 1191– 1196, 2011.

HO, N. F.; GEARY, T. G.; RAUB, T. J.; BARSUHN, C. L.; THOMPSON, D. P. Biophysical transport properties of the cuticle of *Ascaris suum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 4, n. 2, 153-165, 1990.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, pp.144–154, 2011.

HUANG L.; WANG, B.; ZHANG, J.; YAN, C.; MU, S.; HAO, X. Studies on cytotoxic pregnane sapogenins from *Cynanchum wilfordii*. **Fitoterapia**, v.10, p. 107–116, 2015

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário, Rebanho Efetivo 2015**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=12&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=18J>. Acessado em 30 de outubro de 2016.

JAESCHKE, H. Toxicidade Hepática pela Exposição a Xenobióticos. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**, 2 ed. Porto Alegre: Editora AMGH, 2012 Cap. 13 p. 180-190.

JIANG, N.; XIN, W.; WANG, T.; ZHANG, L.; FAN, H.; DU, Y.; LI, C.; FU, F. Protective effect of aescin from the seeds of *Aesculus hippocastanum* on liver injury induced by endotoxin in mice, **Phytomedicine**, v.18, p.1276–1284, 2011.

KAWASAKI, T.; NISHIOKA, I. Digitalis Saponins. I. Seed Saponins of *Digitalis purpurea* L.(Commercial "Digitonin"). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.12, n.10, p.1250-1253, 1964

KEMERTELIDZE, É. P.; SULAKVELIDZE, TS. P. Method of obtaining digitonin from *Digitalis* seeds. **Chemistry of Natural Compounds**, n.5, p. 587-588, set/out, 1992.

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUÉGNARD, F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, n.2, p.116-128, 2008.

KIMBERLY, C. H. A review of the chemistry of digitalis. **Journal of the American Pharmaceutical Association** v.1, n.2, p. 111-114, 1912.

KHAN, S. A.; ASIRI, A. M.; ALAMRY, K. A.; EL-DALY, S. A.; ZAYED, M. A. Eco-friendly synthesis and in vitro antibacterial activities of some novel chalcones. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 312-317, 2013.

KHANNA, V.G., KANNABIRAN, K. Anticancer-cytotoxic activity of saponins isolated from the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata* on HeLa cells. **International Journal of Green Pharmacy**, v.3, p. 227–229, 2009.

KOLTSOVA, S.V.; PLATONOVA, A.; MAKSIMOV, G.V.; MONGIN, A. A.; GRYGORCZYK, R.; ORLOV, S. N. Activation of P2Y receptors causes strong and persistent shrinkage of C11-MDCK renal epithelial cells. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.301, p. C403–C412, 2011.

KORCHOWIEC, B.; GORCZYCA, M.; WOJSZKO, K.; JANIKOWSKA, M.; HENRY, M.; ROGALSKA, E. Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, 1848 n.10, p. 1963-1973, 2015.

KOTZE, A. C.; Target-based and whole-worm screening approaches to anthelmintic Discovery. **Veterinary Parasitology**, n. 186, p. 118–123, 2012.

KRSTIN, S.; PEIXOTO, H. S.; WINK, M. Combinations of Alkaloids Affecting Different Molecular Targets with the saponin digitonin can synergistically enhance trypanocidal activity against *Trypanosoma brucei brucei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 7011–7017, 2015.

KUCÇUKKURT, I.; INCEB, S.; KELES, H.; AKKOLD, E. K.; AVC, G.; YESILADA, E.; BACAĞF, E. Beneficial effects of *Aesculus hippocastanum* L. seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration, **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, p. 18–22, 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, p. 1-16 f, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>

LAKSHMI, V.; JOSEPH, S. K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, S. K.; SAHOO, M. K.; DUBE, V.; MISHRA, S. K.; MURTHY, P. K. Antifilarial activity in vitro and in vivo of some flavonoids tested against *Brugia malayi*. **Acta tropica**, v.116, n. 2, p. 127-133, 2010.

LEITE, L.H.; TINTINO, S.R.; FIGUEREDO, F.G.; OLIVEIRA, C.D.M.; SIEBRA, A.L.A.; SAMPAIO, R.S.; BOLIGON, A. A.; SOUZA, D. O.; ATHAYDE, M. L.; COUTINHO, H. D.M.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R. Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichian Virgilioides* Kunth (Sucupira) - Fabaceae Papilionoidae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v 13, n. 5, p. 477-87, 2014

LIU, Y. T.; WANG, F.; WANG, G. X.; HAN, J.; WANG, Y.; WANG, Y. H. In vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Radix angelicae pubescentis*, *Fructus bruceae*, *Caulis spatholobi*, *Semen aesculi*, and *Semen pharbitidis* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology research**, v.106, n. 5, p. 1233-1239, 2010.

LIU, Z.; GAO, W. ; JING, S. ; ZHANG, Y.; MAN, S. ; WANG, Y.; ZHANG, J. ; LIU, C. Correlation among cytotoxicity, hemolytic activity and the composition of steroidal saponins from *Paris L.* **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, n. 2, p.422-430, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 01, 6a.ed., Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, 2014.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K. Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. **Life sciences**, v. 148, p. 154-172. 2016

MAHAPATRA, D. K., BHARTI, S. K., & ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, v.98, p. 69-114, 2015.

MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H. R.; FETTERER, R. H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus Contortus*. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 103, n. 3, p. 681-686, 1992.

MATSUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; NINOMIYA, K.; ARAKI, N.; YOSHIKAWA, M.; YAMAHARA, J. Antiinflammatory effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from Horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum L.*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V. 7, n. 13, p. 1611-1616, 1997

MONDAL H.; HOSSAIN, H.; AWANG, K.; SAHA, S.; MAMUN-UR-RASHID, S.; ISLAM, M. K.; RAHMAN S.; JAHAN, I. A.; RAHMAN, M. M.; SHILUPI, J. A. Anthelmintic Activity of Ellagic Acid, a Major Constituent of *Alternanthera sessilis*

Against *Haemonchus contortus*, **Pakistan Veterinary Journal**, v.35, n.1, p. 58-62, 2015.

MUHR, P.; LIKUSSAR, W.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. Structure Investigation and Proton and Carbon-13 Assignments of Digitorin and Cholesterol using Multidimensional NMR Techniques. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 34, p.137-142, 1996.

NERY, P.S.; DUARTE, E.R.; MARTINS, E.R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: Revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p: 330–338, 2009.

NEVES, M. R. M., ZAROS, L., VIEIRA, L. D. S., MONTEIRO, J., SILVA, R., da SILVA, N. B., & LOBO, R. (2015, January). Resposta tecidual no abomaso e intestino delgado de caprinos resistentes e susceptíveis à endoparasitoses gastrintestinais. In *Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 18, 2014, Gramado. Fronteiras da parasitologia: anais. Gramado: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2014.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125-137, 2007.

NCHU, F., GITHIORI, J.B., MCGAW, L.J., ELOFF, J.N. Anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Markhamia obtusifolia* Sprague (Bignoniaceae). **Veterinary Parasitology**, v.183, p.184-188, 2011

NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; LEITE, K.R.M.; FARIAS, V.M.; BRAGA, L.T.; LOPES, C.A.P. Atividade Imunomoduladora das Plantas Mediciniais: Perspectivas em Medicina Veterinária. **Ciência Animal**, v.13, n.1, p.23-32, 2003.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

OUATTARA, M.; SISOUMA, D.; KONÉ, M. W.; MENAN, H. E.; TOURÉ, S. A.; OUATTARA, L. Synthesis and anthelmintic activity of some hybrid benzimidazolyl-chalcone derivatives. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, n. 6, p. 767-775, 2011

ORHAN, D.D. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v.165, n.6, p.496-504, 2010.

PARIS, I.; MUNˆOZ, P.; HUENCHUGUALA, S.; COUVE, E.; SANDERS, L.E H.; GREENAMYRE, J. T.; CAVIEDES, P.; SEGURA-AGUILAR, J. Autophagy Protects Against Aminochrome-Induced Cell Death in Substantia Nigra-Derived Cell Line. **Toxicological Sciences**, v.121, n.2, p. 376–388, 2011.

PIMENTEL, M. M. A. M.; PEIXOTO NETO, J. G.; SANTOS, J. D. G.; BRANCO, A. **Obtenção de acetato de hecogenina a partir do resíduo líquido de *Agave sisalana* (sisal) utilizando energia de microondas focalizada.**In: 31 a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia / SP. Do Petróleo à Biomassa, 2008. Disponível em: [sec.sbq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0988-2.pdf](http://sec.sbq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0988-2.pdf). Acessado em: 01 de março de 2016.

PLATONOVA, A.; PONOMARCHUK, O.; BOUDREAULT, F.; KAPILEVICH, L. V.; MAKSIMOV, G. V.; GRYGORCZYK, R.; ORLOV, S. N. Role of cytoskeleton network in anisotonic volume changes of intact and permeabilized A549 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1848, p. 2337–2343, 2015

PODOLAK, I.; GALANTY, A.; SOBOLEWSKA, D. Saponins as cytotoxic agents: a review. **Phytochem Review**, v.9, p. 425–474, 2010.

PRESS, J.B.; REYNOLDS, R.C.; MAY, R.D.; MARCIANI, D.J. Structure/function relationships of immunostimulating saponins. In: Rahman, A. (Ed). **Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products** (v. 24, Parte E). Netherlands: Elsevier, 2000. 131-174.

PUTTONEN, K. A.; LEHTONEN, S.; LAMPELA, P.; MANNISTO, P. T.; RAASMAJA, A. Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. **Toxicology in Vitro**, n. 22, p.182–189, 2008.

QUINTANS, J. S.; PEREIRA, E. W.; CARVALHO, Y. M.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; BATISTA, M. V.; MOREIRA, C. D.L.F.A.; LIMA, Á. A.N.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; GELAIN, D. P.; ZENGIN, GOKHAN; ARAÚJO, A. A. S.; GELAIN, D. P. Host–guest inclusion complexation of  $\beta$ -cyclodextrin and hecogenin acetate to enhance anti-hyperalgesic effect in an animal model of musculoskeletal pain. **Process Biochemistry**. 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511316303403> Acessado em 20 de setembro de 2016.

RAMOS, S.; RODRÍGUEZ-RAMIRO, I.; MARTÍN, M. A.; GOYA, L.; BRAVO, L. Dietary flavanols exert different effects on antioxidant defenses and apoptosis/proliferation in Caco-2 and SW480 colon cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v.25, p. 1771–1781, 2011.

RAO, A.V.; SUNG, M.K. Saponins as anticarcinogens. **The Journal of Nutrition**, v.28, p.717-724, 2009.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001

RIEGER A. M.; NELSON K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **Journal of Visualized Experiments**, V. 50, n. 2597, p.1 - 4, April 2011

- RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido nordestino: controle integrado das parasitoses gastrointestinais visando contornar a resistência anti-helmíntica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n7, p.901-908, julho 2013
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. Doenças de Ruminantes e Equinos. São Paulo, Ed. Varela, 2 ed., p. 89-103, 2006.
- ROGERS, W. P.; BROOKS, Frances. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 7, n. 1, p. 61-65, 1977.
- ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 12, n. 1, p. 31-42, jan./mar. 2010.
- SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Brazilian Journal veterinary Parasitology**. Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 3-17, jan.-mar. 2016
- SANTIAGO, G.M.P.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L.; SANTOS, R.P.; POULIQUEN, Y.B.M.; ARRIAGA, A.M.C; ANDRADE-NETO, M; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Pharmacognosy**, v. 15, p. 187-190, 2005.
- SANTOS, F. O.; LIMA, H. G.; Santos, N. S. S.; SERRA, T. M.; UZEDA, R. S. U.; REIS, I. M. A.; BOTURA, M. B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M. J. M. B. In vitro anthelmintic and cytotoxicity activities the *Digitaria insularis* (Poaceae). **Veterinary Parasitology**, v.245, p. 48–54, 2017.
- SANTOS, J.D. G.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, A. Chemical from *Agave Sisalana* Biomass: Isolation and Identification. **International Journal of Molecular Sciences**, V. 16, p. 8761-8771, 2015.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap. 24, p. 615- 656.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap. 27, p.711-734.
- SIDANA, J.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. **Phytochemistry**, v.130, p. 22 – 46, 2016.

SILVA, E. P. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica das espécies *Astronium graveolens*, *Tapirira guianensis* e *Spondias mombin* (ANACARDIACEAE)**. 2016. 230f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química da UFBA, Salvador, Bahia.

SILVA, L. E.; ELIAS, L. C. P.; SOUSA-JÚNIOR, P. T.; DALL’OGLIO, E. L.; STEINDEL, M.; RIBEIRO, T. A. N.; PACHECO, L. K.; NUNES, R. K. Avaliação da Atividade Tripanocida e Leishmanicida da *Bowdichia virgilioides*. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2007. Disponível em: <https://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0315-1.pdf>. Acessado em: 20 de abril de 2016.

SINGH, R.; BAL, M. S.; SINGLA, L. D.; KAUR, P. Detection of anthelmintic resistance in sheep and goat against fenbendazole by faecal egg count reduction test. **Journal of Parasitic Diseases**, v.40, p.1-4, August/2016.

SIRTORI, C. R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacological Research**, v.44, n. 3, p. 183-193, 2001.

SOUZA, J.T.; TROCOLI, R. O.; MONTEIRO, F. P. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic Trichoderma species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. **Biological Control**, v. 94, p. 25-32, 2016.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219–243, 2004.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. DE S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Química Nova**, Vol. 30, No. 4, 984-987, 2007

SWISS, R.; NILES, A.; CALI, J. J.; NADANACIVA, S.; WILL, Y. Validation of a HTS-amenable assay to detect drug-induced mitochondrial toxicity in the absence and presence of cell death. **Toxicology in Vitro**, v.27, n.6, p.1789-1797, 2013.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. Parasitos de caprinos e ovinos. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap.3. p.133-156.

THAKUR, M.; MELZIG, M. F.; FUCHS, H.; WENG, A. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. **Botanics: Targets and Therapy**, v., p. 19–29, 2011

THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C. R.; VASCONCELLOS, C. L. C.; LIRA, A. F.; CÂMBUI, E. V. F.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 451-456, 2010

TORRES-ACOSTA J.F.J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.77, p.159–173, 2008.

TORRES-ACOSTA J.F.J., SANDOVAL-CASTRO C.A., HOSTE H., AGUILAR CABALLERO, CÁMARA-SARMIENTO R.; ALONSO-DIAZ M.A. Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. **Small Ruminant Research**. v.103, p. 28- 40, 2012.

TORRES, R. C.; GARBO, A. G.; WALDE, R. Z. M. L. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, S. 1, p. S167-S170, September 2014.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C.; **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**.Tokyo: Japan international cooperation agency, 1998.150p

UYSAL S, ZENGIN G, LOCATELLI M, BAHADORI MB, MOCAN A, BELLAGAMBA G, DE LUCA E, MOLLICA A AND AKTUMSEK A . Cytotoxic and Enzyme Inhibitory Potential of Two *Potentilla* species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and Their Chemical Composition. **Frontiers Pharmacol**, v.8, n.290, p. 1-11, 2017

WANG, Y., ZHANG, Y., ZHU, Z., ZHU, S., LI, Y., LI, M., YU, B. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V.15, p. 2528–2532, 2007.

VEN, H. V.; VERMEERSCH, M.; MATHEEUSSEN, A.; VANDERVOORT, J.; WEYENBERG, W.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; LUDWIG, A. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin - aescin: Factor influence study and *in vitro* efficacy evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, n.420, p. 122-132, 2011.

VERMES, I., C. HAANEN, AND C. REUTELINGSPERGER. Flow cytometry of apoptotic cell death.. **Journal of immunological methods** v. 243 n. 1, p. 167-190. 2000

VIEIRA, V. D.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; AZEVEDO, S. S. A.; ALMEIDA-NETO, J. L.; MORAIS, D. F.; RIBEIRO, A. R. C.; ATHAYDE, A. C. R. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. **Tropical Animal Health And Production**, v.46, p. 355–361, 2014.

VIEIRA, L.D.S.Endoparasitoses Gastrintestinais em Caprinos e Ovinos. **Documentos 58 On line 1st ed.**, EMBRAPA, 2005. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Endoparasitoses+gastrintestinais+21mar2006\\_000g45n26av02wx5ok0iuqaqk5uijyk7.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Endoparasitoses+gastrintestinais+21mar2006_000g45n26av02wx5ok0iuqaqk5uijyk7.pdf) . Acessado em: 10 de maio de 2015.

VIGNAU, M.L.; VENTURINI, L.M.; ROMERO, J.R.; EIRAS, D.F.; BASSO, W.U. **Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias em los animales domésticos**. 1a Ed., Argentina, editora UNLP, p.104, 2005.

VILELA, V.L.R.; FEITOSA, T. F.; LINHARES, E. F.; ATHAYDE, A. C. R.; MOLENTO, M. B.; AZEVEDO, S. S. A. Famacha © method as an auxiliary strategy in the control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions of Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.190, n.1-2, p: 281–284, 2012.

VINCKEN, J.P.; HENG, L.; GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, p. 275–297, 2007

VLIEGENTHART, J.F.G.; DORLAND, L.; HALBEEK, H. V. High-resolution, <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.41, p.209-374, 1983.

YANG, CHONG-REN; ZHANG, Y.; JACOB, MELISSA R.; KHAN, S. I.; ZHANG, Y.; LI, X. Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, p. 1710–1714, 2006.

YE, Y.; XING, H.; CHEN, X. Anti-inflammatory and analgesic activities of the hydrolyzed sasanquasaponins from the defatted seeds of *Camellia oleifera*. **Archives Pharmacal Research**, v.36, p. 941-951, 2013.

YOSIOKA, I; MATSUDA, A.; IMAI, K.; NISHIMURA, T.; KITAGAWA, I. Saponin and Sapogenol. IV.1) Seeds Sapogenols of *Aesculus turbinata* BLUME. On the Configuration of Hydroxyl Functions in Ring E of Aescigenin, Protoaescigenin, and Isoaescigeninin Relation to Barringtogenol C and Theasapogenol **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, V.19, n.6, p. 1200-1213, 1971.

YUAN, S.; CHENG C.; WANG, S.; HO H.; CHIU, K.; CHEN, C. S.; CHEN C.C.; SHIAU, M.; OU1, Y. Escin induces apoptosis in human renal cancer cells through G2/M arrest and reactive oxygen species-modulated mitochondrial pathways. **Oncology Reports**, v. 37, p. 1002-1010, 2017

ZAJAC, A. M. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. **Veterinary Clinical Food Animal**, v.22, p. 529–541, 2006.

ZVINOROVA, P.I.; HALIMANI, T.E.; MUCHADEYI, F.C.; MATIKA, O.; RIGGIOE, V.; DZAMA, K. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes – the potential in low-input/output small ruminant production systems. **Veterinary Parasitology**, V. 225, p. 19–28, 2016.

ZUANAZZI, J.A.S.;MONTANHA, J.A Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap. 23, p.577- 614

**ANEXO****Anexo 1- *Bowdichian Virgilioides***

**Fonte:** LATOX, 2017

**Anexo 2 - Astronium graveolens (Aroeira)**



**Fonte:** LORENZI, 2014

**Anexo 3 – Certificado do Comissão de Ética para o uso de Animais (CEUA)**



**Universidade Federal da Bahia  
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Comissão de Ética no Uso de Animais**

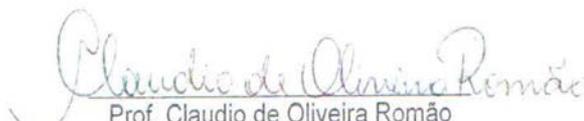
Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA  
Fone: (071) 3283-6704/6708/ - Fax: 3283-6718  
E-mail: [escmev@ufba.br](mailto:escmev@ufba.br)

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Saponinas sintéticas e flavonoides isolados de plantas: potencial anti-helmíntico para caprinos e avaliação toxicológica in vitro", registrada com o nº 37/2016, sob a responsabilidade de Silvia Lima Costa, e 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 18.07.2016.**

Finalidade	( ) Ensino/Treinamento (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	05/08/2016 à 09/08/2017
Espécie/linhagem/raça	Caprina
Nº de animais	02
Peso/Idade	15 Kg / 1 ano
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Experimental de Entre Rios - UFBA

Salvador, 27/07/2016.

  
Prof. Claudio de Oliveira Romão  
Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA