



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**MARIANA BORGES BOTURA**

**AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA E TOXICOLÓGICA DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES DO RESÍDUO DE *Agave sisalana*  
Perr. (SISAL) SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS  
DE CAPRINOS**

Feira de Santana, BA  
2011

**MARIANA BORGES BOTURA**

**AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA E TOXICOLÓGICA DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES DO RESÍDUO DE *Agave sisalana*  
Perr. (SISAL) SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS  
DE CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexsandro Branco

Co-orientadoras: Profa. Dra. Maria José Moreira Batatinha

Profa. Dra. Maria Angela Ornelas de Almeida

Feira de Santana, BA  
2011

Dedico este trabalho com muito carinho a minha  
querida sobrinha, Maria Luiza.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Mary, e aos meus irmãos, Mônica e Adriano, por todo carinho, amor e incondicional apoio em todos os momentos da minha vida.

À Profa. Dra. Maria José Moreira Batatinha, não apenas por sua competente orientação em meu doutorado, mas por todas as oportunidades, ensinamentos, amizade, apoio e confiança. Todos esses anos de convívio desde o período de iniciação científica foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Maria Angela Ornelas de Almeida, pela amizade e apoio constante e grande contribuição neste trabalho e na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Alexandre Branco pela atenção, apoio e essencial colaboração durante todo o desenvolvimento deste projeto.

À amiga Gisele Dias da Silva, pelo apoio e companheirismo, e por estar sempre ao meu lado durante todas as etapas deste trabalho

Aos estagiários do Latox que me ajudaram na realização deste projeto: Helimar, João Victor, Natalia, Suelen e Samanta.

Ao colega Jenner David Gonçalves dos Santos pela grande ajuda no desenvolvimento do trabalho, em especial pelo fornecimento dos extratos e frações de sisal.

Ao Prof. Dr. Eduardo Luiz Trindade Moreira pelo apoio e grande auxílio nas necropsias e análises histopatológicas realizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Joselito Nunes Costa por ter disponibilizado o Centro de Desenvolvimento da Pecuária (CDP) para a realização do experimento *in vivo*. A toda equipe do CDP pelo grande auxílio no trabalho, em especial a Thiago Sampaio.

À Profa. Dra. Sílvia Lima Costa pelos ensinamentos e valiosa colaboração nos ensaios de citotoxicidade. À equipe do laboratório de Neuroquímica, em especial a Rosan, por me ensinar algumas técnicas de cultivo celular e a Diego Madureira, pelo auxílio nas análises estatísticas

Ao grupo do laboratório de cultivo celular da Escola de Medicina Veterinária (UFBA): Prof. Dr. Luis Fernando Pita Godim, Rosângela, Muller e Leane que auxiliaram nos testes de citotoxicidade.

Ao Médico Veterinário Hélcio pela grande apoio, principalmente durante a aquisição dos animais para o experimento.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Batista Pinto pela colaboração na realização das análises estatísticas do experimento *in vivo*

À Fernando dos Santos Carneiro pela ajuda na coleta do resíduo de sisal

À Josivaldo Pereira Rocha pela ajuda nas viagens a campo.

À Ananda Amaral e Ludmila Lira pela sincera amizade e apoio sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS pela oportunidade de desenvolvimento dos estudos.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Helton Ricardo Carneiro Junior, pela ajuda durante todo o curso.

À FAPESB pela concessão da bolsa de Doutorado.

As demais pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que contribuíram para a concretização deste trabalho

## RESUMO

Este estudo descreve a avaliação de extratos e frações de *Agave sisalana* (sisal) sobre nematoides gastrintestinais e seus efeitos tóxicos em caprinos. As atividades ovicida e larvicida *in vitro* dos extratos aquoso (EA), acetato de etila (EE), frações flavonoídica (FF) e saponínica (FS) obtidos do resíduo de sisal foram avaliadas através dos ensaios de inibição da eclosão de ovos e de migração larvar. No teste anti-helmíntico *in vivo*, 30 animais foram distribuídos em três grupos: GI, tratado com EA (1,73 g/kg/dia) durante oito dias; GII, tratado com levamisol e o GIII, sem tratamento. O efeito citotóxico dessas frações foi investigado em células Vero pelos testes de MTT e azul de tripan. As  $CE_{50}$  sobre ovos foram de 4,7, 0,1 e 0,05 mg/mL para EA, EE e FF, respectivamente. No teste de migração larvar, maior eficácia foi observada para FS (64,1%). Na avaliação *in vivo*, os percentuais de redução da contagem de ovos foram de 50,3(GI) e 93,6 (GII), e de larvas L<sub>3</sub> corresponderam a 80 (GI) e 85,6 (GII). O EA não interferiu no número de parasitos adultos. Os EA, EE e FS foram citotóxicos, com  $CI_{50}$  de 570, 180 e 13,7  $\mu$ g/mL, respectivamente. O sisal possui ação ovicida, e a análise da fração mais ativa (FF) indicou a presença de um homoisoflavonoide. Os efeitos *in vitro* sobre larvas e células Vero estão relacionados com a fração saponínica. O tratamento anti-helmíntico *in vivo* com o EA mostrou moderada atividade contra ovos e estádios de vida livre, não apresentando evidências de toxicidade.

**Palavras-chave:** *Agave sisalana*. Flavonoides. Saponinas. Anti-helmíntico. Toxicidade. Caprinos

## ABSTRACT

This study describes the evaluation of extracts and fractions of *Agave sisalana* (sisal) on gastrointestinal nematodes and their toxic effects in goats. The *in vitro* anthelmintic activity of aqueous (AE), ethyl acetate (EE) extracts, flavonoids (FF) and saponins fractions (SF) obtained from sisal residue were determined through the egg hatch assay (EHA) and L<sub>3</sub> migration inhibition (LMI). For the *in vivo* test, 30 animals were distributed into three groups: GI, was treated with AE (1.7 g/kg/day) for eight days; GII, was treated with levamisole; and GIII, was left untreated. The cytotoxic effects of extracts and fractions were investigated in Vero cells by MTT and trypan blue tests. The EC<sub>50</sub> on eggs were 4.7, 0.1 and 0.05 mg/mL for AE, EE and FF, respectively. In the LMI, the greatest efficacy was observed in the SF (64.1%). *In vivo* evaluation, the reductions of faecal eggs counts were 50.3 (GI) and 93.6 (GII), and of the total number of L<sub>3</sub> larvae were 80 (GI) and 85.6 (GII). The AE did not affect the count of adult parasites. The AE, EE, and SF were cytotoxic, with IC<sub>50</sub> of 570, 180 and 13.7 mg/mL, respectively. The sisal showed ovicidal action and the analysis of the most active fraction (FF) indicates the presence of a homoisoflavonoid. The *in vitro* effect on larvae and Vero cells is related to the saponins fraction. The *in vivo* anthelmintic treatment with AE showed moderate activity against eggs and free-living stages, with no evidence of toxicity.

**Keywords:** *Agave sisalana*. Flavonoids. Saponins. Anthelmintic. Toxicity. Goats

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Estudos <i>in vitro</i> sobre o efeito de plantas contra nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes   | 21 |
| <b>Tabela 2:</b> Estudos <i>in vivo</i> sobre atividade anti-helmíntica de plantas em caprinos   | 28 |
| <b>Tabela 3:</b> Média, desvio padrão (DP) e percentual de redução (%) do número de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos tratados com o extrato aquoso de <i>A. sisalana</i>  | 59 |
| <b>Tabela 4:</b> Média, desvio padrão (DP) e percentual de redução (%) do número de larvas de terceiro de estágio de nematoides gastrintestinais, obtidas de culturas de fezes de caprinos tratados com o extrato aquoso de <i>A. sisalana</i> | 60 |
| <b>Tabela 5:</b> Média, desvio padrão (DP) e percentual de redução (%) do número de nematoides gastrintestinais (L <sub>4</sub> e L <sub>5</sub> ) recuperados de caprinos, após o tratamento com o extrato aquoso de <i>A. sisalana</i>       | 61 |
| <b>Tabela 6:</b> Média e desvio padrão do peso (kg) de caprinos tratados com o extrato aquoso de <i>A. sisalana</i>  | 62 |
| <b>Tabela 7:</b> Média, desvio padrão de parâmetros hematológicos de caprinos tratados com o extrato aquoso de <i>A. sisalana</i>  | 63 |
| <b>Tabela 8:</b> Média, desvio padrão de marcadores bioquímicos séricos e proteína plasmática total de caprinos tratados com o extrato aquoso de <i>A. sisalana</i>  | 64 |



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> A: <i>A. sisalana</i> : planta adulta; B: inflorescência; C: bulbilhos; D: frutos maduros; E: corte do fruto com sementes  | 32 |
| <b>Figura 2:</b> Estrutura básica de uma saponina esteroidal espirostano  | 34 |
| <b>Figura 3:</b> Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração   | 36 |
| <b>Figura 4:</b> Estrutura química de flavonoides e homoisoflavonoides isolados de <i>A. sisalana</i>   | 37 |
| <b>Figura 5:</b> Obtenção de extratos e frações a partir do resíduo de <i>A. sisalana</i>   | 50 |
| <b>Figura 6:</b> Média e desvio padrão do percentual de inibição da eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais com extratos e frações de <i>A. sisalana</i>                           | 57 |
| <b>Figura 7:</b> Média e desvio padrão do número de larvas de nematoides gastrintestinais recuperadas no teste de migração após o tratamento com extratos e frações de <i>A. sisalana</i> | 58 |
| <b>Figura 8:</b> Alterações histológicas hepáticas no grupo I: hepatócitos tumefeitos e vacuolizados (HE400X)   | 65 |
| <b>Figura 9:</b> Alterações histológicas renais no grupo I (HE400X)   | 66 |
| <b>Figura 10:</b> Percentual de viabilidade de células Vero, pelo teste de MTT, após o tratamento com extratos e frações de <i>A. sisalana</i>  | 67 |
| <b>Figura 11:</b> Percentual de células viáveis, pelo teste azul de tripan, após o tratamento com extratos e frações de <i>A. sisalana</i>  | 67 |
| <b>Figura 12:</b> Cultivos de células Vero após 24hs de exposição aos extratos e frações de <i>A. sisalana</i> (Obj x20)  | 68 |
| <b>Figura 13:</b> Perfil cromatográfico em 280 nm da fração flavonoídica de <i>A. sisalana</i>  | 69 |
| <b>Figura 14:</b> Perfil cromatográfico em 240 nm da fração saponínica de <i>A. sisalana</i>  | 70 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ALT: alanina aminotransferase  
AST: aspartato aminotransferase  
CE<sub>50</sub>: concentração efetiva para inibir 50%  
CE<sub>90</sub>: concentração efetiva para inibir 90%  
CI<sub>50</sub>: concentração inibitória 50%  
CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodos  
DMF: dimetil formamida  
EA: extrato aquoso  
EDTA: ácido etileno diaminotetracético  
EE: extrato acetato de etila  
FF: fração flavonoídica  
FS: fração saponínica  
GGT: gama glutamiltransferase  
kg: kilograma  
L<sub>1</sub>: larvas de primeiro estágio  
L<sub>2</sub>: larvas de segundo estágio  
L<sub>3</sub>: larvas de terceiro estágio  
MeOH: metanol  
mg: miligrama  
mL: mililitro  
µg: micrograma  
MS: matéria seca  
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
OPG: ovos por grama de fezes  
PV: peso vivo  
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*  
SDS: duodecil sulfato de sódio  
VERO: linhagem celular de rim de macaco verde africano

## SUMÁRIO

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | <b>INTRODUÇÃO</b>   | 13 |
| 2       | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>  | 15 |
| 2.1     | PARASIToses GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS                                    | 15 |
| 2.2     | PLANTAS COM ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA EM PEQUENOS RUMINANTES                | 19 |
| 2.3     | <i>Agave sisalana</i> Perr.(SISAL)  | 30 |
| 2.3.1   | <b>Distribuição geográfica e produção de fibras e resíduo</b>               | 30 |
| 2.3.2   | <b>Descrição botânica</b>   | 30 |
| 2.3.3   | <b>Constituição e composição química</b>                                    | 33 |
| 2.3.3.1 | Saponinas   | 33 |
| 2.3.3.2 | Flavonoides   | 35 |
| 2.3.4   | <b>Atividades biológicas</b>  | 37 |
| 2.4     | ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA E TOXICIDADE DE SAPONINAS                         | 39 |
| 2.5     | ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA E TOXICIDADE DE FLAVONOIDES                       | 43 |
| 3       | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 48 |
| 3.1     | OBTENÇÃO DO RESÍDUO DE <i>A. sisalana</i>                                   | 48 |
| 3.2     | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS e FRAÇÕES FLAVONOÍDICA E SAPONÍNICA                   | 48 |
| 3.3     | AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA <i>IN VITRO</i>                                   | 51 |
| 3.3.1   | <b>Atividade ovicida</b>  | 51 |
| 3.3.2   | <b>Atividade larvicida</b>  | 51 |
| 3.4     | AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA <i>IN VIVO</i>                                    | 52 |
| 3.4.1   | <b>Animais</b>  | 52 |
| 3.4.2   | <b>Tratamento</b>   | 53 |
| 3.4.3   | <b>Análises parasitológicas</b>   | 53 |
| 3.4.4   | <b>Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos</b>       | 53 |
| 3.4.5   | <b>Avaliação anatomo-histopatológica</b>                                    | 54 |
| 3.5     | AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO                                 | 54 |
| 3.5.1   | <b>Cultivos de células</b>  | 54 |
| 3.5.2   | <b>Tratamento dos cultivos de células</b>                                   | 55 |
| 3.5.3   | <b>Avaliação da função mitocondrial pela redução do MTT</b>                 | 55 |
| 3.5.4   | <b>Avaliação da integridade da membrana pela exclusão ao azul de tripan</b> | 55 |
| 3.6     | ANÁLISE ESTATÍSTICA   | 56 |
| 4       | <b>RESULTADOS</b>   | 57 |
| 4.1     | AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA <i>IN VITRO</i>                                   | 57 |
| 4.1.1   | <b>Atividade ovicida</b>  | 57 |
| 4.1.2   | <b>Atividade larvicida</b>  | 58 |
| 4.2     | AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA <i>IN VIVO</i>                                    | 58 |
| 4.2.1   | <b>Análises parasitológicas</b>   | 58 |
| 4.2.2   | <b>Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos</b>       | 61 |
| 4.2.3   | <b>Avaliação anatomo-histopatológica</b>                                    | 65 |
| 4.3     | AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO                                 | 66 |
| 4.4     | ANÁLISES DAS FRAÇÕES DE <i>A. sisalana</i> POR CLAE-DAD                     | 69 |

|   |                    |    |
|---|--------------------|----|
| 5 | <b>DISCUSSÃO</b>   | 71 |
| 6 | <b>CONCLUSÕES</b>  | 78 |
|   | <b>REFERÊNCIAS</b> | 79 |
|   | <b>ANEXOS</b>      | 90 |

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura representa uma das principais atividades econômica na região Nordeste do Brasil, e vem despontando no cenário pecuário nacional como opção de diversificação da produção, inserção de pequenos produtores no agronegócio e fixação do homem no campo (SOUZA, 2007). A maioria dos rebanhos caprinos é explorada em sistema extensivo, não sendo adotadas práticas adequadas de manejo alimentar e sanitário, o que vem contribuindo para o baixo desempenho produtivo e reprodutivo destes rebanhos. Dentre os problemas sanitários que acometem esses animais, destacam-se as parasitoses gastrintestinais (VIEIRA, 2008).

As infecções parasitárias causadas por nematoides gastrintestinais constituem uma das enfermidades mais frequentes em caprinos, e são responsáveis por prejuízos econômicos significativos em decorrência da perda de peso, crescimento tardio e redução da produção de leite. O método de controle das verminoses mais empregado é o uso de anti-helmínticos sintéticos (MOLENTO et al., 2011). Entretanto, o desenvolvimento de resistência dos nematoides gastrintestinais aos medicamentos comercializados, associado aos riscos da presença destes produtos no meio ambiente e em alimentos de origem animal, tem incentivado a busca de novos princípios ativos que sejam menos tóxicos e mais eficientes (NERY et al., 2009).

Neste contexto, os produtos de origem vegetal para o tratamento das parasitoses merecem destaque, uma vez que poderão contribuir para a redução do uso de substâncias sintéticas e prolongar a vida útil dos medicamentos disponíveis (VIEIRA, 2008). O Brasil apresenta uma vasta flora que propicia a busca de compostos ativos com atividade anti-helmíntica devido a sua diversidade de espécies vegetais (ALMEIDA et al., 2007), incluindo a *Chenopodium ambrosioides* (KETZI et al., 2002), a *Eucalyptus staigeriana* (MACEDO et al., 2010) e a *Carica papaya* (BUTTLE et al., 2011) com atividade antinematóide *in vivo* em pequenos ruminantes. Este efeito antiparasitário está relacionado à ação dos metabólitos secundários, como taninos, alcalóides, glicosídeos e saponinas (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004).

A *Agave sisalana* (sisal) é a principal fonte de extração de fibras duras do mundo, correspondendo a aproximadamente 70% da produção comercial de todas as fibras desse tipo. O Brasil se destaca como maior produtor e exportador mundial de sisal, sendo a exploração concentrada na região Nordeste, principalmente no estado da Bahia (SANTOS, 2006). O cultivo do sisal é de grande importância para a economia nordestina porque torna produtivas áreas semi-áridas, com poucas opções de exploração de outras culturas, devido às condições

climáticas desfavoráveis da região. Durante o processamento das folhas para a produção de fibras apenas 4% das mesmas são aproveitadas, sendo o restante descartado na forma de resíduo (BANDEIRA e SILVA, 2006).

Para o aproveitamento do resíduo de sisal, estudos têm indicado a sua utilização como adubo orgânico (BANDEIRA e SILVA, 2006), suplemento na alimentação de ruminantes (GEBREMARIAM e MACHIN, 2008) e matéria-prima para a produção de medicamentos (DEBNATH et al., 2010). Uma melhor exploração do sisal poderá contribuir para a diversificação do setor agropecuário brasileiro, por agregar valor aos produtos manufaturados e preservar o meio ambiente pelo o uso racional desses resíduos.

A *A. sisalana* apresenta diversas atividades biológicas, incluindo antibacteriana (SANTOS et al., 2009), antifúngica (PIRES e PURCHIO, 1991), inseticida (KERIKO e MUTUA, 2008) e anti-helmíntica (DOMINGUES et al., 2010). Dentre os fitoquímicos isolados desta planta, destacam-se ácidos graxos, esteroides, poliols, saponinas esteroidais e flavonoides (ZOU et al., 2006; CHEN et al., 2009; BRANCO et al., 2010).

Os efeitos antiparasitário de saponinas e flavonoides extraídos de plantas têm sido descritos (LAKSHMI et al., 2010; DOLIGALSKA et al., 2011). As saponinas são constituídas por um núcleo lipofílico ligado a uma ou mais cadeias de carboidratos hidrossolúveis, e apresentam ação detergente e emulsificante. As atividades biológicas das saponinas estão relacionadas com sua capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolípídeos das membranas, o que pode levar a desestabilização das membranas e consequente aumento da permeabilidade celular (SCHENKEL et al., 2010). A ação de flavonoides sobre parasitos tem sido associada às alterações na atividade de várias enzimas e/ou nos processos metabólicos (KERBOEUF et al., 2008).

A eficácia anti-helmíntica *in vitro* do resíduo líquido de sisal foi demonstrada sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos (SILVEIRA, 2009; DOMINGUES et al., 2010). A administração por via oral desse resíduo em caprinos resultou em baixo percentual de redução do número de parasitos adultos e não influenciou nos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos dos animais (DOMINGUES et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos *in vitro* de extratos e frações de *A. sisalana* sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos e investigar a citotoxicidade sobre cultivos de células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano), além de determinar *in vivo* a eficácia anti-helmíntica do extrato aquoso e seus possíveis efeitos tóxicos em caprinos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PARASITOSES GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS

A caprinocultura representa um importante segmento da pecuária nacional. O Brasil detém um expressivo rebanho caprino, cerca de 9,2 milhões de cabeças, com 90,6% concentrado na região nordeste, principalmente nas áreas semi-áridas. O Estado da Bahia possui o maior efetivo de caprinos do país, estimado em aproximadamente três milhões de animais (IBGE, 2009b). A capacidade de adaptação e resistência destes animais à seca favorece o desenvolvimento dessa atividade na região, desempenhando um importante papel socioeconômico por proporcionar geração de emprego e renda, inserção de pequenos produtores no agronegócio e redução do êxodo rural (SILVA, O. et al., 2008).

Apesar do rebanho representativo, a caprinocultura brasileira ainda apresenta baixos índices de produtividade. Este desempenho insatisfatório está relacionado ao baixo uso de tecnologias e prática inadequadas de manejo sanitário, reprodutivo e nutricional. As parasitoses gastrintestinais representam a enfermidade de maior frequência em caprinos e constituem um dos fatores mais importantes na redução da produtividade dos rebanhos. Estas infecções resultam em mortalidade e principalmente, comprometem o processo produtivo, devido à redução do crescimento, do ganho de peso, da produção de leite, alterações reprodutivas, além de interferir na qualidade da carcaça (VIEIRA, 2005; COSTA, V. et al., 2009).

Na região nordeste do Brasil, os nematoides de maior prevalência e importância econômica em caprinos são *Haemonchus contortus*, localizado no abomaso; *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, parasitam o intestino delgado; e *Oesophagostomum columbianum*, encontrado no intestino grosso (VIEIRA et al., 1997). Levantamento na região semi-árida do Ceará demonstrou alta ocorrência de nematoides (95,9%) em caprinos, e as espécies de maior predominância foram *H. contortus* e *T. axei* (AROSEMENA, 1999). No estado da Bahia, as frequências dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum* em cultivos de fezes de caprinos corresponderam a 92, 33 e 29%, respectivamente (ALMEIDA et al., 1997).

O ciclo biológico dos nematoides trichostrongilídeos é direto, com uma fase de vida livre e uma parasitária, que se desenvolve no animal. A fase de vida livre é iniciada com a eliminação de ovos nas fezes para o meio ambiente, onde estes ovos tornam-se embrionados, ocorrendo em seguida a eclosão e liberação das larvas de primeiro estágio (L<sub>1</sub>). As larvas L<sub>1</sub>

sofrem duas mudas e evoluem para a larva infectante (L<sub>3</sub>), que migram do bolo fecal para a pastagem. A fase parasitária inicia-se com a infecção do animal através da ingestão de larvas L<sub>3</sub>, que alcançam o abomaso ou intestino e invadem a mucosa. A larva L<sub>3</sub> libera a bainha retida da L<sub>2</sub> dentro do trato gastrointestinal, sendo o estímulo para o desembainhamento fornecido pelo hospedeiro. Em resposta a este estímulo, a larva libera seu fluido de desembainhamento, contendo a enzima leucina-amiopeptidase. As larvas L<sub>3</sub> evoluem para os estádios L<sub>4</sub> e L<sub>5</sub> (parasito adulto). Fêmeas e machos copulam, ocorre a ovopostura e tem início um novo ciclo (TAYLOR et al., 2010).

A membrana do ovo de *H. contortus* é formada por três camadas: uma membrana interna impermeável composta por lipídios e proteínas, uma camada média, resistente e quitinosa, e uma camada externa vitelínica (MANSFIELD et al., 1992). A eclosão de ovos é iniciada por estímulos ambientais que leva a liberação de enzimas de eclosão. Estas enzimas estão presentes no fluido de eclosão dos nematoides, sendo que em ovos de *H. contortus* foram identificadas proteases, lipases, quitinases,  $\alpha$  e  $\beta$  glicosidases e leucinas aminopeptidases. A inibição da atividade destas enzimas pode resultar em redução da taxa de eclosão ou inibição completa do processo (ROGERS e BROOKS, 1977), enquanto que a adição de enzimas apropriadas em ovos de *H. contortus* promove alterações na estrutura das membranas semelhantes às observadas durante o processo normal de eclosão (MANSFIELD et al., 1992).

Os dois primeiros estádios larvares se alimentam de bactérias, enquanto a L<sub>3</sub>, protegida do ambiente pela cutícula retida da L<sub>2</sub>, não pode alimentar-se e sobrevive com os nutrientes acumulados nos estádios iniciais (TAYLOR et al., 2010). A L<sub>3</sub> é revestida por duas cutículas: a primeira que foi sintetizada antes da segunda muda e que permanece aderida ao corpo da larva e a segunda que é retida envolvendo-a. No espaço entre as duas cutículas, encontra-se um líquido, rico em glicoproteínas, que tem função lubrificante, impedindo a abrasão entre as cutículas (BIRD, 1990).

A cutícula dos nematoides é uma fina membrana externa constituída principalmente por proteínas e pequena quantidade de lipídios e carboidratos. Essa membrana é formada por três camadas: região basal e medial, composta principalmente por colágeno, região epicuticular e cortical externa, formada por outras proteínas, sem colágeno, e superfície externa, formada por proteínas não estruturais (FETTERER e RHOADS, 1993).

As infecções são geralmente mistas e os sinais clínicos variam de acordo com a idade, imunidade, estado nutricional do hospedeiro, intensidade da carga parasitária e as espécies de nematoides. Geralmente, a fase aguda é caracterizada por anemia, perda de peso,



desidratação, diarreia, hipoproteinemia, pelos arrepiados e sem brilho, enquanto que na fase crônica observa-se edema submandibular, debilidade e redução do desempenho. Altas taxas de mortalidade estão associadas à elevada carga parasitária e os animais jovens são mais susceptíveis (SANTA ROSA, 1996).

O *H. contortus* é considerado um nematoide de grande importância pelo fato de apresentar alta prevalência e patogenicidade (VIEIRA, 2005). A hemoncose é caracterizada por anemia hemorrágica em função do hábito hematófago do parasito, que é capaz de remover cerca de 0,05 mL de sangue diariamente por ingestão e extravasamento das lesões. Na hemoncose aguda verifica-se anemia, edema submandibular, ascite, letargia e fezes escuras, enquanto que a hemoncose crônica está associada à perda de peso progressiva e fraqueza (TAYLOR et al., 2010). O *H. contortus* causa alterações no abomaso, como edema da mucosa, submucosa e serosa, descamação das células epiteliais, ulceração e infiltração de leucócitos, com predominância de eosinófilos (SANTA ROSA, 1996).

Os principais sinais clínicos da infecção por *T. colubriformis* são perda de peso e diarreia, frequentemente de coloração escura. Este parasito forma túneis subepiteliais na mucosa do intestino delgado, que ao se romperem para liberar os helmintos jovens, causam hemorragia e edema com perdas de proteínas plasmáticas, podendo levar a hipoalbuminemia e hipoproteinemia. As alterações macroscópicas consistem em enterite, principalmente no duodeno, vilosidades distorcidas e achatadas, inflamação e edema na mucosa (TAYLOR et al., 2010).

Os animais infectados por *O. columbianum* apresentam diarreia esverdeada escura, rápida perda de peso e prostração. No intestino, as larvas infectantes migram profundamente para dentro da mucosa, causando uma resposta inflamatória com a formação de nódulos. Microscopicamente, estes nódulos são formados por nematoides ou seus remanescentes e tecido necrosado, infiltrado por leucócitos e macrófagos (TAYLOR et al., 2010)

O controle dessas parasitoses é baseado quase exclusivamente no tratamento dos animais com anti-helmínticos sintéticos. Este tipo de controle, na maioria das vezes, é realizado de forma incorreta com o uso excessivo e desordenado das bases farmacológicas, o que tem como consequência o surgimento da resistência parasitária (LIMA et al., 2010). Dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal indicam que as despesas com antiparasitários representam 34% do faturamento do mercado veterinário brasileiro, refletindo a importância e necessidade de controle desses parasitos no contexto da saúde animal (SIDAN, 2009).

A resistência é o fenômeno que impede um medicamento de apresentar a mesma eficácia contra os parasitos, se utilizado nas mesmas condições e após um determinado período de tempo (MOLENTO, 2004). A presença de cepas de nematoides gastrintestinais resistentes aos vários grupos químicos tornou-se uma realidade mundial, incluindo a multirresistência as três principais classes de produtos disponíveis (benzimidazóis, imidazóis e lactonas macrocíclicas) (KAMINSKY et al., 2008). Um dos mecanismos relacionados ao fenômeno de multiresistência aos medicamentos anti-helmínticos corresponde ao aumento da expressão de glicoproteínas (P-gp) no parasito. As P-gp são proteínas transmembranárias que têm papel protetor contra xenobióticos potencialmente tóxicos, atuando como bombas de efluxo, reduzindo a concentração intracelular destas substâncias (MOLENTO e PRICHARD, 2001).

Dentre os fatores que contribuem para o desenvolvimento da resistência, destaca-se o curto intervalo entre tratamentos, uso de subdosagens e rápida alternância de diferentes grupos de vermífugos (MOLENTO, 2004). A utilização de anti-helmínticos em caprinos na posologia recomendada para ovinos é uma prática comum entre os produtores, entretanto o metabolismo dessas substâncias ocorre de forma mais rápida em caprinos, o que pode explicar a maior incidência de parasitos resistentes nesta espécie animal (HOSTE et al., 2010).

A resistência parasitária em pequenos ruminantes encontra-se amplamente disseminada no Brasil. Na região Nordeste, há registros de resistência ao oxfendazole no Ceará (MELO et al., 2009), à ivermectina e ao albendazol em Pernambuco (LIMA et al., 2010), Rio Grande do Norte (PEREIRA et al., 2008) e Paraíba (RODRIGUES et al., 2007), e à moxidectina na Paraíba (RODRIGUES et al., 2007). No estado da Bahia, Borges (2003) demonstrou, *in vitro*, a baixa eficácia de benzimidazóis sobre os gêneros *Haemonchus* e *Trichostrongylus* de caprinos, enquanto que Barreto et al. (2005) observaram grandes variações na eficácia do tratamento de caprinos e ovinos com ivermectina (17 a 100%), albendazol (0 a 97%), levamisol (66 a 100%) e abamectina (0 a 50%).

O uso intensivo de produtos antiparasitários representa um risco à saúde pública, uma vez que, os anti-helmínticos administrados aos animais podem ser eliminados nas fezes contaminando o meio ambiente e permanecer como resíduos nos produtos de origem animal. O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) detectou a presença de avermectinas em níveis de contaminação superiores ao permitido pela legislação brasileira em 4,39% das amostras de leite de vaca (MAPA, 2009) e em 4,13% das amostras de fígado bovino (MAPA, 2010). Estudo sobre o impacto da eliminação de ivermectina em fezes de bovinos demonstrou que este produto interferiu de forma negativa na colonização natural do

material fecal por invertebrados e retardou a degradação das fezes no ambiente (IGLESIAS et al., 2005).

Estes fatos têm levado ao desenvolvimento de pesquisas sobre métodos de controles complementares, tais como a seleção de animais resistentes (AMARANTE et al., 2004), controle biológico pela utilização de fungos nematófagos (ARAÚJO et al., 2007), rotação de pastagem ou pastejo alternado com outras espécies animais (FERNANDES et al., 2004), homeopatia e uso de produtos de origem vegetal (CHAGAS et al., 2008).

## 2.2 PLANTAS COM ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA EM PEQUENOS RUMINANTES

As plantas medicinais são tradicionalmente utilizadas como agente terapêutico para o homem e animais, atuando como fonte de matéria-prima para a síntese de novos medicamentos. Das 1010 drogas descobertas entre os anos de 1981 a 2006, cerca de 30% são derivadas de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007). Alguns exemplos de substâncias obtidas a partir de plantas são quinina e quinidina (antimalárico) isoladas da *Cinchona* spp., morfina e codeína (analgésicos) provenientes de *Papaver somniferum* e vincristina e vinblastina (anticancerígenos) oriundas da *Catharanthus roseus* (RATES, 2001).

Diversas plantas têm sido empregadas por produtores rurais para o tratamento de várias enfermidades em animais, incluindo as parasitoses (MARINHO et al., 2007). No entanto, as atividades biológicas de plantas devem ser confirmadas cientificamente, considerando suas disponibilidades regionais e seus efeitos tóxicos. As pesquisas com plantas para o controle das parasitoses dos animais devem estar inseridas em um contexto agroecológico, no qual se deve buscar o manejo sustentável dos recursos naturais, associados à preservação das espécies vegetais em seus ecossistemas e a produção animal (NERY et al., 2009).

A validação científica de plantas com atividade antiparasitária requer a realização de testes *in vitro* e *in vivo* para a determinação da sua eficácia. Dentre os ensaios *in vitro* utilizados para a avaliação da atividade anti-helmíntica de plantas, destacam-se os testes de inibição da eclosão de ovos, do desenvolvimento larvar, da migração larvar e da motilidade de parasitos adultos. Estes testes caracterizam-se por facilidade de execução, baixo custo e rapidez em relação aos estudos *in vivo* e permitem uma triagem do efeito de diferentes de plantas, indicando as espécies vegetais mais promissoras (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

A avaliação *in vivo* da eficácia anti-helmíntica geralmente é realizada através do teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) ou do teste controlado. O TRCOF fornece uma estimativa da diminuição na excreção de ovos após o tratamento, enquanto que no teste controlado a eficácia é avaliada comparando-se as cargas parasitárias nos grupos tratados em relação ao grupo controle. O teste controlado é uma análise mais dispendiosa em termos de requerimentos de mão-de-obra e de animais, porém é mais confiável em comparação ao TRCOF, pois nem sempre é observada uma boa correlação entre a produção de ovos e o número real de parasitos (TAYLOR et al., 2002).

Os estudos toxicológicos também são necessários para a determinação da segurança do uso de plantas em animais. A avaliação toxicológica pode envolver a investigação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade sub-crônica e crônica). Outros estudos como toxicidade reprodutiva, efeitos neurotóxicos, teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos podem fazer parte de uma avaliação mais detalhada do potencial tóxico de produtos de origem vegetal (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Estudo de revisão sobre atividade anti-helmíntica *in vitro* ou *in vivo* de plantas em pequenos ruminantes revelou que de 64 espécies vegetais avaliadas, 27 apresentaram eficácia acima de 90%. As espécies *Aster lanceolatus*, *Croton zehneri*, *Cymbopogon citratus*, *Dicksonia sellowiana*, *Digitaria insularis*, *Genipa americana*, *Lippia sidoides*, *Mangifera indica*, *Melia azedarach*, *Ocimum gratissimum*, *Petiveria alliacea*, *Pterocaulon interruptum*, *Oryza latifolia*, *Spigelia anthelmia* e *Trichilia pallida* foram as que apresentaram resultados mais promissores nas pesquisas realizadas no Brasil (NERY et al., 2009). Ensaio *in vitro* têm demonstrado o efeito de diversas plantas sobre diferentes estádios de desenvolvimento de nematoides gastrintestinais (Tabela 1).

**Tabela 1:** Estudos *in vitro* sobre o efeito de plantas contra nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes

| Espécie                                    | Parte utilizada | Extrato         | Parasito  | Concentração       | Princípio Ativo                               | Eficácia   | Referência                |
|--|-----------------|-----------------|---|--------------------|---|--|---------------------------|
| <i>Acacia nilotica</i>                     | Fr              | M               | <i>H. contortus</i>   | 31,25 a 8000 µg/mL | Taninos condensados                           | Inibição eclosão de ovos (CE <sub>50</sub> = 512 µg/mL), do desenvolvimento larval (195 µg/mL) e da motilidade de parasito adulto (8000 µg/mL) | BACHAYA et al. (2009)     |
| <i>Acacia pennatula</i>                    | F               | Ac:A            | <i>H. contortus</i>   | 1200 µg/mL         | Taninos                                       | Inibição da migração (43%) e da eliminação de cutícula de L <sub>3</sub> (97%)   | ALONSO-DIAZ et al. (2008) |
| <i>Adhatoda vasica</i>                     | PA              | A e E           | <i>H. contortus</i> , <i>Trichostrongylus spp.</i> ; <i>Oestertagia circumcincta</i> ; <i>S. papillosus</i> e <i>O. columbianum</i> | 3,12 a 50 mg/mL    | Alcaloides (vasicina, vascinona) e saponinas  | Maior inibição da eclosão de ovos e desenvolvimento larval para o extrato etanólico (50mg/mL)  | AL-SHAIBANI et al. (2008) |
| <i>Azadirachta indica</i>                  | F               | AcE e E         | <i>H. contortus</i>   | 0,19 a 50 mg/mL    | -   | Inibição da eclosão de ovos: AcE (51,3%) e E (100%)<br>Inibição do desenvolvimento larval: AcE (68,1%) e E (87,1%)                             | COSTA et al. (2008)       |
| <i>Castanea sativa</i>                     | T               | HE              | <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i>   | 600 µg/mL          | Taninos condensados                           | Inibição total do desembainhamento de L <sub>3</sub> de ambos nematoides   | BAHUAUD et al. (2006)     |
| <i>Chenopodium ambrosioides</i>            | F               | O               | <i>H. contortus</i>   | 1,3 e 3,33 µL/mL   | Ascaridole                                    | Inibição da eclosão de ovos (100%)   | KETZIS et al. (2002)      |
| <i>Cichorium intybus</i> (dois cultivares) | F               | ELS             | <i>H. contortus</i>   | 1,67 a 10 mg/mL    | Lactonas-sesquiterpênicas (8-deoxilactucina)  | Inibição da eclosão de ovos: CE <sub>50</sub> = 2,6 e 6,4 mg/mL  | FOSTER et al. (2011)      |
| <i>Cocos nucifera</i>                      | Fr              | AcE             | <i>H. contortus</i>   | 0,31 a 80 mg/mL    | Taninos condensados, flavonoides e esteroides | Inibição da eclosão de ovos (CE <sub>50</sub> = 2,2 mg/mL) e do desenvolvimento larval (CE <sub>50</sub> = 40,5 mg/mL)                         | OLIVEIRA et al. (2009)    |
| <i>Combretum molle</i>                     | F               | Ac, H, B, C e M | <i>H. contortus</i>   | 0,0075 a 1 µg/mL   | Saponinas                                     | Inibição eclosão de ovos (C) e do desenvolvimento larval (todos os extratos)   | ADEMOLA et al. (2010)     |

Continua...

|                               |       |          |   |                     |  |   |                                 |
|-------------------------------|-------|----------|---|---------------------|--|---|---------------------------------|
| <i>Coriandrum sativum</i>     | S     | A e HE   | <i>H. contortus</i>                           | 0,03125 a 8,0 mg/mL | Alcaloides e flavonoides                       | Inibição da eclosão de ovos: A (CE <sub>50</sub> = 0,12 mg/mL) e HE (CE <sub>50</sub> = 0,18 mg/mL)<br>Inibição da motilidade de adultos: A (45%) e HE (85%)            | EGUALE et al. (2007b)           |
| <i>Cucurbita moschata</i>     | S     | A, M e D | <i>H. contortus</i>                           | 75 a 2400 µg/mL     | Compostos aminoácidos, terpenoides e saponinas | Inibição da eclosão de ovos (M), do desenvolvimento larvar (A, M e D) e da migração de L <sub>3</sub> (A e M)   | MARIE-MAGDELEINE et al. (2009)  |
| <i>Erica erigena</i>          | T     | HE       | <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> | 600 µg/mL           | Taninos condensados                            | Retardo do desembainhamento de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>  | BAHUAUD et al. (2006)           |
| <i>Eucalyptus staigeriana</i> | F     | O        | <i>H. contortus</i>                           | 0,08 a 5,4 mg/mL    | Limoneno e citral                              | Inibição da eclosão de ovos (CE <sub>50</sub> = 0,324mg/mL) e do desenvolvimento larval (CE <sub>50</sub> = 1,7 mg/mL)  | MACEDO et al. (2010)            |
| <i>Hedera helix</i>           | Fr    | A e HE   | <i>H. contortus</i>                           | 0,0625 a 8 mg/mL    | Saponinas, alcaloides e flavonoides            | Inibição da eclosão de ovos: A (CE <sub>50</sub> = 0,12 mg/mL) e HE (CE <sub>50</sub> = 0,17mg/mL)<br>Inibição da motilidade parasitos: A (9,17%) e HE (66,67%)         | EGUALE et al. (2007a)           |
| <i>Leucena leucocephala</i>   | F     | Ac:A     | <i>H. contortus</i>                           | 1200 µg/mL          | Taninos  | Inibição da migração (44%) e da eliminação de cutícula de L <sub>3</sub> (89%)  | ALONSO-DIAZ et al. (2008)       |
| <i>Lippia sidoides</i>        | F     | HE       | Nematoides gastrintestinais                   | 1 a 500 mg/mL       | -  | Inibição da eclosão de ovos (100% na maior concentração)  | SOUZA et al. (2010)             |
| <i>Lysiloma latisiliquum</i>  | F     | Ac:A     | <i>H. contortus</i>                           | 1200 µg/mL          | Taninos  | Inibição da migração (33%) e da eliminação de cutícula de L <sub>3</sub> (95%)  | ALONSO-DIAZ et al. (2008)       |
| <i>Manihot esculenta</i>      | F     | A, M e D | <i>H. contortus</i>                           | 75 a 2400 µg/mL     | Taninos condensados e terpenoides              | Inibição do desenvolvimento larvar: M (CE <sub>50</sub> = 0,85 mg/mL)<br>Não houve redução da eclosão de ovos, da migração de L <sub>3</sub> e da motilidade de adultos | MARIE-MAGDELEINE et al. (2010a) |
| <i>Melia azedarach</i>        | F e S | H, E e C | <i>H. contortus</i>                           | 3,12 a 50 mg/mL     | Taninos condensados, triterpenos e alcaloides  | Maior atividade ovicida: Ext. E das sementes (CE <sub>50</sub> = 0,36 mg/mL)<br>Maior atividade larvicida: Ext. E das folhas (CE <sub>50</sub> = 9,18 mg/mL)            | MACIEL et al. (2006)            |
| <i>Ocimum gratissimum</i>     | PA    | O        | <i>H. contortus</i>                           | 0,0625 a 1%         | Eugenol  | Inibição da eclosão de ovos (100%)  | PESSOA et al. (2002)            |

Continua...

|                                   |           |               |   |                    |  |  |                                 |
|-----------------------------------|-----------|---------------|---|--------------------|--|--|---------------------------------|
| <i>Onobrychis viciifolia</i>      | F         | FTC<br>FFG    | e <i>H. contortus</i>                         | 1200 µg/mL         | Taninos condensados e flavonoides glicosilados | Inibição da migração de L <sub>3</sub> : frações (50%), rutina (25%), nicotiflorina (30%) e narcissina (35%)   | BARRAU et al. (2005)            |
| <i>Pinus sylvestris</i>           | T         | HE            | <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> | 600 µg/mL          | Taninos condensados                            | Retardo do desembainhamento de L <sub>3</sub> de ambas as espécies   | BAHUAUD et al. (2006)           |
| <i>Piscidia piscipula</i>         | F         | Ac:A          | <i>H. contortus</i>                           | 1200 µg/mL         | Taninos  | Inibição da eliminação de cutícula de L <sub>3</sub> (95%)   | ALONSO-DIAZ et al. (2008)       |
| <i>Sorothammus scoparius</i>      | T         | HE            | <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> | 600 µg/mL          | Taninos condensados                            | Sem atividade sobre o desembainhamento de L <sub>3</sub>   | BAHUAUD et al. (2006)           |
| <i>Spigelia anthemia</i>          | PA        | H, C, AcE e M | <i>H. contortus</i>                           | 3,1 a 50 mg/mL     | Alcaloides e flavonoides                       | Inibição da eclosão de ovos: AcE (100%), M (97%) e do desenvolvimento larval: AcE (81,2%) e M (84,4%)  | ASSIS et al. (2003)             |
| <i>Struthiola argentea</i>        | T         | Flavonas      | <i>H. contortus</i>                           | -                  | Flavonas                                       | Inibição do desenvolvimento larval (CE <sub>90</sub> = 3,1 a 61 µg/mL)   | AYERS et al. (2008)             |
| <i>Swertia chirata</i>            | T         | A e M         | <i>H. contortus</i>                           | 25 mg/mL           | -  | Inibição da motilidade de parasitos adultos: M (90%)   | IQBAL et al. (2006)             |
| <i>Tabernaemontana citrifolia</i> | F, Fr e R | A, M e D      | <i>H. contortus</i>                           | 75 a 2400 µg/mL    | Alcaloides                                     | Ext. D da raiz: inibição da eclosão de ovos (CE <sub>50</sub> = 2,32 mg/mL) e da motilidade de adultos (CE <sub>50</sub> = 0,3 mg/mL)<br>Ext. M da folha: inibição da migração larvar (56%)<br>Ext. M e A das folhas: inibição do desenvolvimento larvar (CI <sub>50</sub> = 0,02 mg/mL) | MARIE-MAGDELEINE et al. (2010b) |
| <i>Ziziphus nummularia</i>        | C         | M             | <i>H. contortus</i>                           | 31,25 a 8000 µg/mL | Taninos condensados                            | Inibição eclosão de ovos (CE <sub>50</sub> = 676 µg/mL), do desenvolvimento larvar (398 µg/mL) e da motilidade de parasito adulto (8000µg/mL)  | BACHAYA et al. (2009)           |

C: casca; F: folhas; Fr: frutos; PA: parte aérea; R: raiz; S: sementes; T: toda planta.

Extratos: A: aquoso; Ac: acetona; AcE: acetato de etila; B: butanol; C: clorofórmio; D: diclorometano; E: etanol; ELS: extrato rico em lactonas sesquiterpênicas; FTC: fração taninos condensados; FFG: fração flavonoides glicosilados; HE: hidroetanólico; M: metanol; O: óleo essencial

As propriedades terapêuticas de plantas podem ser atribuídas a uma substância e/ou a combinação de compostos, produzidos pelo metabolismo secundário do vegetal. Os metabólitos secundários não são compostos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, mas sua produção está associada à defesa da planta contra agentes externos, como microorganismos, insetos e predadores superiores, proteção contra raios ultravioleta e atração de polinizadores. Os metabólitos secundários são armazenados pelas plantas em quantidades menores que os metabólitos primários, e sua biossíntese ocorrem geralmente em células especializadas, durante estádios específicos do desenvolvimento do vegetal ou em determinadas condições ecológicas ou ambientais. Dentre estes compostos podem-se destacar flavonoides, alcaloides, cumarinas, lignoides, triterpenos, saponinas, polifenóis e taninos (SANTOS, 2010).

Os taninos condensados constituem uma classe de produtos naturais mais estudados para o controle de nematoides em pequenos ruminantes (HOSTE e TORRES-COSTA, 2011). O efeito anti-helmíntico de taninos é atribuído à sua capacidade de ligação com proteínas da cutícula, cavidade oral, esôfago, cloaca e vulva dos nematoides, alterando suas propriedades físicas e químicas. Outra possibilidade refere-se a uma ação indireta destes compostos, que podem aumentar a resposta imune do hospedeiro em função de sua ligação com proteínas da dieta, protegendo essas substâncias da degradação ruminal e consequentemente aumentando a disponibilidade protéica no intestino delgado (HOSTE et al., 2006).

Diversas pesquisas têm evidenciado o potencial anti-helmíntico promissor de plantas ricas em taninos condensados (NERY et al., 2009). Avaliações *in vitro* demonstraram ação de plantas taníferas sobre a eliminação de cutícula e migração larvar de *H. contortus* e *T. colubriformis* (BAHUAUD et al., 2006; BRUNET et al., 2007; ALONZO-DÍAS et al., 2008).

Maior atividade de taninos sobre o desembainhamento de larvas de *H. contortus* em comparação com a ação sobre a migração larvar foi relatada por Alonso-Díaz et al. (2008) e Alonso-Díaz et al. (2011). Este efeito pode estar relacionado com a presença de proteínas ricas em prolina e hidroxiprolina na bainha, cutícula e fluido de desembainhamento de larvas de nematoides, que possuem alta afinidade por taninos. O processo de desembainhamento é uma importante etapa, que representa a transição da forma livre para o estágio parasitário, que permite as larvas infectarem o hospedeiro (ALONSO-DÍAZ et al., 2011).

O efeito do extrato metanólico de *Manihot esculenta* sobre o desenvolvimento do estágio larvar L<sub>1</sub> para L<sub>3</sub> de *H. contortus* foi relacionado com a presença de taninos condensados e terpenoides (MARIE-MAGDELEINE et al., 2010a). Entretanto, este extrato não apresentou ação sobre ovos, larva L<sub>3</sub> e adultos, possivelmente em função dos compostos



ativos não serem capazes de atravessar ou causar danos nas cutículas destes estádios do parasito.

As avaliações *in vitro* têm revelado potencial anti-helmíntico de flavonoides, como flavonoides glicosilados de *Onobrychis viciifolia* e flavonas de *S. argentea* que reduziram a motilidade de larvas de *H. contortus* (BARRAU et al., 2005; AYERS et al., 2008).

O efeito do extrato aquoso e hidroalcoólico de *C. sativum* sobre a eclosão de ovos e motilidade de adultos de *H. contortus* foi associado à ação de alcaloides e/ou flavonoides (EGUALE et al., 2007b). MARIE-MAGDELEINE et al. (2010b) também sugeriram que alcaloides estão relacionados com a atividade anti-helmíntica de *T. citrifolia*. Os extratos aquoso, metanólico e diclorometano isolados das folhas, frutos e raiz interferiram na eclosão de ovos, motilidade de adultos, desenvolvimento e migração larvar.

A elevada atividade ovicida e larvicida dos extratos aquoso e etanólico de *Adhatoda vasica* em testes de eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de nematoides gastrintestinais de ovinos foi relatada por AL-SHAIBANI et al. (2008). O estudo fitoquímico desta planta revelou que seus principais componentes são alcaloides (vasicina e vasicinona) e saponinas.

Os extratos das sementes de *C. moschata* mostraram ação *in vitro* sobre quatro estádios diferentes de *H. contortus*, sendo que seus possíveis princípios ativos são compostos aminoácidos (cucurbitina e cucurmosina), terpenoides e saponinas (MARIE-MAGDELEINE et al., 2009). Ademola e Eloff (2010) relataram atividade anti-helmíntica de *C. molle* sobre ovos e larvas de *H. contortus* e correlacionaram este efeito com a presença de saponinas na planta.

Os extratos ricos em lactonas sesquiterpênicas de dois cultivares de *Cichorium intybus* mostraram inibição da eclosão de ovos de *H. contortus*, sendo que o cultivar mais ativo apresentou um maior nível do composto 8-deoxilactucina. O mecanismo de ação desta substância é atribuído a presença do grupo funcional  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona capaz de reagir com proteínas sulfidrilas (FOSTER et al., 2011).

Estudos *in vivo* também já foram realizados com caprinos para avaliação da atividade anti-helmíntica de plantas (Tabela 2). O tratamento desses animais com suspensão de *Schinopsis* sp. (quebracho), rica em taninos condensados (5% da dieta) durante oito dias, resultou em diminuição de 64% do número de ovos por grama de fezes (OPG) de caprinos experimentalmente infectados com *H. contortus*. Como não foi observada diminuição da carga parasitária, este fato indica que a ação dos taninos ocorreu apenas sobre a fecundidade do parasito (PAOLINI et al., 2003). A alimentação de caprinos com folhas secas da planta tanífera *Acacia karoo* (40% de matéria seca) durante oito semanas promoveu redução total do

OPG e diminuição de 34% de parasitos adultos, enquanto que a utilização das folhas de *A. nilotica* não causou nenhuma alteração nos parâmetros parasitológicos. Diferenças no tipo e concentração de taninos entre as duas plantas podem ter influenciado no efeito antiparasitário (KAHIYA et al., 2003).

A adição de feno de *Sericea lespedeza* na dieta de caprinos na concentração de 50 e 75% causou redução do OPG de 84,6 e 91,9%, respectivamente. Apenas para a maior concentração foi observada diminuição significativa do número de parasitos adultos (74%) (TERRIL et al., 2009). JOSHI et al. (2011) também verificou redução do OPG e do estabelecimento de larvas infectantes em caprinos alimentados com as folhas dessa planta, entretanto não houve alteração do número e comprimento de parasitos adulto e da fecundidade das fêmeas de *H. contortus*.

A suplementação de caprinos com grãos de sorgo, contendo alto nível de taninos condensados, não influenciou significativamente no OPG (WHITLEY et al., 2009). Uma preparação comercial de taninos condensados, obtida a partir da casca de *A. mearnsii*, foi avaliada em caprinos na dose de 1,3 e 1,6 g/kg por três dias. A utilização deste produto não levou a diminuição do OPG e de parasitos adultos, mas inibiu a eclosão de ovos em culturas de fezes dos animais tratados (MAX, 2010).

A administração oral do óleo essencial obtido das folhas de *E. staigeriana* (500 mg/kg) a caprinos resultou em redução significativa do OPG (76,5%) quinze dias após o tratamento. Os constituintes químicos presentes no óleo associados com esta atividade foram o citral e limoneno (MACEDO et al., 2010). Dawo e Tibbo (2005) também observaram redução de OPG (50%) de caprinos tratados com a raiz triturada de *Halothamus somalensis* na dose de 2 g/kg. No entanto, investigações sobre os efeitos de *Azadirachta indica* (CHAGAS e VIEIRA, 2007), *C. ambrosioides* (KETZIS et al., 2002) e *Allium sativum* (BATATINHA et al., 2004; BURKE et al., 2009a) em caprinos infectados com nematoides gastrintestinais não revelaram eficácia anti-helmíntica.

A atividade anti-helmíntica de *C. papaya* foi investigada em ovinos, os quais foram tratados com sementes desta planta (80 g de sementes diluídas em 110 mL de água) e não apresentaram alterações no OPG e hematócrito (BURKE et al., 2009a). Resultados promissores com o latex dessa planta foram relatados por Buttle et al. (2011), que ao tratar ovinos com a fração solúvel do látex (117 µmol de cisteína proteinase) durante quatro dias observaram redução do OPG (74,8%) e de *H. contortus* adultos (98%), enquanto que não houve efeito significativo para a espécie *T. colubriformis*. A enzima cisteína proteinase atua interagindo com proteínas da cutícula dos helmintos, causando o enfraquecimento,

aparecimento de bolhas e ruptura, o que leva a liberação de tecidos internos e morte do parasito.

As avaliações da atividade anti-helmíntica de várias plantas têm demonstrado variações nos níveis de eficácia entre os estudos *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vitro*, os extratos estão em contato direto com os parasitos e as concentrações de substâncias potencialmente ativas contidas no mesmo nem sempre correspondem à sua biodisponibilidade *in vivo* (GITHIORI et al., 2006); além da possibilidade de biotransformação desses compostos no organismo animal (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004).

A maioria dos estudos de plantas com potencial antiparasitário tem demonstrado percentuais de eficácia inferiores aos medicamentos sintéticos. Um produto anti-helmíntico é considerado como eficaz quando apresenta percentual de redução do OPG acima de 90% (VERCRUYSSSE et al., 2001). No entanto, Ghitiori et al. (2006) sugerem que seja estabelecido um nível de redução inferior (70%) para os testes de avaliação *in vivo* com preparações de plantas, uma vez que os produtos com moderada atividade anti-helmíntica podem fazer parte de um programa integrado de controle parasitário em sistemas de produção de ruminantes. O manejo integrado consiste na combinação de métodos químicos e não químicos de controle parasitário, com a finalidade de manter níveis aceitáveis de produção sem a eliminação total do agente causal (VIEIRA, 2008).

Nos últimos anos, tem-se observado um notável avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais. As grandes fontes de biodiversidade são as florestas tropicais, localizadas em países em desenvolvimento como o Brasil, que detém cerca de um terço da flora mundial. Contudo, os países desenvolvidos, como EUA, Japão e os europeus são os que mais manufacturam e comercializam produtos naturais (KLEIN et al., 2009).

No Brasil, a falta de integração da indústria farmacêutica com os grupos de pesquisa que estudam plantas medicinais em animais tem dificultado o desenvolvimento de novos produtos, sendo que ainda não se encontra disponível um fitoterápico validado cientificamente contra as nematodioses de pequenos ruminantes. Esta situação se deve principalmente, à variabilidade dos princípios ativos e, conseqüentemente à reprodutibilidade dos resultados de eficácia. Neste sentido, torna-se necessário o incentivo e promoção desta área de pesquisa para possibilitar a obtenção de produtos fitoterápicos (COSTA, C. et al., 2009).

**Tabela 2:** Estudos *in vivo* sobre atividade anti-helmíntica de plantas em caprinos

| <b>Espécie da planta</b>  | <b>Parte utilizada</b> | <b>Dose</b>   | <b>Princípio Ativo</b> | <b>Eficácia</b>   | <b>Referência</b>      |
|---|------------------------|---|------------------------|---|------------------------|
| <i>Acacia mearnsii</i>  | C*                     | 1,3 e 1,6 g/kg/3dias                                      | Taninos condensados    | Não houve redução significativa do OPG<br>Redução da eclosão de ovos em culturas de fezes dos animais tratados                              | Max (2010)             |
| <i>Acacia nilotica</i> e<br><i>A. karoo</i>   | F                      | 40% da dieta/ 8 semanas                                   | Taninos condensados    | <i>A. karoo</i> : redução do OPG (100%) e de <i>H. contortus</i> no abomaso (34%)<br><i>A. nilotica</i> : não houve alteração significativa | KAHIYA et al. (2003)   |
| <i>Allium sativum</i>   | B                      | 40 mL do suco ou 3 bulbos/ animal/7 dias                  | -                      | Não houve redução do OPG  | BURKE et al. (2009a)   |
| <i>Azadirachta indica</i>   | F                      | 30 g de folhas secas/animal/ 5 dias                       | Azadirachtina          | Não houve redução do OPG  | CHAGAS e VIEIRA (2007) |
| <i>Chenopodium ambrosioides</i>   | F                      | 0,1 a 0,4 mL do óleo/kg e 250 g das folhas frescas/animal | Ascaridole             | Nenhum tratamento foi eficaz  | KETZIS et al. (2002)   |
| <i>Eucalyptus staigeriana</i>   | F                      | 500 mg/kg do óleo essencial                               | Limoneno e citral      | Redução do OPG (76,6%)  | MACEDO et al. (2010)   |
| <i>Halothamnus somalensis</i>   | R                      | 0,5 e 2 g da raiz triturada                               | -                      | Redução do OPG (50,3%)  | DAWOO E TIBO (2005)    |
| <i>Onobrychis viciifolia</i>  | F                      | <i>Ad libitum</i> / 9 dias                                | Taninos condensados    | Redução de <i>H. contortus</i> (38,5%)  | PAOLINI et al. (2005)  |
| <i>Pistacia lentiscus</i>   | F                      | <i>Ad libitum</i> / 24 dias                               | Taninos                | Baixa contagem de OPG no grupo tratado  | LANDAU et al. (2010)   |
| Associação de plantas ( <i>Curcubita pepo</i> , <i>A. vulgaris</i> , <i>A. sativum</i> , <i>F. vulgare</i> , <i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Thymus vulgaris</i> e <i>S. rebaudiana</i> )* |                        | 19g/animal/112 dias                                       | -                      | Não houve redução significativa do OPG  | BURKE et al. (2009b)   |
| Associação de plantas( <i>A. absinthium</i> , <i>A. sativum</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Juglans nigra</i> e <i>Stevia rebaudiana</i> )*  |                        | 19g/animal/112 dias                                       | -                      | Não houve redução significativa do OPG  | BURKE et al. (2009b)   |

Continua...

|                          |    |   |                     |   |                       |
|--------------------------|----|---|---------------------|---|-----------------------|
| <i>Schinopsis</i> sp.    | C  | 5% da dieta/9 dias                              | Taninos condensados | Redução de <i>H. contortus</i> (33%)  | PAOLINI et al. (2005) |
| <i>Schinopsis</i> sp.    | C* | Suspensão aquosa (150 mL/animal/8 dias)         | Taninos condensados | Redução do OPG (64%)<br>Não influenciou no número de parasitos adultos  | PAOLINI et al. (2003) |
| <i>Sericea lespedeza</i> | F  | 75% da dieta/6 semanas                          | Taninos condensados | Redução do OPG (91,9%) e do número de parasitos no abomaso (74%)  | TERRILL et al. (2009) |
| <i>Sericea lespedeza</i> | F  | Dieta com feno de <i>S. lespedeza</i> / 28 dias | Taninos condensados | Redução significativa do OPG<br>Não houve alteração do número de parasitos adultos e da fecundidade de fêmeas | JOSHI et al. (2011)   |
| <i>Sorghum bicolor</i>   | G  | <i>Ad libitum</i> /14 e 21 dias                 | Taninos condensados | Não houve redução do OPG  | WHITLEY et al. (2009) |

B: bulbos; C: casca; F: folhas; G: grãos; R: raiz

\* produto comercial

## 2.3 *Agave sisalana* Perr. (SISAL)

### 2.3.1 Distribuição geográfica e a produção de fibras e resíduo

A *A. sisalana*, popularmente conhecida como sisal, é uma planta tropical que sobrevive em ambientes com baixa precipitação pluviométrica e elevada temperatura. Esta espécie tem sua origem no México e encontra-se amplamente distribuída no Nordeste do Brasil e no Leste da África (SUINAGA et al., 2006). O sisal é a principal fonte de fibras duras vegetais do mundo, correspondendo a aproximadamente 70% da produção comercial de todas as fibras deste tipo. O Brasil é o maior produtor mundial e exportador dessa fibra, sendo a exploração concentrada no semi-árido nordestino, especialmente na Bahia, que detém 95% da produção nacional (SANTOS, 2006; IBGE, 2009a).

No Brasil, a agaveicultura se concentra em áreas de pequenos produtores da região semi-árida, com predomínio de agricultura familiar. Nestas regiões, o clima e o solo são pouco favoráveis, com escassas alternativas para a exploração de outras culturas que ofereçam resultados satisfatórios. Dessa forma, essa cultura assume grande importância para a economia do setor agrícola nordestino, responsável por geração de emprego e renda para um contingente de aproximadamente 600 mil pessoas (SILVA, O. et al., 2008).

A fibra do sisal é industrializada e convertida em fios agrícolas, cordas, tapetes, sacos, papel e artesanato. Esta fibra também é empregada na indústria automotiva, de móveis, eletrodomésticos e na construção civil (SILVA, O. et al., 2008). Sua extração é realizada através do desfibramento das folhas, e este processo é caracterizado por baixa eficiência, uma vez que, as fibras produzidas representam apenas 4% das folhas, gerando uma grande quantidade de resíduos, comumente descartados no campo (BANDEIRA e SILVA, 2006). Investigações sobre o aproveitamento desse resíduo têm demonstrado a possibilidade do seu uso na adubação orgânica (BANDEIRA e SILVA, 2006), como suplemento alimentar de ruminantes (GEBREMARIAM e MACHIN, 2008) e matéria-prima na produção de medicamentos (DEBNATH et al., 2010).

### 2.3.2 Descrição botânica

A *A. sisalana*, pertence à classe monocotiledônea, série Liliflorea, família Agavaceae, subfamília *Agavoidea*, gênero *Agave* e subgênero *Euagave*. Deste gênero, somente duas

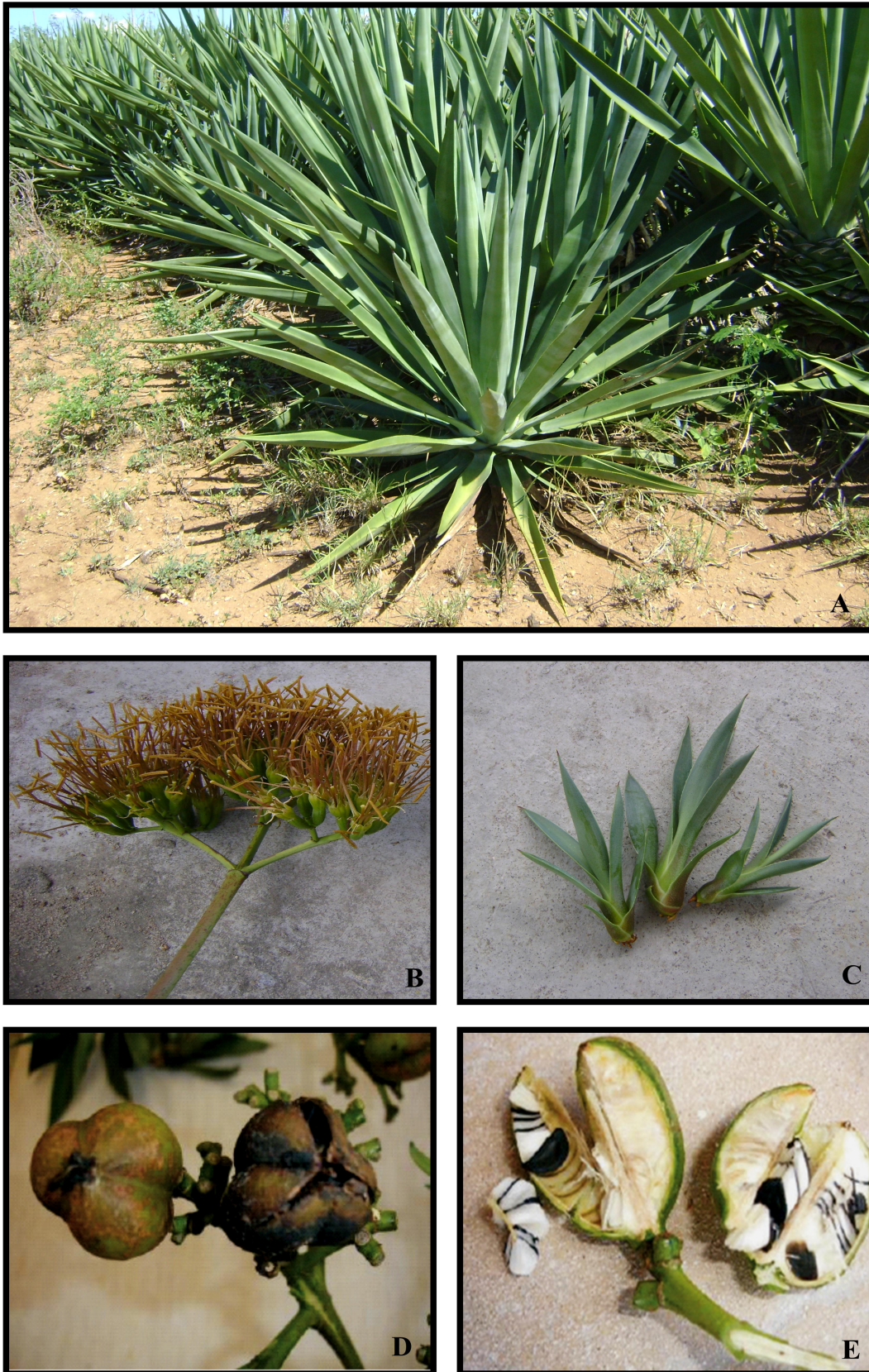
espécies se destacam por sua importância comercial para a produção de fibras: *A. sisalana* e *A. fougroydes* (SILVA, O. et al., 2008).

É uma planta perene, plurianual, porém monocárpica, fenecendo depois do processo de frutificação. A duração do seu ciclo vegetativo corresponde ao período de 8 a 10 anos. O sistema radicular é típico das monocotiledôneas, sendo fasciculado, fibroso e em forma de tufo, sem a presença de uma raiz principal. É acaulescente e tem apenas um eixo principal no qual as folhas se inserem e armazenam água e nutrientes. As folhas têm forma linear lanceoladas, sem pecíolo, rígida, de cor verde escuro e comprimento entre 120 a 160 cm, com 10 a 15 cm de largura na sua parte média (Figura 1). A superfície é côncava, desprovida de espinhos na borda, possuindo um único acúleo na extremidade da folha. A inserção da folha no pseudocaule ocorre em forma de espiral ascendente, formando rosetas. Uma planta produz entre 200 a 250 folhas durante o ciclo, com peso médio variando entre 400 e 700 gramas, e cada folha contém de 1000 a 1200 fios de fibras (BELTRÃO, 2006; SILVA, O. et al., 2008).

A inflorescência é uma panícula de formato variável, entre 6 a 9 metros de altura, geralmente oblongo-piramidal, com 25 a 40 ramos principais com média de 40 flores, que às vezes formam frutos. As flores são hermafroditas e agrupadas em cachos situados no final de cada ramo da panícula. Após a queda das flores desenvolvem-se, na panícula, pequenas plantas denominadas de bulbilhos, que após cerca de três meses caem ao solo e servem como órgão de propagação de novas plantas (BELTRÃO, 2006; SILVA, O. et al., 2008).

Em alguns casos ocorre esporádica formação de frutos, que podem aparecer isolados ou em produção simultânea aos bulbilhos na panícula. Os frutos são cápsulas com cerca de 3 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, com três lóculos, nos quais se distribuem as sementes de forma redondo-triangular, bastante leves, delgadas e de coloração preta (férteis) ou branca (inférteis) (BELTRÃO, 2006; SILVA, O. et al., 2008).





**Figura 1:** A: *A. sisalana*: planta adulta; B: inflorescência; C: bulbilhos; D: fruto maduro; E: corte do fruto com sementes

Figuras D e E (GONDIM e SOUZA, 2009)



### 2.3.3 Constituição e composição química

O resíduo do sisal é formado por suco ou seiva vegetal, tecido parenquimatoso esmagado, celulose, pedaços de folhas e fibras de diferentes tamanhos, compostos inorgânicos e metabólitos primários e secundários (BANDEIRA e SILVA, 2006). Esse resíduo é composto por 82 g/kg de matéria seca (MS), a qual é constituída por 177, 64, 16, 333, 269, 142 g/kgMS de cinzas, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e lignina, respectivamente. A presença de fenóis, taninos totais, taninos condensados e fitato foi observada em concentrações de 10, 2, 0,1, 20 g/kgMS, enquanto que o teor de saponinas foi estimado em 0,8% no teste de produção de hemólise (NEGESSE et al., 2009). Silva e Beltrão (1999) descreveram que cada litro do resíduo líquido contém entre 35-65 g de carboidratos fermentados (5%).

A análise do extrato lipofílico da fibra de sisal demonstrou que os compostos predominantes são ácidos graxos, alcoóis graxos, esteróis livres e alcanos. Outras substâncias, em menores quantidades, foram identificadas, como hidrocarbonetos e cetonas esteroides, monoglicerídeos, diglicerídeos, aldeídos, ceras e glicosídeos esteróis (GUTIÉRREZ et al., 2008). Um hexitol, o D-manitol, foi isolado do extrato etanólico do resíduo líquido. Este composto pode ser aproveitado para a fabricação de polímero e também pela indústria farmacêutica para produção de diurético e regulador osmótico (BRANCO et al., 2010).

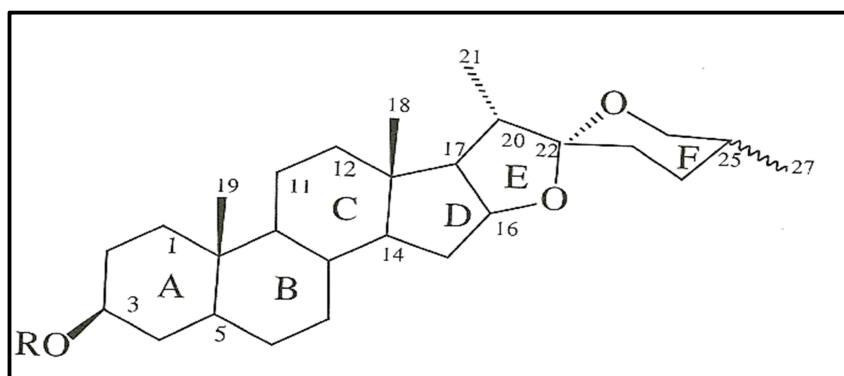
#### 2.3.3.1 Saponinas

As saponinas são metabólitos secundários produzidos por diversas plantas e alguns organismos marinhos. Estes compostos caracterizam-se por serem surfactantes, não voláteis, apresentar alto peso molecular e sabor amargo e acre. A denominação saponina deriva da palavra, em latim, *sapone* que significa sabão, em função de sua propriedade de formar espuma persistente quando agitadas em solução aquosa (VINCKEN et al., 2007).

As saponinas são constituídas por um núcleo lipofílico (sapogenina), uma aglicona esteroidal ou triterpenoide, associado a uma porção hidrofílica (açúcares). A combinação dessas estruturas polares e não polares é responsável pela sua propriedade de redução da tensão superficial da água e conseqüentemente efeitos detergente e emulsificante (VINCKEN et al., 2007)

As saponinas ocorrem em misturas complexas, com variações nas estruturas das agliconas, na natureza e número das cadeias de açúcar e na posição em que elas estão ligadas

a aglicona, o que dificulta o seu isolamento e elucidação estrutural. Essas substâncias podem ser classificadas de acordo com a aglicona em esteroidais ou triterpênicas. As saponinas esteroidais são formadas por um esqueleto de 27 carbonos dispostos em um sistema tetracíclico, e podem apresentar duas estruturas básicas comuns: o espirostanos e o furostanos (Figura 2). As saponinas triterpênicas possuem 30 átomos de carbono e um núcleo triterpênico (SCHENKEL et al., 2010).



**Figura 2:** Estrutura básica de uma saponina esteroidal espirostanos (SCHENKEL et al., 2010)

Outra classificação refere-se ao número de cadeias de açúcar ligada a aglicona: saponinas monodesmosídicas possuem uma cadeia de açúcares, enquanto que as bidesmosídicas têm duas cadeias de açúcares. As saponinas bidesmosídicas geralmente não apresentam as atividades biológicas descritas para as saponinas monodesmosídicas. As saponinas apresentam um número variável de monossacarídeos ligados entre si em cadeia linear ou ramificada, sendo que os principais monossacarídeos são D-glicose, D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-frutose e os ácidos glicurônicos e galacturônico (SCHENKEL et al., 2010).

A presença de saponinas esteroidais é mais frequente em monocotiledôneas das famílias Liliaceae, Dioscoraceae e Agavaceae, sendo que as maiores concentrações são observadas nos gêneros *Smilax*, *Dioscorea*, *Agave* e *Yuca*. As saponinas triterpênicas são mais comuns em dicotiledôneas, principalmente nas famílias Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, Caryophyllaceae, Primulaceae e Araliaceae (SCHENKEL et al., 2010).

A identificação de saponinas esteroidais na espécie *A. sisalana* tem sido documentada. A partir do resíduo fermentado foram isolados cinco diferentes saponinas esteroidais, que apresentam como sapogenina, a tigogenina (DING et al, 1989; DING et al, 1993). Ujikawa e

Purchio (1989) obtiveram um complexo sisalanina do suco da folhas de sisal, formado por sete saponinas designadas de sisalaninas A, B, C, D, E, F e G. A sisalanina B é constituída de hecogenina, galactose, glicose e xilose, e o composto D contém as mesmas substâncias e mais a ramnose. Duas novas saponinas furostanas foram identificadas nas folhas de sisal por Zou et al. (2006), sendo identificado que a aglicona é a gentrogenina e os açúcares são D-galactose, D-glicose e L-ramnose.

As principais sapogeninas presentes no sisal são a hecogenina, tigogenina, gitogenina, diosgenina, sisalagenina e barbougenina. Diferenças nas proporções destas substâncias variam consideravelmente em relação à idade e diferentes partes da planta. A hecogenina é predominante em folhas maduras, enquanto que a tigogenina é observada principalmente em folhas jovens, nos bulbilhos, flores e raiz (DAWIDAR e FAYEZ, 1961; BLUDEN e YI, 1974; BLUDEN e PATEL, 1986). Maior concentração de hecogenina (0,17 a 0,235%) seguida por tigogenina (0,035 a 0,085%) foi detectado em folhas maduras e envelhecidas de sisal (DAWIDAR e FAYEZ, 1961). Entretanto, outro estudo relatou que a tigogenina e hecogenina representam 55 e 20% do teor de sapogeninas totais em folhas maduras, respectivamente (ZULLO et al., 1989).

Recentemente, CHEN, P. et al. (2011) identificaram duas novas saponinas esteroidais das folhas de *A. sisalana*: hecogenina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1-3)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)] - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e neotigogenina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1-3)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo.

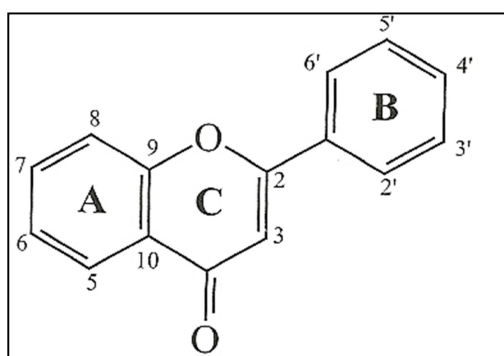
### 2.3.3.2 Flavonoides

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Muitos compostos atuam como pigmentos e são responsáveis pela coloração de flores e frutos. Esta classe encontra-se amplamente distribuída no reino vegetal e estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de plantas (KERBOEUF et al., 2008; ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

Os flavonoides são caracterizados por apresentar 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (Figura 3). Os compostos de origem natural apresentam-se geralmente oxigenados e um

grande número ocorre conjugado com açúcar, sendo esta forma conjugada conhecida como heterosídeo (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

Os flavonoides podem apresentar diversas formas estruturais e atualmente já foram identificados aproximadamente 5000 compostos diferentes (KERBOEUF et al. 2008). As principais classes são flavonas, flavonóis, flavonoides heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, di-hidroflavonoides, isoflavonoides, flavanas, neoflavonoides e biflavonoides. As funções dos flavonoides nas plantas são de proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

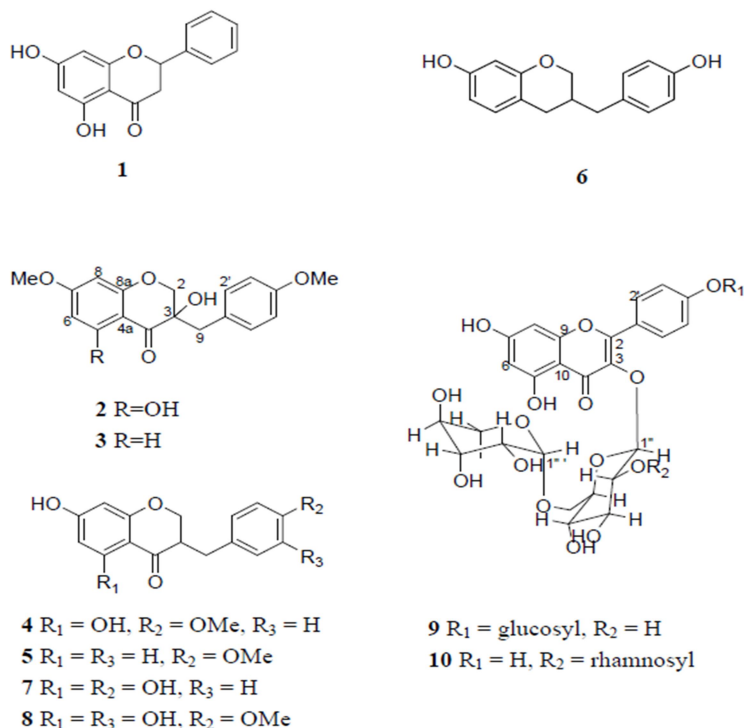


**Figura 3:** Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010)

Os homoisoflavonoides, compostos heterocíclicos contendo oxigênio, pertencem a um pequeno grupo de flavonoides de ocorrência natural, sendo identificados, até o momento, 110 diferentes compostos. Sua estrutura básica consiste em um esqueleto com 16 carbonos, que inclui um sistema de cromonona, cromona e cromana com um grupo benzil na posição C-3. Essas substâncias são raras em plantas e encontram-se distribuídas principalmente na família Liliaceae (QI et al., 2010). Algumas atividades biológicas de homoisoflavonoides foram relatadas, como antioxidante (LIN et al., 2010), antiinflamatória (HUNG et al., 2010), antibacteriana (O'DONNELL et al., 2006) e anticancerígeno (YEN et al., 2010).

Três flavonoides e sete homoisoflavonoides foram isolados do extrato metanólico das folhas de *A. sisalana*. Os flavonoides corresponderam a 5,7-diidroxiflavanona; caemferol 3-rutinosideo-4'-glicosideo e caemferol 3-(2-ramnosilrutinosideo), enquanto que os homoisoflavonoides foram: 7-O-metileucomol, 3'-deoisappanona, -3,9-diidroeucomina, diidro-bonducellina, 7-hidroxi-3-(4-hidroxibenzil)cromano, 5,7,-dihidroxi-3-(4'-hidroxi-

benzil)-4-cromanona e 5,7-diidroxio-3-(3'-hidroxio-4'-metoxibenzil)-4-cromanona (CHEN et al., 2009). A figura 4 apresenta algumas estruturas químicas de flavonoides isolados de *A. sisalana*.



**Figura 4:** Estrutura química de flavonoides e homoisoflavonoides isolados de *A. sisalana* (CHEN et al., 2009)

### 2.3.4 Atividades biológicas

Diversas atividades biológicas de *A. sisalana* têm sido descritas. O complexo sisalanina do suco das folhas de sisal, composto por sete saponinas, apresentou efeito antifúngico contra *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *C. albicans*; *R. glutinis* e *Saccharomyces cerevisiae*. A substância que mostrou melhor atividade foi a sisalanina B (UJIKAWA e PURCHIO, 1989). O suco filtrado da folha de sisal também inibiu o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* em amostras de milho (PIRES e PURCHIO, 1991).

Propriedade antibacteriana do extrato metanólico de *A. sisalana* sobre *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* foi relatado por Kassu et al. (1999). Entretanto, os extratos hidroalcoólico obtidos das folhas e do resíduo de sisal não mostraram efeito contra os microorganismos *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Estes extratos apresentaram ação inibitória sobre o fungo *Candida albicans* (SANTOS et al., 2009).

A hecogenina, sapogenina obtida a partir da hidrólise ácida do suco das folhas de sisal, é um precursor de esteroides medicinais utilizado na indústria farmacêutica para a produção de corticosteroides (BLUNDEN e PATEL, 1989).

O extrato bruto desidratado das folhas de sisal mostrou eficácia sobre larvas dos mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, sendo determinado a CL<sub>50</sub> de 183 e 322 ppm, respectivamente. A partir deste extrato foi realizado um fracionamento obtendo-se diferentes produtos que foram testados sobre o *C. quinquefasciatus* na concentração de 204 ppm. A mortalidade causada pelas frações de saponinas de alto peso molecular, de baixo peso molecular, fração água-mãe e o resíduo retirado do cartucho corresponderam a 50, 20, 36 e 30%. Considerando que todas as frações apresentaram atividade e que nenhum produto se destacou por elevada eficácia, possivelmente diferentes componentes do extrato bruto desidratado devem ser responsáveis por esta atividade inseticida (PIZARRO et al., 1999).

O efeito moluscicida sobre *Biomphalaria alexandrina*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* foi descrito para os extratos etanólico de *A. sisalana* e *A. attenuata*, que apresentaram CL<sub>50</sub> de 101 e 82 mg/L, respectivamente (HAMED et al., 2006). Atividade inseticida de extratos das folhas de sisal foi avaliada em *Reticulitermes flavipes*, cupim subterrâneo. Todos os extratos avaliados (metanólico, diclorometano e n-hexanol) foram eficazes na concentração de 1000 ppm, no entanto em concentrações inferiores (800 e 600 ppm), o extrato metanólico foi mais ativo (KERIKO e MUTUA, 2008).

As atividades antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidrolisado das folhas de sisal foram avaliadas em camundongos por vias de administração, oral e intraperitoneal, e este tratamento reduziu significativamente o edema de orelha induzido por xilol e carragenina. O efeito analgésico foi observado em modelo de contorções abdominais, e ao ser utilizado o modelo crônico de inflamação, apenas o tratamento por via intraperitoneal resultou em diminuição do tecido granulomatoso. A via de administração intraperitoneal mostrou ser mais efetiva, provavelmente devido a baixa absorção das saponinas no trato gastrointestinal (DUNDER et al., 2010).

Chen et al. (2009) avaliaram o efeito imunomodulatório de três flavonoides e sete homoisflavonoides isolados do extrato metanólico das folhas de sisal. Três homoisflavonoides mostraram efeito inibitório sobre a proliferação de células mononucleares de sangue periféricas humanas ativadas por fitohemaglutinina, com valores de CL<sub>50</sub> entre 19,4 e 73,8 µM. Além disso, também foi observada inibição significativa da produção de interleucina-2 e interferon-γ por estas células. A presença de grupos saturados C-

4'-metoxil e C-5 hidroxil nas substâncias ativas possivelmente é necessária para atividade biológica.

Estudos *in vitro* demonstraram ação do resíduo líquido do sisal sobre ovos, larvas e adultos de nematoides gastrintestinais de caprinos e ovinos. As  $CE_{50}$  e  $CE_{95}$  para inibição da eclosão de ovos foram de 6,78 e 23,06 mg/mL, respectivamente. Observou-se inibição de 100% do desenvolvimento e da alimentação de larvas  $L_1$  na concentração de 0,12 mg/mL e da motilidade de adultos a 75 mg/mL após 24hs de exposição (SILVEIRA, 2009). O tratamento de coproculturas com este resíduo (146,3 mg/mL) também resultou em elevado percentual de redução (99%) do número de larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos (DOMINGUES et al., 2010).

A administração do resíduo líquido por via oral na dose diária de 916,5 mg/kg durante oito dias em caprinos, reduziu em 36% e 18%, respectivamente, o número de larvas infectantes em cultivos de fezes e dos parasitos adultos, e não influenciou nos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos dos animais (DOMINGUES et al., 2010). O uso da polpa de sisal seca na alimentação de ovinos (500 g/animal/dia durante 80 dias) foi avaliado por Gebremariam e Machin (2008), que relataram aumento no ganho de peso e da eficiência de conversão alimentar, e não observaram efeitos adversos, sugerindo o aproveitamento desse resíduo como suplemento alimentar para ruminantes.

Citotoxicidade de saponinas e saponinas isoladas de *A. sisalana* foi investigada por Chen, P. et al. (2011), e entre os dez compostos avaliados, quatro inibiram o crescimento de células cancerígenas humana (mamária, pulmonar e glioblastoma), com  $CI_{50}$  entre 1,2 a 11,9  $\mu$ M. As saponinas esteroidais com a cadeia de açúcar foram mais tóxicas que suas agliconas, demonstrando o importante papel da porção de açúcar na bioatividade dessas saponinas.

## 2.4 ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA E TOXICIDADE DE SAPONINAS

A característica anfipática das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas, fosfolipídeos de membranas determinam diversas propriedades biológicas para estas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade ou causando a sua destruição (SCHENKEL et al., 2010). As saponinas apresentam ações hemolítica (WANG et al., 2007), ictiotóxica (FRANCIS et al., 2002), hipocolesterolemizante (AFROSE et al., 2009), antiviral (TAM e RONER, 2011), antimicrobiana (DING et al., 2009), antifúngica (ZHANG et al., 2006), inseticida

(CHAPAGAIN et al., 2008), moluscicida (MARTÍN et al., 2008) e anti-helmíntica (DOLIGALSKA et al., 2011).

Uma das atividades biológicas mais comuns observadas nos diferentes tipos de saponinas é a hemólise. Este efeito é atribuído a capacidade das saponinas formarem complexos com os esteroides da membrana dos eritrócitos, causando um aumento na permeabilidade e a subsequente perda da hemoglobina. Avaliação da atividade hemolítica e citotóxica de 63 saponinas esteroidais demonstrou que estas propriedades estão relacionadas à estrutura química destes compostos, como o tipo de aglicona, o número de cadeias de açúcar e seu sítio de ligação. Além disso, as atividades hemolíticas e citotóxicas não foram observadas simultaneamente para a mesma saponina, sugerindo que estes efeitos ocorrem por diferentes mecanismos (WANG et al., 2007).

A atividade antiparasitária de diversas saponinas extraídas de plantas tem sido documentada. As saponinas esteroidais obtidas de *Balanites aegyptiaca* apresentaram efeito *in vitro* sobre o mosquito *A. aegypti* e sobre o nematoide de vida livre, *Caenorhabditis elegans* (GNOULA et al., 2007; CHAPAGAIN et al., 2008). As saponinas, tribulosina e  $\beta$ -sitosterol-D-glicosídeo presentes na *Tribulus terrestris*, também mostraram eficácia contra *C. elegans* (DEEPAK et al., 2002).

O efeito anti-helmíntico de saponinas esteroidais (polyphyllin D e dioscina) isoladas de *Paris polyphylla* foi verificado em ensaio *in vivo* utilizando peixe dourado parasitado com *Dactylogyrus intermedius*. As concentrações efetivas (CE<sub>50</sub>) para as saponinas polyphyllin D e dioscina corresponderam a 0,70 e 0,44 mg/L, respectivamente. A maior atividade para a dioscina pode estar relacionada às diferenças nas cadeias de açúcar entre os compostos. Este efeito foi associado a alterações na permeabilidade das membranas causada pelas saponinas, levando a vacuolização e desintegração do tegumento dos parasitos (WANG et al., 2010).

A saponina, yuccasaponina MC3 isolada da planta *Yucca filamentosa*, mostrou atividade contra as formas promastigotas e amastigotas do protozoário *Leishmania* spp. Lesões na membrana da forma promastigota do parasito foram evidenciados, sugerindo uma possível ação da saponina sobre o potencial de membrana celular (PLOCK et al., 2001).

As acaciaside A e B, saponinas triterpênicas extraídas de *Acacia auriculiformis*, também causaram danos na membrana de microsomas hepáticos de ratos, provavelmente pela formação de radicais livres, como o ânion superóxido, que induzem alterações através do aumento da peroxidação lipídica da membrana. Estes efeitos foram associados com a atividade anti-helmíntica desta planta, observado em estudo anterior sobre nematoide filarídeo *Setaria cervi* em ratos (SINHA BABU et al., 1997; NANDI et al., 2004).



Os estudos com saponinas triterpênicas, contendo como aglicona o ácido oleanóico, de *Calendula officinalis* e de *Beta vulgaris* evidenciaram a inibição da eclosão de ovos e do desenvolvimento larvar e alterações na morfologia de larvas de *Heligmosomoides bakeri*, nematoide tricostrongilídeo encontrado no intestino de ratos. Inibição da função da glicoproteína p também foi detectada nos estádios de vida livre do parasito, que possivelmente corresponde ao mecanismo de ação destas saponinas sobre helmintos (DOLIGALSKA et al., 2011). Outros trabalhos também demonstraram interação de saponinas com proteínas, como albumina sérica humana e caseína (POTTER et al., 1993; LIU et al., 2003).

A atividade *in vitro* de frações de *Khaya senegalensis* sobre o desenvolvimento larvar de *H. contortus* foi relatado por Ademola et al. (2009), que demonstraram efeito de diferentes metabólitos secundários, incluindo saponinas. As  $CL_{50}$  das frações A (saponinas), B (saponinas e alcaloides), C (saponinas, terpenoides, flavonoides, taninos condensados) e D (saponinas e taninos) equivaleram a 80,81; 63,73; 44,03; 63,90  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A purificação da fração C, porção mais ativa, resultou em uma fração C1, que apresentou  $CL_{50}$  de 5,09  $\mu\text{g/mL}$ , sendo os taninos condensados indentificados como os principais componentes. Estes resultados sugerem que o efeito anti-helmíntico desta planta pode ser em decorrência da ação sinérgica de várias substâncias.

A presença de saponinas em extratos de diferentes plantas, como *C. moschata*, *A. vasica* e *H. helix*, tem sido relacionada com seus efeitos anti-helmíntico sobre ovos e larvas nematoides gastrintestinais de ovinos (EGUALE et al., 2007a; AL-SHAIBANI et al., 2008; MARIE-MAGDELEINE et al., 2009).

Diversos estudos têm demonstrado o efeito tóxico de diferentes saponinas sobre cultivos de células. Investigação sobre saponinas esteroidais isoladas de *Smilacina atropurpurea* revelaram atividade antifúngica e citotóxica. Das oito saponinas avaliadas, três foram eficazes contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *A. fumigatus*. Estas substâncias ativas também apresentaram efeito sobre cultivos de células cancerígenas humana e células Vero ( $CI_{50}$  de 1,9 a 8,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Estes resultados sugeriram uma correlação entre atividade antifúngica e citotóxica dessas saponinas (ZHANG et al., 2006).

YANG et al. (2006) avaliaram a atividade antifúngica e citotóxica de diferentes saponinas e sapogeninas esteroidais de espécies de monocotiledôneas. Nenhuma sapogenina apresentou atividade contra fungos, enquanto que foram identificadas 10 saponinas ativas contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans* e *A. fumigatus*. Entre as substâncias ativas, quatro saponinas foram caracterizadas pela presença da aglicona, tigogenina, e a cadeia

de açúcar com quatro a cinco monossacarídeos. Essa propriedade fungicida pode estar relacionada com o tipo de aglicona e composição dos monossacarídeos da cadeia de açúcar. Os compostos mais potentes apresentaram moderada citotoxicidade sobre células Vero, e não mostraram efeitos sobre cultivos de células carcinogênicas.

Testes em cultivos de células HeLa (carcinoma cervical humano) demonstraram o potencial anticancerígeno de saponinas isoladas de *Gymnema sylvestree* e *Eclipta prostrata*, respectivamente. Entretanto, estas substâncias não apresentaram efeitos tóxicos sobre células Vero (KHANNA e KANNABIRAN, 2009). Efeito anticancerígeno também foi observado para saponinas triterpênicas de *Antonia ovata* contra células KB (carcinoma epidermoide oral humano), com  $CI_{50}$  entre 3,1 a 6,6  $\mu$ M. Diferenças na atividade entre as saponinas avaliadas foram relacionadas com variações na estrutura desses compostos, como a posição do grupo hidroxila na aglicona (MAGID et al., 2010).

Atividade citotóxica e antibacteriana de saponinas triterpênicas de *Clematis ganpiniana* foram relatadas por Ding et al. (2009). Estes compostos apresentaram efeito sobre células de tumor mamário humano, com  $CI_{50}$  entre 0,7 a 16,5  $\mu$ g/mL. Os compostos com maior atividade citotóxica, também causaram alta taxa de apoptose. Outra atividade observada foi a ação contra vários microorganismos, como *M. luteus*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *B. subtilis*.

Quatro saponinas esteroidais de *Balanites aegyptiaca* apresentaram potente efeito antiproliferativo em células cancerígenas mamárias e do cólon humano. O mecanismo de ação identificado foi a indução da apoptose, através da ativação da caspase 3 e formação de compostos oxidantes. Diferenças na atividade dessas saponinas foram associadas com variações na cadeia de açúcar, sendo que uma redução do tamanho da porção de açúcar leva a uma diminuição da atividade anticâncer (YANNAI et al., 2011).

Estudos *in vivo* também têm demonstrado o potencial tóxico de saponinas extraídas de plantas. A administração única do extrato de saponinas de *Camelia sasanqua* em ratos (125 a 2000 mg/kg) por via oral resultou em diarreia, hipoatividade, redução da temperatura e cianose, sendo obtida a  $DL_{50}$  igual a 1.143,7 mg/kg. Para avaliação toxicológica subcrônica, ratos foram tratados com este extrato (100, 200 e 400 mg/kg) durante seis semanas. No grupo tratado com a dose mais alta, os animais vieram a óbito, sendo observada severa distensão do trato gastrointestinal e alterações na submucosa do intestino delgado. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas, exceto um pequeno aumento do nível de aspartato aminotransferase (AST) sérico (SHEN et al., 2008).

Algumas alterações hematológicas (redução dos níveis de eritrócitos, hematócrito e volume corpuscular médio) sugestivas de anemia hemolítica foram observadas em ratos alimentados com extrato de soja rico em saponinas e isoflavonas durante treze semanas (CHO et al., 2009).

Em ruminantes, estudos revelaram a interferência das saponinas sobre parâmetros da fermentação ruminal. A alimentação de caprinos com extrato aquoso de *Biophytum petersianum* contendo saponinas (26 mg de saponinas/kg) resultou em aumento do pH, diminuição da população de protozoários, da concentração de ácidos graxos voláteis e amônia no rúmen (SANTOSO et al., 2007). A adição de saponinas provenientes de *Y. schidigera* (170 mg/d) na dieta de ovinos resultou em aumento da concentração de ácidos graxos voláteis, redução do nível de N-NH<sub>3</sub> (nitrogênio amoniacal) e da produção de metano (WANG et al., 2009).

O tratamento de cordeiros com saponinas de *Y. schidigera* (55 mg/kg/11 dias) por via intra-ruminal, não causou alterações clínicas, e os níveis séricos de AST, alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), úreia, creatinina e bilirrubina total permaneceram dentro dos níveis normais. A análise de saponinas no trato gastrointestinal revelou alta concentração de sapogeninas no omaso e abomaso em comparação ao rúmen, sugerindo que esses compostos são rapidamente hidrolisados no rúmen principalmente em sapogeninas livres (FLAØYEN et al., 2002). Degradação *in vitro* de saponinas triterpênicas por microorganismos ruminais também foi demonstrada por Makkar e Becker (1997).

A administração intraruminal do suco de *Y. schidigera* contendo saponinas (1,5 a 3,0g/kg) em cordeiros durante 21 dias resultou em diarreia, desidratação, aumento dos níveis de creatinina e uréia. Não foram encontrados sinais de fotossensibilização e nem alterações nas dosagens séricas de AST, GGT e bilirrubina. Alguns animais foram a óbito possivelmente devido a lesões renais, uma vez que, a análise histológica revelou necrose tubular aguda e hemorragia intersticial. Além disso, foi observado acumulação de glicogênio e gotículas de lipídios no citoplasma de hepatócitos (WISLØFF et al., 2008).

## 2.5 ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA E TOXICIDADE DE FLAVONOIDES

O interesse científico pelos flavonoides decorre de suas diversas atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidante (DUEÑAS et al., 2011), antineoplásico (SANTOS et al., 2011),

antiinflamatório (CHEN, H. et al., 2011), antimicrobiano, antiviral (ORHAN et al., 2010) e antiparasitário (AYERS et al., 2008; LAKSHMI et al., 2010).

Plantas ricas em flavonoides têm sido empregadas popularmente para o tratamento de doenças causadas por protozoários em humanos, e diversos estudos têm demonstrado seus efeitos sobre diferentes parasitos, como protozoários e helmintos. A propriedade antiparasitária desses compostos pode ser atribuída a alterações na atividade de várias enzimas e/ou nos processos metabólicos dos parasitos (KERBOEUF et al., 2008).

A isoflavona genisteína, extraída de *Flemingia vestia*, causou paralisia e danos ao tegumento de *Fasciolopsis buski*, trematódeo de suínos. Este efeito tem sido relacionado com a redução dos teores de alguns aminoácidos livres, aumento nos níveis de ácido glutâmico, citrulina, ácido gama aminobutírico (GABA), amônia e óxido nítrico deste parasito (KAR et al., 2004).

A atividade tripanocida *in vitro* de flavonoides (kaempferol, quercitina, trifolin e acetil hiperoside) e de seus produtos acetilados isolados de *Consolida oliveriana* foi investigada por Boutaleb-Charki et al. (2011). Os compostos acetilados foram mais ativos na inibição do crescimento da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, provavelmente em função da acetilação facilitar a absorção do produto. Essas substâncias atuaram sobre a forma metacíclica reduzindo taxa de invasão em células Vero, de sua replicação intracelular e transformação na forma tripomastigota. Os parasitos tratados apresentaram danos na sua estrutura, como intensa vacuolização, distorções no núcleo e aumento do tamanho da mitocôndria. A excreção de metabólitos pelos parasitos também foi afetada, possivelmente devido à ação dos flavonoides sobre enzimas ou função mitocondrial. Os flavonoides apresentaram menor toxicidade sobre células Vero quando comparados com o medicamento benzimidazol.

O estudo da ação de treze flavonoides sobre o nematoide *C. elegans*, revelou que os compostos apigenina e 5,7,3',4',5'-penta hidroxiflavona inibiram o crescimento larval deste parasito. A identificação da estrutura química destas substâncias sugerem que a presença de dois grupos hidroxilas (C-5 e C-7) do anel A, 4'hidroxila no anel B e uma dupla ligação entre C-2 e C-3 no anel C são necessárias para o efeito anti-helmíntico (YOON et al., 2006).

Em camundongos infectados com o nematoide *Aspiculuris tetraptera*, a administração de flavonoides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (2,0 mg/kg) por via intragástrica durante três dias resultou em percentuais de eficácia entre 5,2 a 40,2%. Os flavonoides mais ativos apresentavam unidades glicosídicas na posição C-7 (SILVA, V. et al., 2008).

Os efeitos dos flavonoides (rutina, flavona, naringenina, hesperetina, crisina e narigina) foram avaliados contra o nematoide *Brugia malayi*, parasito responsável pela filariose linfática humana. Nos testes, *in vitro*, esses compostos inibiram a motilidade de microfilárias e de fêmeas adultas, e reduziram a viabilidade de parasitos adultos avaliados pelo teste de MTT. A eficácia dos flavonoides em ordem decrescente correspondeu a naringenina > flavona = hesperetina > rutina > narigina > crisina. Em ensaios *in vivo*, o tratamento de gerbil com naringenina (50mg/kg) por via subcutânea durante 5 dias resultou em 73% de eficácia sobre parasito adulto. Entretanto, no roedor *Mastomys coucha*, esse mesmo flavonóide foi menos eficaz (51% de redução) quando administrado por via intraperitoneal com o dobro da dose anterior. Nenhuma alteração clínica foi observada nos animais tratados com esse flavonoide (LAKSHMI et al., 2010).

A atividade anti-helmíntica de flavonoides sobre nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes também tem sido documentada. Molan et al. (2003) avaliaram a atividade anti-helmíntica de flavan-3-óis sintéticos (catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina) e seus derivados galoil sobre ovos e larvas de *T. colubriformis*. Os compostos derivados galoil inibiram completamente a eclosão de ovos, com valores de CE<sub>50</sub> entre 0,27 a 0,36 mg/mL, e a substância mais ativa foi a epigalocatequina galato. Todos os compostos avaliados interferiram no desenvolvimento larvar (L<sub>1</sub> para L<sub>3</sub>) de forma concentração dependente. Maior efeito sobre a migração de larvas foi verificada para os flavan-3-óis galato, principalmente para epigalocatequina galato, o qual reduziu a motilidade em aproximadamente 50% na concentração de 0,5 mg/mL. A adição do grupo galoil aumentou a eficácia dos compostos e também foi observada uma correlação entre o efeito sobre os ovos e a hidroxilação do anel B, sendo que a forma tri-hidroxilada foi mais ativa.

Os estudos *in vitro* com flavonoides glicosilados presentes na *O. viciifolia* revelaram efeito sobre larvas infectantes de *H. contortus*. Os compostos rutina, nicotiflorina e narcissina (1200µg/mL) reduziram a migração de larvas em 25, 30 e 35%, respectivamente (BARRAU et al., 2005). Flavonas isoladas de *S. argentea* também inibiram *in vitro* a motilidade de larvas de *H. contortus*, sendo que a CE<sub>90</sub> variou entre 3,1 a 61 µg/mL. Os quatro constituintes mais ativos foram avaliados em teste utilizando camundongos infectados com o nematoide *Heligmosomoides polygyrus*. Apenas uma flavona, na dose de 25 mg/kg por via intramuscular, mostrou moderada atividade, com redução de 49% da contagem de parasitos (AYERS et al., 2008).

A maioria dos flavonoides é considerada como substâncias seguras, com baixo potencial de toxicidade. Isoflavonoides, isolados de frutos de *Solanum torvum*, não mostraram

citotoxicidade (50 µg/mL) sobre cultivos de células Vero e de células de tumor mamário e de carcinoma epidermoide oral humano (ARTHAN et al., 2002). Atividades antioxidante e citotóxica *in vitro* de três flavonoides de *Athrixia phylicoides* (5-hidroxi-6,7,8,3',4',5'-hexamethoxiflavon-3-ol, 3-O-demetildigicitrina e quercetina) foram avaliados por Mavundza et al. (2010). Esses flavonoides apresentam alta atividade antioxidante, com CE<sub>50</sub> entre 1,27 a 3,41 µg/mL. O composto mais ativo foi a quercetina, que mostrou baixa citotoxicidade sobre célula Vero (CI<sub>50</sub> = 81,38 µg/mL) em comparação aos demais flavonoides, com CI<sub>50</sub> em torno de 28 µg/mL.

Os efeitos do homoisoflavonoide, dracol, e da saponina icodeside obtidos de *Dracaena draco* sobre células cancerígenas foram investigados por Hernández et al. (2006). A saponina mostrou moderada atividade contra células leucêmicas e de carcinoma epidermoide humano, enquanto que o homoisoflavonoide não foi citotóxico. Yen et al. (2010) relataram atividade *in vitro* de homoisoflavonoides sintéticos contra células cancerígenas pulmonar, nasofaríngea e da próstata.

Os flavonoides extraídos de *Mentha longifolia* foram avaliados quanto à atividade antibacteriana *in vitro* e a toxicidade aguda em camundongos. Os flavonoides (quercetina 3-O-glicosídeo, apigenina, luteolina-7-O-glicosídeo, luteolina-7,3'-O-diglicosídeo, kampeferol -3-O-glicosídeo) inibiram o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, em concentrações mínima inibitória variando entre 0,025 e 0,095 mg/mL. No teste de toxicidade, os animais foram tratados por via oral com flavonoides nas doses de 1 a 9 g/kg, sendo observada mortalidade a partir da dose de 3g/kg. O composto mais ativo, quercetina-3-O-glicosídeo, foi o que apresentou menor toxicidade, com dose letal de 5g/kg (AKROUM et al., 2009).

A toxicidade subcrônica e parâmetros de farmacocinética de wogonina, flavonóide isolado de *Scutellaria baicalensis*, foram investigadas em cães da raça beagle. A administração de wogonina (15, 30 e 60 mg/kg) via intravenosa durante 90 dias, resultou em alterações clínicas, como êmese, sialorréia, fraqueza e focinho inchado, especialmente no grupo tratado com a maior dose. Este tratamento não afetou os parâmetros bioquímicos (AST, ALT, fosfatase alcalina e creatinina) e nem causou alterações morfológicas e histológicas nos órgãos desses animais. Os parâmetros farmacocinéticos de área sob a curva de concentração plasmática-tempo e o tempo de meia vida de eliminação foram estimados em 2.137 ng h/mL e 91 minutos, respectivamente, em cães tratados com 20 mg/kg de wogonina (PENG et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que flavonoides podem interferir no metabolismo ruminal. Broudiscou et al. (2000) avaliaram o efeito de treze extratos de plantas com alto conteúdo de flavonoides sobre a fermentação e número de protozoários em culturas de microorganismos ruminais e observaram que os extratos de *Lavandula officinalis* e *Solidago virgaurea* estimularam a fermentação, enquanto aqueles da *Equisetum arvense* e *Salvia officinalis* promoveram redução da metanogênese. O número de protozoários foi, no entanto, pouco alterado pela ação dessas plantas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (protocolo n° 017/2008).

#### 3.1 OBTENÇÃO DO RESÍDUO DE *A. sisalana*

O resíduo de *A. sisalana* foi coletado diretamente da máquina de desfibramento de folhas de sisal com aproximadamente seis anos de idade, no município de Valente, Bahia, em julho de 2009. Folhas e florescência da planta foram identificadas e armazenadas no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, com registro de exsicata n. 838.

#### 3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES FLAVONOÍDICA E SAPONÍNICA

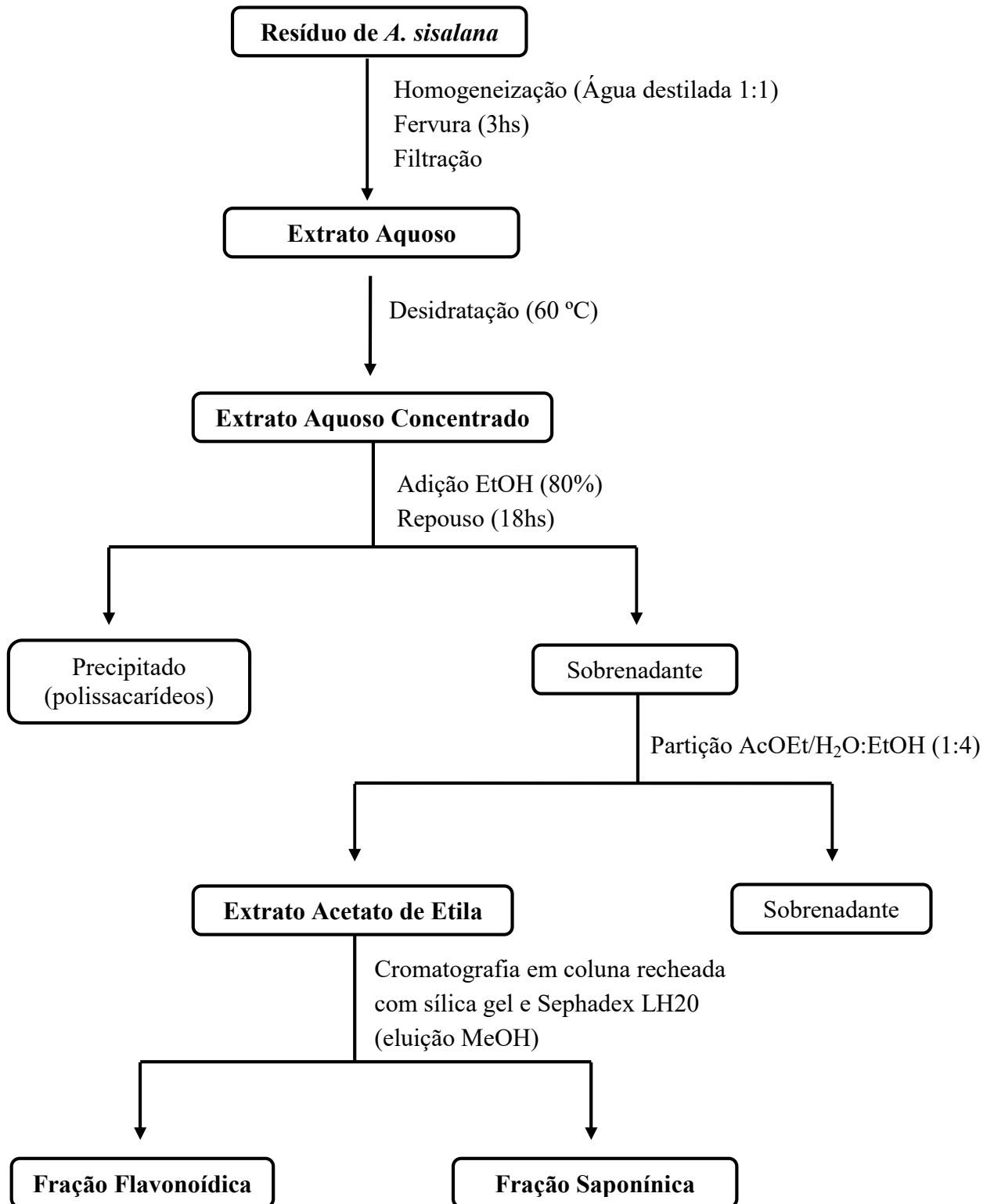
Os extratos e frações utilizados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Fitoquímica da Universidade Estadual de Feira de Santana, sendo estas frações obtidas conforme metodologia descrita por Santos (2009). A figura 5 apresenta o fluxograma demonstrando as etapas para obtenção dos extratos (aquoso e acetato de etila) e das frações (flavonoídica e saponínica) a partir do resíduo de sisal.

O resíduo de *A. sisalana* (70 kg) foi misturado com 70 L de água destilada e submetido a fervura durante três horas. Após o resfriamento em temperatura ambiente, o extrato aquoso foi obtido por filtração utilizando papel filtro, e dividido em três partes. Uma pequena parte (100 mL) do extrato aquoso foi liofilizado para ser utilizado nos testes *in vitro*. Outra parte desse extrato aquoso (aproximadamente 45 L) foi mantida sob congelamento a -20 °C até a utilização no teste *in vivo*. A terceira parte foi utilizada para obtenção do extrato acetato de etila e das frações flavonoídica e saponínica. Para tanto, o extrato aquoso foi desidratado em estufa de circulação de ar forçado (60 °C) e em seguida ressuspendido em solução hidroalcoólica a 80% (1:2 v/v), mantido em repouso formando um precipitado, separado do sobrenadante por filtração. Ao sobrenadante foi adicionado acetato de etila (1:4 v/v) resultando na formação de duas fases. A fase apolar foi concentrada em rotoevaporador para fornecer o extrato acetato de etila concentrado. Uma alíquota desse extrato foi submetida à cromatografia em coluna aberta recheada com sílica gel, eluída com gradiente de solventes (acetato de etila, metanol e água) resultando em 28 frações. Após análise em cromatografia



em camada delgada, as frações 2 e 7-9 foram submetidas a um fracionamento por cromatografia em permeação em gel, em coluna de vidro empacotada com Sephadex LH 20 e eluída com metanol (MeOH) para obter uma fração contendo um homoisoflavonoide como composto majoritário e outra fração contendo compostos saponínicos, respectivamente.

O perfil químico das frações flavonoídica e saponínica foi realizado por CLAE-DAD (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodos) através do equipamento da marca VRW HITACHI L-2300 contendo bomba VRW HITACHI L 2130, detector de arranjo diodo e injetor automático. Os resultados foram adquiridos e processados utilizando software Ezchrom Elite e o volume de injeção de 20 $\mu$ L. A coluna utilizada foi fase reversa (C18 de 5  $\mu$ m de diâmetro de partícula e 25 cm de comprimento). As condições de análise da fração flavonoídica foram: tempo de análise de 50 minutos; a fase móvel utilizada foi um sistema bifásico de: A (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% em H<sub>2</sub>O – água acidificada) e B (metanol) com gradiente: tempo 0 mim – 20 mim (75 % A); 20 mim – 24 mim (100 % B); 24 mim – 25 mim (75 %); 25 mim – 50 mim (75 % A). O fluxo de 1,0 mL/min, e a temperatura do forno de 30°C. Leitura em 220 nm. A amostra foi dissolvida em metanol. As condições de análise da fração saponínica foram volume de injeção de 20 $\mu$ L e tempo de análise foi de 15 minutos. A fase móvel utilizada foi um sistema bifásico de: A (acetoneitrila) e B (água) (90:10) isocrático. O fluxo foi de 1,0 mL/min, e a temperatura do forno de 35°C. Leitura em 200 nm. A amostra foi dissolvida em água e acetoneitrila (1:1).



**Figura 5:** Obtenção de extratos e frações a partir do resíduo de *A. sisalana*

### 3.3 AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA *IN VITRO*

#### 3.3.1. Atividade ovicida

A avaliação da atividade ovicida foi realizada através do teste de eclosão de ovos. Foram utilizadas fezes coletadas diretamente da ampola retal de caprinos, infectados naturalmente com nematoides gastrintestinais, criados na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. A recuperação dos ovos das fezes foi realizada segundo Hubert e Kerbeoeuf (1992), no qual 10 g de fezes foram homogeneizadas com água destilada e filtradas em tamis de 1 mm, 100, 55 e 25  $\mu$ m. Os ovos retidos na última malha foram coletados e centrifugados a 1500 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se solução de cloreto de sódio saturada ao sedimento, que foi centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante foi filtrado na peneira de 25  $\mu$ m e lavado com água destilada para a coleta dos ovos. A concentração de ovos foi estimada em amostras de 100  $\mu$ L e ajustado para 100 ovos/100  $\mu$ L.

O teste de eclosão de ovos foi realizado segundo Coles et al. (1992). A suspensão de ovos foi distribuída em microplaca de 96 poços (100  $\mu$ L/poço) e adicionada o mesmo volume dos extratos diluídos em água destilada. A determinação das concentrações dos extratos foi baseada em resultados obtidos de experimentos pilotos. As concentrações avaliadas corresponderam a: extrato aquoso (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL), extrato acetato de etila e fração flavonoídica (0,02; 0,04; 0,08; 0,16 e 0,32 mg/mL), e fração saponínica (0,32 mg/mL). Foram incluídos controle negativo contendo água destilada e controle positivo com albendazol (0,025 mg/mL). Após incubação das placas em B.O.D. a 24 °C por 48 hs, acrescentou-se lugol para interromper a eclosão dos ovos. Todos os ovos e larvas (L<sub>1</sub>) foram contados de cada poço. Três repetições com três replicatas para cada concentração e controles foram realizados para assegurar a validação dos resultados. O percentual de inibição da eclosão de ovos foi determinado através da relação: número de ovos/ (número de ovos + número de L<sub>1</sub>).

#### 3.3.2 Atividade larvicida

A avaliação da atividade larvicida foi realizada através do teste *in vitro* de migração larvar, empregando a metodologia descrita por Molento e Prichard (2001). Para tanto, foram utilizadas larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de nematoides gastrintestinais de caprinos provenientes de

coproculturas realizadas com fezes de animais naturalmente infectados. As larvas foram submetidas ao processo de desembainhamento pelo contato com solução de hipoclorito de sódio (1,5%) durante 30 minutos. O material foi lavado três vezes com PBS.

Essas larvas foram distribuídas em microplacas de 24 poços (400 larvas/0,5 mL/poço) e adicionadas o mesmo volume dos extratos diluídos em PBS. As concentrações dos extratos foram: extratos aquoso e acetato de etila (100 mg/mL), fração saponínica e flavonoídica (2,5 mg/mL). Como controles positivo e negativo foram utilizados levamisol (0,5 mg/mL) e PBS, respectivamente. A placa foi incubada em B.O.D a 27 °C por seis horas. Decorrido este período, foi adicionado 1 mL de solução de ágar (1,4%) a 35 °C, e a solução final foi transferida para uma placa de petri com um aparato (cilindro sobreposto a duas telas de nylon contendo água destilada congelada). As placas de petri foram mantidas em B.O.D a 25 °C, onde foram expostas a uma fonte de luz incandescente (60 W) durante 18 horas para estimular a movimentação das larvas viáveis, que migram para fora do ágar passando pelas telas de nylon em direção à porção aquosa. Esta porção líquida contendo as larvas foi transferida para um tubo tipo falcon e centrifugada a 1500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado, mantendo volume final de 2 mL. Deste volume, foi retirada uma alíquota homogênea de 200µL para quantificação das larvas. O resultado das contagens de larvas em cada alíquota foi multiplicado por 10. Para cada extratos e controles foram realizadas seis replicatas.

O percentual de eficácia foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$E = [(Mc - Mtr)/Mc] \times 100$ , onde Mc corresponde a média aritmética do número de larvas contada no grupo controle, e Mtr é a média aritmética do número de larvas contadas no grupo tratado (MOLENTO e PRICHARD, 2001).

### 3.4 AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA *IN VIVO*<sup>1</sup>

#### 3.4.1 Animais

Trinta caprinos, sem raça definida, de seis a 18 meses de idade, infectados naturalmente com nematoides gastrintestinais, mantidos em regime semi-intensivo no município de Senhor do Bonfim (BA) permaneceram sem tratamento anti-helmíntico por um período de 60 dias. Após esse período, os animais foram transferidos para o Centro de Desenvolvimento da Pecuária em Oliveira dos Campinhos (BA), permanecendo durante 22 dias, sendo a primeira semana de adaptação. Os caprinos foram mantidos em instalações com piso concreto e receberam feno de gramínea diariamente, água e sal mineral *ad libitum*.

---

<sup>1</sup> Esta parte do trabalho foi publicada na revista *Veterinary Parasitology* (artigo em anexo)

### 3.4.2 Tratamento

Os animais foram distribuídos em três grupos homogêneos ( $n = 10$ ). Os animais foram distribuídos em cada grupo alternadamente em ordem decrescente do número de ovos por grama de fezes. As médias do peso nos grupos I, II e III corresponderam a  $18,6 \pm 4,3$ ,  $19,3 \pm 3,6$  e  $19,8 \pm 5,9$  kg, respectivamente. O grupo I foi tratado com  $1,7$  g/kg/dia do extrato aquoso de *A. sisalana* administrado por via oral em duas doses por oito dias consecutivos; grupo II (controle positivo), tratado com dose única de fosfato de levamisol ( $6,3$  mg/kg) e o grupo III (controle negativo), não submetido a qualquer tratamento. Durante o experimento, um animal do grupo II foi a óbito, decorrente do parasitismo por nematoides gastrintestinais no dia 11. O OPG deste animal foi de 6.850, e o *Haemonchus* foi o gênero mais prevalente na coprocultura (81%).

A dose do extrato aquoso de *A. sisalana* utilizada no estudo *in vivo* foi determinada a partir da concentração do extrato e da estimativa de 1 L/dia (fracionado em duas administrações) como volume adequado para o tratamento diário de um animal com 35 kg. A concentração do extrato aquoso ( $57,7$  mg/mL) foi determinada através da secagem de três amostras de 1 mL em estufa de circulação forçada de ar ( $60$  °C) até a obtenção de peso constante. A massa média obtida referente a 1 mL foi relacionada ao respectivo volume total, obtendo-se então a massa total em mg/mL.

### 3.4.3 Análises parasitológicas

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal nos dias 0, 5° e 9° para a realização do OPG (GORDON e WHITLOCK, 1939). A identificação dos gêneros de nematoides foi determinada por coprocultura de amostras de fezes individuais, que foram coletadas antes e após o final do tratamento (UENO e GONÇALVES, 1998).

### 3.4.4 Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos

Durante o tratamento foi realizado diariamente o exame clínico dos animais (ROSENBERGER et al., 1993), avaliando-se o comportamento, mucosas, linfonodos, grau de desidratação, temperatura corporal, frequências respiratória e cardíaca e movimentos ruminais. O peso corporal individual foi registrado nos dias 0 e 9.

As amostras de sangue dos animais foram colhidas por punção da veia jugular nos dias 0 e 9 do experimento. As amostras de sangue, coletadas em tubo à vácuo contendo EDTA

(ácido etilenodiaminotetracético), foram utilizadas para a realização do hemograma e da determinação da proteína plasmática total por refratometria (JAIN, 1993).

As atividades das enzimas ALT, AST, GGT e fosfatase alcalina, e as concentrações de creatinina e uréia foram mensuradas no soro utilizando-se kits comerciais (DOLES<sup>®</sup>) e a leitura por espectrofotometria.

### **3.4.5 Avaliação anatomo-histopatológica**

Após uma semana do final do tratamento, seis animais de cada grupo foram separados aleatoriamente e eutanasiados, seguindo as recomendações do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Resolução nº 714, 2002) e, posteriormente necropsiados. Para o diagnóstico histológico, fragmentos de fígado, rins, abomaso e intestinos foram coletados e fixados em formol a 10%, e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET, 1992). Secções histológicas de 5 µm foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

Uma alíquota (10%) dos conteúdos do abomaso e intestino delgado foi analisada e o número de nematoides, diferenciados por gênero, multiplicado por 10, enquanto o conteúdo do intestino grosso foi examinado integralmente (UENO e GONÇALVES, 1998). A identificação das espécies de nematoides gastrintestinais foi realizada conforme Soulsby (1982).

## **3.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO**

### **3.5.1 Cultivos de células**

As células de linhagem Vero, provenientes de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foram mantidas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro equino fetal 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.

### **3.5.2 Tratamento dos cultivos de células**

As células Vero foram colocadas em microplacas de 96 poços na 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>, o meio dos cultivos foi removido e adicionado os extratos e frações de *A. sisalana* diluídos em meio RPMI e mantidos sob as mesmas condições de incubação. Após 24 horas do tratamento foram realizados os testes de MTT e azul de tripan. As concentrações avaliadas dos extratos aquoso, acetato de etila e fração de flavonoídica corresponderam a 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL, enquanto as da fração saponínica foram de 7,8; 16; 32; 62,5 e 125 µg/mL.

### **3.5.3 Avaliação da função mitocondrial pela redução do MTT**

A atividade das desidrogenases mitocondriais foi avaliada através do teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) segundo Hansen et al. (1989). O princípio do teste consiste na capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas em converter o MTT em cristais de formazan de cor violácea. As células cultivadas em placas de 96 poços foram expostas aos extratos e frações por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido e foram adicionados aos poços 100 µL de solução de MTT em meio RPMI (1 mg/mL). Após três horas de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100 µL/poço de um tampão de lise, contendo 20% de SDS (duodecil sulfato de sódio) e 50% de DMF (dimetil formamida) (Ph=4,7), mantendo-se as placas por 12 hs a 37 °C. A absorbância óptica foi medida utilizando leitor de placas de comprimento de onda (405 - 600 nm). Foram realizadas três repetições com cinco replicatas para cada concentração e controle. Os resultados foram apresentados como a porcentagem de viabilidade celular (média e desvio padrão) em relação ao controle, considerado como 100%.

### **3.5.4 Avaliação da integridade da membrana pela exclusão ao azul de tripan**

A integridade de membrana celular foi avaliada através do método de exclusão ao corante azul de tripan. As células viáveis possuem uma permeabilidade seletiva, o que impede a passagem do corante azul de tripan para o meio intracelular. Dessa forma, na presença deste corante, as células viáveis apresentam um halo azulado, enquanto que as células mortas estão coloridas de azul.

Após 24 horas do tratamento dos cultivos com os extratos e frações, as células foram obtidas por tripsinização, utilizando solução de tripsina e EDTA. A suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos a 5000 x g, e em seguida desprezado o sobrenadante. As células

foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de meio RPMI e coradas com azul de tripan a uma concentração final de 0,1%. Foi retirada uma alíquota (10  $\mu$ L) da suspensão celular e realizada a contagem do número de células viáveis e inviáveis em câmara de Neubauer. Foram realizadas três repetições com três replicatas para cada concentração e controle.

### 3.6 Análise estatística

Os resultados dos testes *in vitro* (eclosão de ovos, migração de larvas e azul de tripan), das análises hematológicas, bioquímicas e peso dos animais foram comparados pela ANOVA seguido do teste de Tukey (5%). Para os resultados *in vitro* (teste de MTT) e *in vivo* (contagem de ovos, larvas L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> e L<sub>5</sub>, basófilos, leucócitos segmentados e bastonetes), que não apresentavam distribuição normal, foi realizada análise não paramétrica, teste Kruskal – Wallis seguido do teste de comparação múltipla Dunn (5%). Os programas utilizados para as análises dos dados *in vitro* e *in vivo* foram GraphPrism (versão 5.0) e o SAS (versão 9.1), respectivamente.

As CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub> (concentração efetiva) para o teste de eclosão de ovos e CI<sub>50</sub> (concentração inibitória) para o teste de viabilidade celular (MTT) foram calculadas através de análise de regressão não linear usando o programa GraphPrism, versão 5.0.

A eficácia do tratamento *in vivo* sobre ovos e larvas foram determinadas pelo teste de percentual de redução de ovos ou larvas, com a seguinte fórmula:  $PR = 100 (1 - T/C)$ , onde PR é o percentual de redução, T e C são as médias aritméticas de ovos ou larvas dos grupos tratados e controle negativo, respectivamente (COLES et al., 1992).



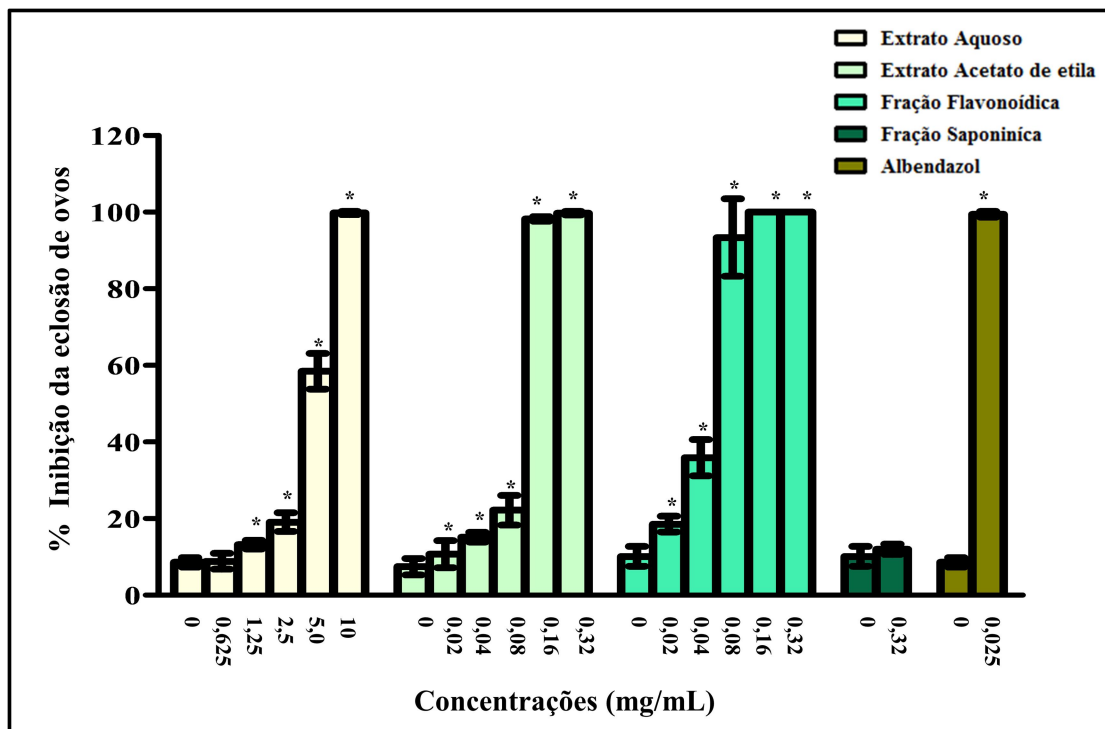
## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA *IN VITRO*

#### 4.1.1 Atividade ovicida

Os extratos aquoso (EA), acetato de etila (EE) e fração flavonoídica (FF) de *A. sisalana* inibiram a eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos, sendo que este efeito aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) nas concentrações mais elevadas. Os valores de  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$  foram respectivamente: 4,7 e 8,3 mg/mL para o EA, 0,1 e 0,13 mg/mL para o EE e 0,05 e 0,07 mg/mL para a FF. A fração saponínica (FS) (0,32 mg/mL) não interferiu ( $p > 0,05$ ) na eclosão de ovos quando comparado ao controle negativo (Figura 6).

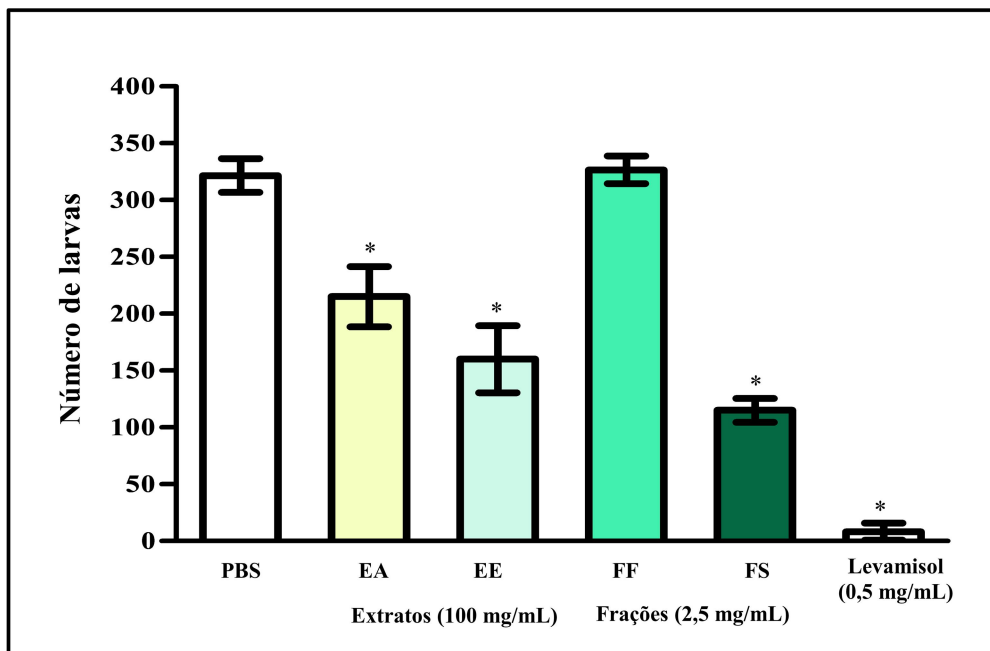
As médias dos percentuais de inibição da eclosão de ovos variaram de 8,9 a 99,8 (EA), 10,7 a 99,8 (EE), 18,6 a 100% (FF) e 12% (FS). Eficácia superior a 90% foi observada para EA, EE e FF, embora a menor concentração efetiva tenha sido verificada para a FF (0,08 mg/mL), seguida do EE (0,16 mg/mL) e EA (10 mg/mL). Nestas concentrações, a atividade ovicida foi semelhante ao albendazol.



**Figura 6:** Média e desvio padrão do percentual de inibição da eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais com os extratos e frações de *A. sisalana*

#### 4.1.2 Atividade larvicida

O tratamento de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais com os EA, EE, FS e levamisol causaram redução significativa do número de larvas recuperadas no teste de migração em comparação com o controle negativo ( $p < 0,05$ ), e embora a FS tenha produzido esse efeito na concentração 40 vezes menor (2,5 mg/mL) que as concentrações dos EA e EE (100 mg/mL), o percentual de eficácia foi de apenas 64%. Este percentual para os EA, EE e levamisol correspondeu a 33,3; 50,3 e 97,4, respectivamente. A fração flavonoídica não apresentou efeito sobre a migração de larvas (Figura 7).



**Figura 7:** Média e desvio padrão do número de larvas de nematoides gastrintestinais recuperadas no teste de migração após o tratamento com extratos e frações de *A. sisalana*

## 4.2 AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA *IN VIVO*

### 4.2.1 Análises parasitológicas

Nos caprinos tratados com extrato aquoso obtido do resíduo de *A. sisalana* (grupo I) e levamisol (grupo II) ocorreu uma diminuição do OPG a partir do quinto dia, sendo este achado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (grupo III). Os maiores percentuais de redução do OPG corresponderam a 50,3 e 93,6% para os grupos I e II, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3:** Média, desvio padrão (DP) e percentual de redução (%) do número de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos tratados com o extrato aquoso de *A. sisalana*

| Grupos | Dias de tratamento          |                             |      |                              |      |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|------|------------------------------|------|
|        | 0                           | 5                           |      | 9                            |      |
|        | Média ± DP                  | Média ± DP                  | %    | Média ± DP                   | %    |
| GI     | 2480 ± 1665,2 <sup>Aa</sup> | 1600 ± 1012,1 <sup>Aa</sup> | 25,8 | 1610 ± 964,9 <sup>Aa</sup>   | 50,3 |
| GII    | 2078 ± 1118,1 <sup>Aa</sup> | 138,9 ± 167,3 <sup>Bb</sup> | 93,6 | 416,67 ± 612,9 <sup>Bb</sup> | 87,1 |
| GIII   | 2650 ± 1885,3 <sup>Aa</sup> | 2155 ± 1394,7 <sup>Ca</sup> | -    | 3240 ± 2137,7 <sup>Ca</sup>  | -    |

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e minúsculas na mesma linha caracterizam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

GI: 1,7g de extrato aquoso de *A. sisalana*/kgPV/ 8dias; GII: fosfato de levamisol (6,3mg/kgPV); GIII: sem tratamento

O número de larvas de 3<sup>o</sup> estágio (L<sub>3</sub>) obtidas de culturas de fezes de caprinos tratados com extrato aquoso de *A. sisalana* ou levamisol foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle negativo, exceto para o gênero *Trichostrongylus*. No grupo I, os percentuais de redução de L<sub>3</sub> dos gêneros *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus* e do total de larvas, corresponderam respectivamente a 82,6; 79,6; 53 e 80, enquanto que no grupo II foram 93,8; 74,1; 58,6 e 85,6 (Tabela 4).

**Tabela 4:** Média, desvio padrão (DP) e percentual de redução (%) do número de larvas de terceiro estágio de nematoides gastrintestinais, obtidas de culturas de fezes de caprinos tratados com o extrato aquoso de *A. sisalana*

| Gêneros                      | Grupos e dias de tratamento     |                                 |           |                                  |                               |              |                                     |                                   |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------|----------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|                              | GI                              |                                 | GII       |                                  |                               | GIII         |                                     |                                   |
|                              | 0                               | 9                               | 0         | 9                                | 0                             | 9            | 0                                   | 9                                 |
|                              | Média ±DP                       |                                 | %         | Média ±DP                        |                               | %            | Média ±DP                           |                                   |
| <i>Haemonchus</i> spp.       | 1055,5±825,7 <sup>Aa</sup>      | 281±174,5 <sup>Ab</sup>         | 82,6      | 794,4±393,5 <sup>Aa</sup>        | 100±111,8 <sup>Bb</sup>       | 93,83        | 1255,5 ± 1300 <sup>Aa</sup>         | 1620 ± 1773 <sup>Ca</sup>         |
| <i>Oesophagostomum</i> spp.  | 680,5±747,5 <sup>Aa</sup>       | 166±128,4 <sup>Aa</sup>         | 79,6      | 381,1±489,9 <sup>Aa</sup>        | 210,6±421,3 <sup>Ba</sup>     | 74,07        | 488±532,5 <sup>Aa</sup>             | 812 ± 851 <sup>Ca</sup>           |
| <i>Trichostrongylus</i> spp. | 96±75,8 <sup>Aa</sup>           | 67,5±38,7 <sup>Aa</sup>         | 53        | 62,8±40,6 <sup>Aa</sup>          | 59,4±45,7 <sup>Aa</sup>       | 58,58        | 70 ± 67,9 <sup>Aa</sup>             | 143,5±103,9 <sup>Aa</sup>         |
| <b>Total</b>                 | <b>1832±1459,4<sup>Aa</sup></b> | <b>514,5±234,7<sup>Ab</sup></b> | <b>80</b> | <b>1238,4±745,3<sup>Aa</sup></b> | <b>370±413,7<sup>Bb</sup></b> | <b>85,63</b> | <b>1783,5 ± 1346,3<sup>Aa</sup></b> | <b>2575 ± 1708,6<sup>Ca</sup></b> |

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos e letras minúsculas diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa nas avaliações intragrupo

GI: 1,7g de extrato aquoso de *A. sisalana*/kgPV/ 8dias; GII: fosfato de levamisol (6,3 mg/kgPV); GIII: sem tratamento

No grupo I, a redução do número de larvas de quarto (L<sub>4</sub>) e quinto (L<sub>5</sub>) estádios foi verificada para a espécie *Trichostrongylus colubriformis* (63,4%), seguido do *Oesophagostomum columbianum* (28,9%), enquanto que não houve diminuição para o *Haemonchus contortus*. No grupo II, o percentual de redução destas larvas variou entre 62,4 e 88%. Além disso, observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no grupo II para *H. contortus* e *O. columbianum*, quando comparado aos demais grupos (Tabela 5).

**Tabela 5:** Média, desvio padrão (DP) e percentual de redução (%) do número de nematoides gastrintestinais (L<sub>4</sub> e L<sub>5</sub>) recuperados de caprinos, após o tratamento com o extrato aquoso de *A. sisalana*

| Espécies                              | GI                                |           | GII                            |           | GIII                             |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|----------------------------------|
|                                       | Média ± DP                        | %         | Média ± DP                     | %         | Média ± DP                       |
| <i>Haemonchus contortus</i>           | 295 ± 236,3 <sup>a</sup>          | 0         | 30 ± 44,7 <sup>b</sup>         | 88        | 250 ± 224,8 <sup>a</sup>         |
| <i>Oesophagostomum columbianum</i>    | 61,17 ± 33,8 <sup>a</sup>         | 28,9      | 17,7 ± 19,8 <sup>b</sup>       | 79,5      | 86 ± 63,7 <sup>a</sup>           |
| <i>Trichostrongylus colubriformis</i> | 125 ± 154,8 <sup>a</sup>          | 63,4      | 128 ± 83,3 <sup>a</sup>        | 62,4      | 342 ± 278,5 <sup>a</sup>         |
| <b>Total</b>                          | <b>481,17 ± 241,9<sup>a</sup></b> | <b>29</b> | <b>176 ± 112,1<sup>b</sup></b> | <b>74</b> | <b>677,7 ± 354,9<sup>a</sup></b> |

Letras diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

GI: 1,7g de extrato aquoso de *A. sisalana*/kgPV/ 8dias; GII: fosfato de levamisol (6,3 mg/kgPV); GIII: sem tratamento

#### 4.2.2 Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos

Na avaliação clínica dos animais foram registrados os parâmetros de temperatura corporal (37,3 a 38,2 °C), frequências cardíaca (60 a 86 batimentos por minuto), respiratória (15 a 23 movimentos por minuto), e movimentos ruminais (1 a 3 por dois minutos). Em todos os grupos observou-se um pequeno ganho de peso, não havendo diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. A tabela 6 ilustra os valores deste parâmetro.

**Tabela 6:** Média e desvio padrão do peso (kg) de caprinos tratados com o extrato aquoso de *A. sisalana*

| Grupo       | Dias de tratamento |                   |
|-------------|--------------------|-------------------|
|             | 0                  | 9                 |
| <b>GI</b>   | <b>17 ± 3,2</b>    | <b>18,6 ± 4,3</b> |
| <b>GII</b>  | <b>19,3 ± 3,2</b>  | <b>19,4 ± 3,4</b> |
| <b>GIII</b> | <b>18,1 ± 5,0</b>  | <b>19,9 ± 6,0</b> |

Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ )

GI: 1,7g de extrato aquoso de *A. sisalana*/kgPV/ 8dias; GII: fosfato de levamisol (6,3 mg/kgPV); GIII: sem tratamento

A concentração de hemoglobina no grupo II foi significativamente superior aos demais grupos no dia 9 do experimento. Na avaliação intragrupo, observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração de hemoglobina no grupo I, um aumento significativo na contagem de eritrócitos no grupo II e na contagem de monócitos do grupo III (Tabela 7).

Não foi encontrada diferença para as enzimas GGT, AST, ALT e fosfatase alcalina entre os grupos após o tratamento ( $p > 0,05$ ). Redução significativa dos níveis de AST (grupo I) e GGT (grupo III) foi verificada no dia 9 em comparação ao dia zero. Para as dosagens de ureia e creatinina constatou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo I após a administração do extrato de sisal em relação aos demais grupos (Tabela 8).

**Tabela 7:** Média e desvio padrão de parâmetros hematológicos de caprinos tratados com o extrato aquoso de *A. sisalana*

| Parâmetros                         | Grupos e dias de tratamento |                        |                        |                          |                         |                        |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
|                                    | GI                          |                        | GII                    |                          | GIII                    |                        |
|                                    | 0                           | 9                      | 0                      | 9                        | 0                       | 9                      |
| Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /μl) | 14,4±1,3 <sup>Aa</sup>      | 15,2±1,5 <sup>Aa</sup> | 13,5±1,7 <sup>Aa</sup> | 15,9±2,4 <sup>Ab</sup>   | 13,9± 2,4 <sup>Aa</sup> | 14,1±2,7 <sup>Aa</sup> |
| Volume Globular (%)                | 29,1±4,3 <sup>Aa</sup>      | 28,4±4,1 <sup>Aa</sup> | 28±3,8 <sup>Aa</sup>   | 29,3±3,9 <sup>Aa</sup>   | 27±4,5 <sup>Aa</sup>    | 27,6±4,5 <sup>Aa</sup> |
| Hemoglobina (g/dL)                 | 11,8±3,3 <sup>Aa</sup>      | 9,3±1,5 <sup>Ab</sup>  | 10,8±1,9 <sup>Aa</sup> | 12,2±1,3 <sup>Ba</sup>   | 10,7±2,8 <sup>Aa</sup>  | 10,4±1,6 <sup>Aa</sup> |
| Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)  | 10,4±2,4 <sup>Aa</sup>      | 14,1±4,1 <sup>Aa</sup> | 11,0±2,9 <sup>Aa</sup> | 11,7±3,7 <sup>Aa</sup>   | 12,2± 5,8 <sup>Aa</sup> | 12,9±2,0 <sup>Aa</sup> |
| Segmentados (x10 <sup>3</sup> /μL) | 4,4±1,5 <sup>Aa</sup>       | 8±3,6 <sup>Aa</sup>    | 5±1,9 <sup>Aa</sup>    | 6,7±2,4 <sup>Aa</sup>    | 5,3±2,9 <sup>Aa</sup>   | 7,8±1,8 <sup>Aa</sup>  |
| Bastonetes (x10 <sup>3</sup> /μL)  | 0,1±0,1 <sup>Aa</sup>       | 0,1±0,2 <sup>Aa</sup>  | 0,1±0,1 <sup>Aa</sup>  | 0,3±0,4 <sup>Aa</sup>    | 0,1±0,1 <sup>Aa</sup>   | 0,1±0,2 <sup>Aa</sup>  |
| Basófilos (/μL)                    | 0±0 <sup>Aa</sup>           | 61±105,1 <sup>Aa</sup> | 51±152,7 <sup>Aa</sup> | 20,1± 60,3 <sup>Aa</sup> | 40±81,4 <sup>Aa</sup>   | 0±0 <sup>Aa</sup>      |
| Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)  | 5,3±2,3 <sup>Aa</sup>       | 5,2±2,3 <sup>Aa</sup>  | 4,8±1,5 <sup>Aa</sup>  | 3,6±1,8 <sup>Aa</sup>    | 6,1±2,7 <sup>Aa</sup>   | 4,1±0,2 <sup>Aa</sup>  |
| Monócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)   | 0,4±0,1 <sup>Aa</sup>       | 0,5±0,4 <sup>Aa</sup>  | 0,5±0,3 <sup>Aa</sup>  | 0,8±0,6 <sup>Aa</sup>    | 0,4±0,4 <sup>Aa</sup>   | 0,6±0,1 <sup>Ab</sup>  |
| Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /μL) | 0,2±0,3 <sup>Aa</sup>       | 0,2±0,2 <sup>Aa</sup>  | 0,6±0,7 <sup>Aa</sup>  | 0,3±0,4 <sup>Aa</sup>    | 0,3±0,3 <sup>Aa</sup>   | 0,4±0,3 <sup>Aa</sup>  |

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa (p<0,05) entre os grupos e letras minúsculas diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa nas avaliações intragrupo

GI: 1,7g de extrato aquoso de *A. sisalana*/kgPV/ 8dias; GII: fosfato de levamisol (6,3 mg/kgPV); GIII: sem tratamento

**Tabela 8:** Média e desvio padrão de marcadores bioquímicos séricos e proteína plasmática total de caprinos tratados com o extrato aquoso de *A. sisalana*

| Parâmetros                       | Grupos e dias de tratamento |                         |                         |                           |                         |                         |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                  | GI                          |                         | GII                     |                           | GIII                    |                         |
|                                  | 0                           | 9                       | 0                       | 9                         | 0                       | 9                       |
| GGT (UI/L)                       | 56,6±27,2 <sup>Aa</sup>     | 44,2±14,2 <sup>Aa</sup> | 48,3±27,5 <sup>Aa</sup> | 41,2 ± 10,6 <sup>Aa</sup> | 89,6±45,3 <sup>Ba</sup> | 56,7±28,2 <sup>Ab</sup> |
| AST (UI/L)                       | 39,6±6,7 <sup>Aa</sup>      | 31,7±4,9 <sup>Ab</sup>  | 37,3±6,5 <sup>Aa</sup>  | 33,8±10,6 <sup>Aa</sup>   | 35,1±7,6 <sup>Aa</sup>  | 31,7±7,9 <sup>Aa</sup>  |
| ALT (UI/L)                       | 12±1,4 <sup>Aa</sup>        | 12,3±1,5 <sup>Aa</sup>  | 11,8±1,7 <sup>Aa</sup>  | 11,3±2,6 <sup>Aa</sup>    | 12,1±1,4 <sup>Aa</sup>  | 11,2±1,6 <sup>Aa</sup>  |
| Fosfatase alcalina (UI/L)        | 67,8±30,3 <sup>Aa</sup>     | 44,1±20 <sup>Aa</sup>   | 89,3±80,1 <sup>Aa</sup> | 47,1±25,9 <sup>Aa</sup>   | 76,7±58,7 <sup>Aa</sup> | 45±25,6 <sup>Aa</sup>   |
| Ureia (mg/dL)                    | 51,5±8,8 <sup>Aa</sup>      | 56,9±14,6 <sup>Aa</sup> | 50,2±11,7 <sup>Aa</sup> | 35,5±15,9 <sup>Bb</sup>   | 47,7±8,2 <sup>Aa</sup>  | 40,8±9,5 <sup>Ba</sup>  |
| Creatinina (mg/dL)               | 1±0,1 <sup>Aa</sup>         | 1,2±0,2 <sup>Ab</sup>   | 1±0,1 <sup>Aa</sup>     | 1±0,2 <sup>Ba</sup>       | 1±0,1 <sup>Aa</sup>     | 1±0,1 <sup>ABa</sup>    |
| Proteína plasmática total (g/dL) | 6,7±0,6 <sup>Aa</sup>       | 6,5±0,5 <sup>Aa</sup>   | 7,2±0,5 <sup>Aa</sup>   | 6,8±0,5 <sup>Aa</sup>     | 6,7±0,8 <sup>Aa</sup>   | 6,2±0,6 <sup>Aa</sup>   |

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos e letras minúsculas diferentes na mesma linha caracterizam diferença significativa nas avaliações intragrupo

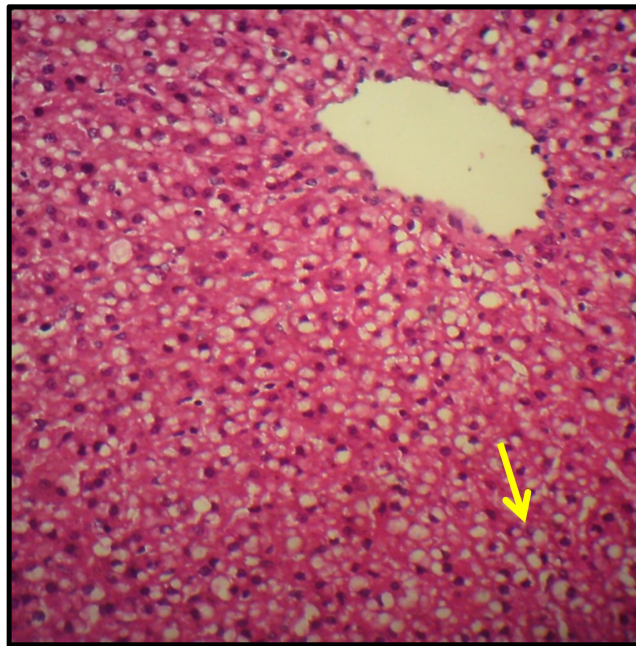
GI: 1,7g de extrato aquoso de *A. sisalana*/kgPV/ 8dias; GII: fosfato de levamisol (6,3 mg/kgPV); GIII: sem tratamento



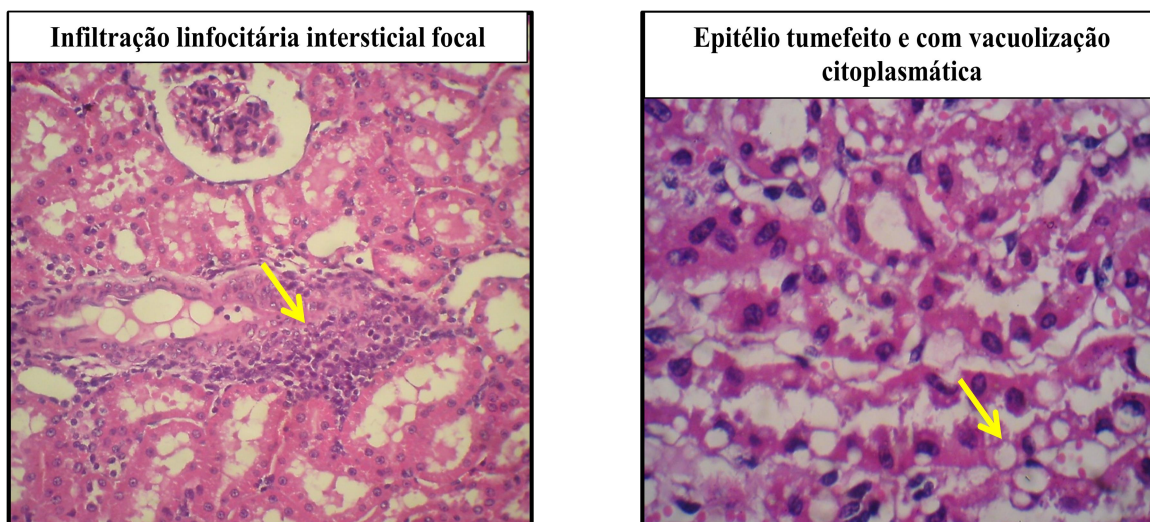
### 4.2.3 Avaliação anatomo-histopatológica

Macroscopicamente, em todos os grupos foram observados mucosas hipocoradas, linfonodos superficiais edemáticos, abomasite aguda e subaguda, enterite hemorrágica e ulcerativa agudas e nódulos calcificados de *Oesophagostomum* intestinais.

Histologicamente verificou-se reação linfocitária focal a multifocal na submucosa abomasal em três animais, sendo um achado no grupo I e os outros nos grupos II e III. Hepatócitos tumefeitos e vacuolizados foram relatados em todos os animais, em 13 deles as alterações celulares foram acompanhadas de infiltração linfocitária focal a multifocal, aleatoriamente distribuída (Figura 8). As alterações microscópicas evidenciadas nos rins se caracterizaram por vacuolizações citoplasmáticas no epitélio tubular de caráter discreto e por infiltração inflamatória linfocitária focal no interstício cortical em apenas um animal do grupo tratado com sisal (Figura 9), enquanto que no grupo controle negativo, dois caprinos apresentaram alterações tubulares caracterizadas por discreta vacuolização celular e dilatação cística de algumas estruturas tubulares corticais.



**Figura 8:** Alterações histológicas hepáticas no grupo I: hepatócitos periacinares tumefeitos e vacuolizados (HE 400 X)

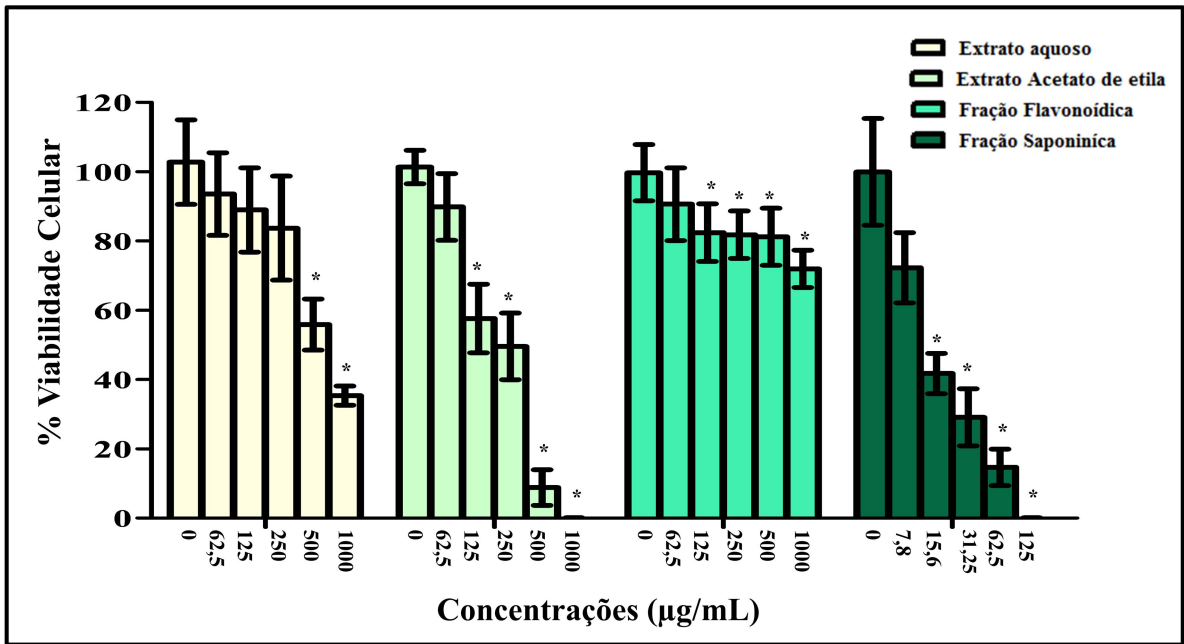


**Figura 9:** Alterações histológicas renais no grupo I (HE 400 X)

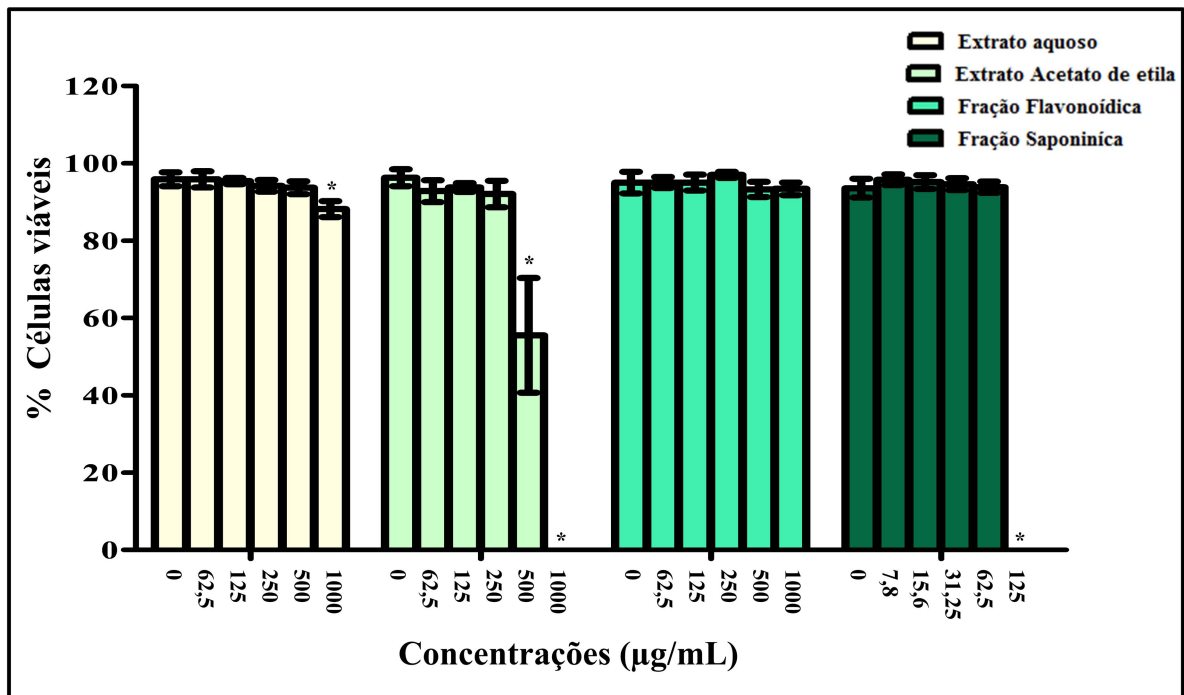
#### 4.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

Todos os extratos e frações de *A. sisalana* avaliados causaram redução da viabilidade de células Vero de forma concentração dependente ( $p < 0,05$ ) no teste de MTT. A completa inibição da viabilidade celular foi observada no tratamento com EE e FS, embora nesta última, a concentração necessária para a evidência desse efeito foi 8 vezes menor (125 mg/mL) que a do EE (1000 µg/mL). Os valores de  $CI_{50}$  encontrados para os EA, EE e FS foram de 570, 180 e 13,7 µg/mL, respectivamente. A fração flavonoídica mostrou baixa toxicidade, uma vez que o percentual de viabilidade celular na maior concentração correspondeu a 72% (Figura 10).

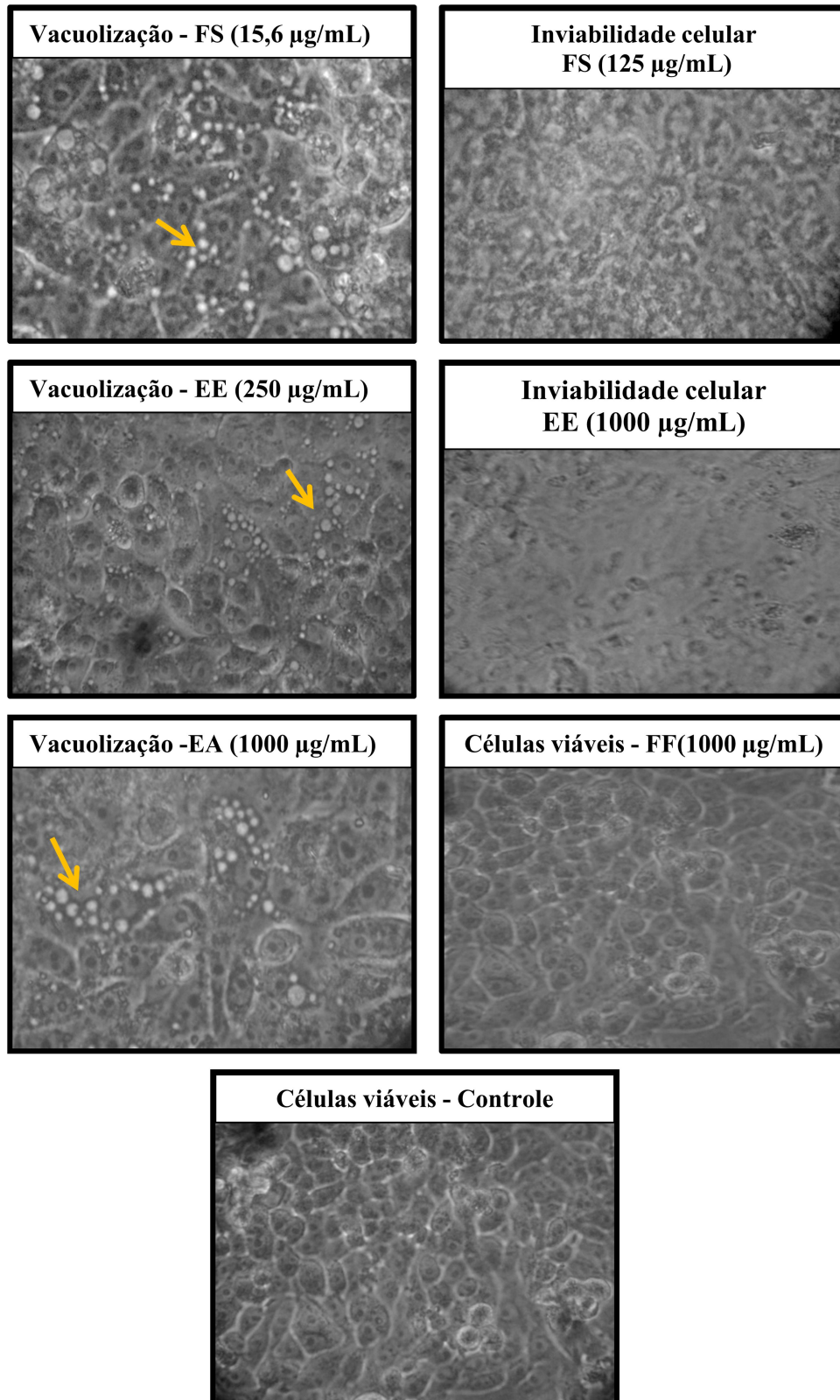
De forma semelhante, os resultados sobre a avaliação da integridade de membrana, pelo teste de exclusão ao corante azul de tripan, revelaram que os tratamentos com EE (1000 µg/mL) e FS em concentração 8 vezes menor (125 µg/mL) resultaram em completa inviabilidade celular, com degradação de todas as células à avaliação microscópica. Nesta avaliação também foi evidenciado a presença de vacúolos citoplasmáticos nos cultivos com FS (7,8 a 65,5 µg/mL), EE (125 a 500 µg/mL) e EA (250 a 1000 µg/mL). No tratamento com EA foi evidenciado um percentual de 88% de células viáveis na maior concentração (1000 µg/mL) em relação ao controle (96%). A FF não interferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) na integridade da membrana celular em todas as concentrações testadas (Figuras 11 e 12).



**Figura 10:** Percentual de viabilidade de células Vero, pelo teste MTT, após o tratamento com extratos e frações de *A. sisalana*



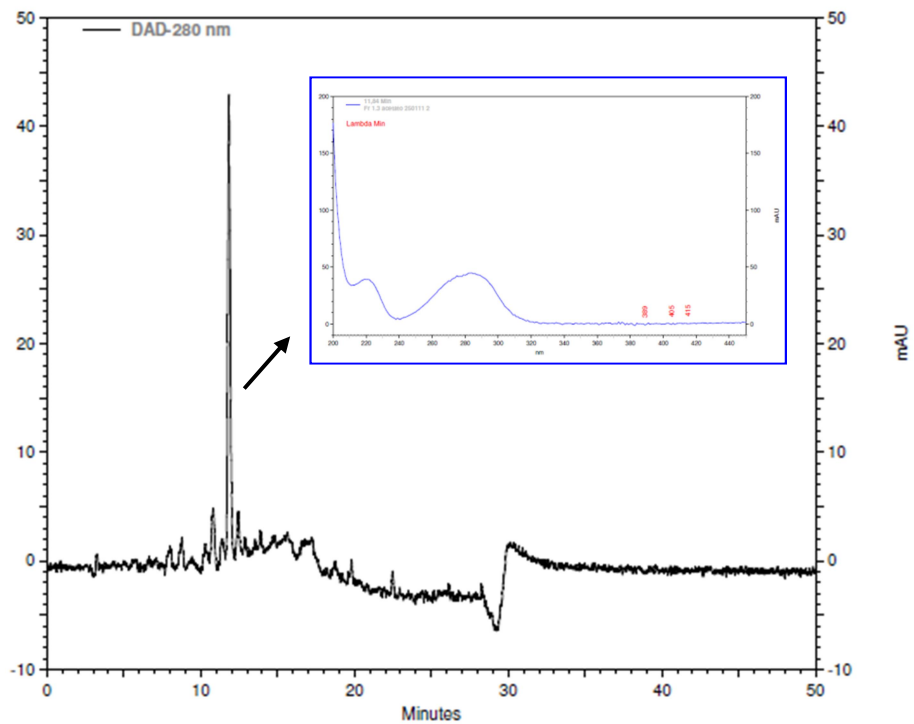
**Figura 11:** Percentual de células Vero viáveis, pelo teste azul de tripan, tratadas com extratos e frações de *A. sisalana*



**Figura 12:** Cultivos de células Vero após 24 hs de exposição aos extratos e frações de *A. sisalana* (Obj x20)

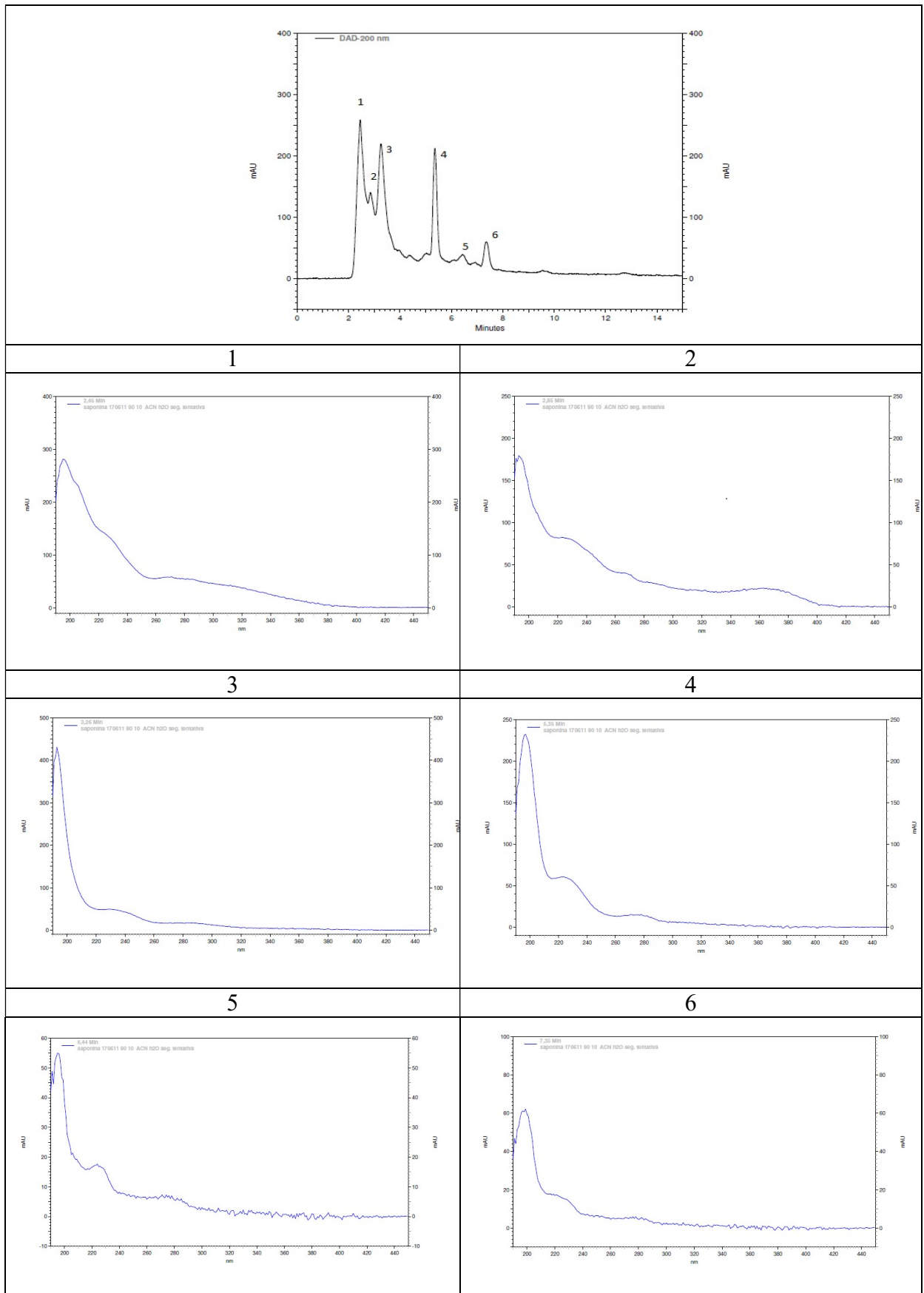
#### 4.4 Análise das frações de *A. sisalana* por CLAE-DAD

A purificação do extrato acetato de etila de *A. sisalana* possibilitou a obtenção de uma fração contendo como componente majoritário um homoisflavonoide e outra fração contendo uma mistura de saponinas. As figuras 13 e 14 apresentam os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodos (CLAE-DAD) para as frações flavonoídica e saponínica, respectivamente.



**Figura 13:** Perfil cromatográfico em 280 nm da fração flavonoídica de *A. sisalana*





**Figura 14:** Perfil cromatográfico em 240 nm da fração saponínica de *A. sisalana*

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados dos testes *in vitro* revelaram elevada eficácia dos EA, EE e FF obtidos do resíduo de *A. sisalana* sobre ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos. Maior atividade ovicida foi observada para a FF, seguido do EE e EA, enquanto que a FS não apresentou efeito sobre ovos. Estudo realizado por Silveira (2009) demonstrou ação ovicida do resíduo líquido do sisal sobre nematoides de ovinos, sendo que o valor da  $CE_{50}$  (6,8 mg/mL) foi um 1,5 vezes maior em comparação ao observado para o extrato aquoso neste estudo. Esse autor utilizou o material obtido pela prensagem do resíduo do desfibramento, enquanto que no presente trabalho, o extrato aquoso foi preparado a partir da fervura de todo o resíduo de sisal, o que favoreceu uma maior extração de constituintes químicos. Domingues et al. (2010) também relataram elevado percentual de redução (99%) do número de larvas de nematoides gastrintestinais após o tratamento de culturas com fezes de caprinos com resíduo líquido de sisal.

A análise da fração flavonoídica por CLAE-DAD indicou que o principal composto presente nesta fração é um homoisoflavonoide, substância possivelmente relacionada com a atividade ovicida de *A. sisalana*. Efeito antiparasitário foi observado em outra classe de flavonoides, flavan-3-óis (catequina galato, epicatequina galato, galocatequina galato e epigalocatequina galato), que inibiram a eclosão de ovos de *T. colubriformis*, com valores de  $CE_{50}$  entre 0,27 a 0,36 mg/mL (MOLAN et al., 2003). Chen et al. (2009) isolaram três flavonoides e sete homoisoflavonoides das folhas de sisal, e verificaram que três homoisoflavonoides interferiram na resposta imune celular, inibindo a produção de interleucina-2 e interferon- $\gamma$  em células mononucleares de sangue periférico humano ativadas por fitohemaglutinina. Outras atividades biológicas, como antibacteriana (O'DONNELL et al., 2006), antioxidante (LIN et al., 2010) e antiinflamatória (HUNG et al., 2010), foram descritas para homoisoflavonoides isolados de plantas; no entanto não foram encontrados relatos sobre a atividade anti-helmíntica desses compostos.

A eclosão de ovos é iniciada por estímulos ambientais que leva a liberação de enzimas pela larva, como proteases, lipases e quitinases, que degradam a membrana do ovo (MANSFIELD et al., 1992). Os compostos presentes na fração flavonoídica de *A. sisalana* podem atuar inibindo a atividade destas enzimas. A ação antiparasitária de flavonoides tem sido atribuída a alterações na atividade de enzimas e/ou nos processos metabólicos dos parasitos (KERBOEUF et al., 2008).

Maior efeito *in vitro* sobre larvas infectantes foi observado para a fração saponínica de *A. sisalana*, embora com percentual de eficácia baixo (64,1%). Saponinas de *C. officinalis* e de *B. vulgaris* reduziram *in vitro* a viabilidade de larvas L<sub>3</sub> (75%) de *H. bakeri*, nematoide de ratos (DOLIGALSKA et al., 2011). No entanto, elevada atividade antiparasitária de saponinas extraídas de plantas tem sido registradas, como saponinas de *B. aegyptiaca*, que apresentaram efeito sobre o nematoide *C. elegans* (GNOULA et al., 2007) e contra larvas do mosquito *A. aegypti* (CHAPAGAIN et al., 2008).

Ademola et al. (2009) relataram a ação de metabolitos secundários de *K. senegalensis* sobre o desenvolvimento larvar *in vitro* de *H. contortus*, incluindo saponinas, flavonoides, taninos condensados e alcaloides. As CE<sub>50</sub> das frações A (saponinas), B (saponinas e alcaloides), C (saponinas, terpenoides, flavonoides, taninos condensados) e D (saponinas e taninos) corresponderam a 80,81; 63,73; 44,03; 63,90 µg/mL, respectivamente.

Variações nas atividades de diversas saponinas podem está relacionadas à estrutura química, como o tipo de aglicona, o número e composição das cadeias de açúcar e seu sítio de ligação (WANG et al., 2007). Diferenças no efeito anti-helmíntico de duas saponinas esteroidais de *Paris polyphylla* sobre *Dactylogyrus intermedius* em peixe dourado foi associado com a diferença nas cadeias de açúcar entre esses compostos (WANG et al., 2010).

O efeito das saponinas sobre a motilidade das larvas pode estar associado à interação dessas substâncias com proteínas da cutícula do parasito ou à sua ação de desestabilização das membranas celulares e consequente aumento da permeabilidade celular. Interferência de saponinas sobre a função da glicoproteína P do nematoide *H. bakeri* foi relatado por Doligalska et al. (2011). Lesões na membrana do protozoário *Leishmania* spp. foram evidenciadas após o tratamento *in vitro* com saponinas de *Y. filamentosa* (PLOCK et al., 2001). Efeito anti-helmíntico de saponinas de *A. auriculiformis* foi relacionado com danos na membrana devido à formação de radicais livres, como o ânion superóxido, que induzem alterações através do aumento da peroxidação lipídica da membrana (SINHA BABU et al., 1997; NANDI et al., 2004).

Nenhum efeito sobre a migração de larvas L<sub>3</sub> foi observado para a fração flavonoídica. Estudo *in vitro* com flavonoides glicosilados presentes em *O. vicifolia* revelou baixa eficácia sobre larvas infectantes de *H. contortus*. Os compostos rutina, nicotiflorina e narcissina (1200 µg/mL) reduziram a migração de larvas em percentuais de apenas 25, 30 e 35, respectivamente (BARRAU et al., 2005). A avaliação de extratos de plantas ricas em taninos condensados também tem demonstrado baixa ação sobre a motilidade de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*, sendo os taninos considerados com potentes inibidores da eliminação de cutícula



destas larvas (ALONSO-DÍAZ et al., 2011). Entretanto, elevada inibição da motilidade de larvas de *H. contortus* foi relatada para flavonas extraídas de *Struthiola argentea*, com CE<sub>90</sub> entre 3,1 a 61 µg/mL (AYERS et al., 2008).

Os extratos aquoso, acetato de etila e fração flavonoídica de *A. sisalana* apresentaram melhor efeito ovicida do que larvicida, enquanto que a fração saponínica mostrou atividade apenas sobre larvas. Diferenças na estrutura entre a membrana do ovo e a cutícula de larvas infectantes de nematoides (MANSFIELD et al., 1992) podem ter interferido na atividade destes extratos. Além disso, as atividades biológicas de extratos de plantas podem ser atribuídas à ação de mais de um princípio ativo, os quais podem apresentar diferentes mecanismos de ação.

Relatos de atividade diferenciada de extratos de plantas sobre estádios específicos do parasito têm sido descritos. As CE<sub>50</sub> obtidas para o líquido da casca de coco verde (OLIVEIRA et al., 2009) e para o óleo essencial de *E. stageriana* (MACEDO et al., 2010) foram maiores para a inibição do desenvolvimento larvar em comparação aos valores encontrados para o teste de eclosão de ovos. O extrato metanólico de *M. Esculenta* atuou sobre o desenvolvimento larvar, mas não apresentou efeito sobre ovos, migração de larvas L<sub>3</sub> e motilidade de adultos (MARIE-MAGDELEINE et al., 2010a).

Os resultados do experimento *in vivo* revelaram que o tratamento de caprinos com o extrato aquoso obtido do resíduo líquido de *A. sisalana* teve efeito parcial sobre a contagem de ovos e larvas L<sub>3</sub>, mas não se observou diferença ( $p > 0,05$ ) no número de espécimes adultos entre os grupos tratado e o controle negativo. Estes achados indicam que o extrato aquoso de sisal não atuou no controle de nematoides gastrintestinais, considerando-se que a eficácia de um anti-helmíntico é assegurada quando o percentual de redução é igual ou superior a 90% (VERCRUYSSSE et al., 2001). Contudo, um menor número de parasitos foi encontrado no grupo tratado com sisal em relação ao grupo que não recebeu nenhum tratamento, o que pode sugerir a existência de compostos ativos nesse extrato que atuem contra nematoides.

A ação do extrato aquoso foi maior sobre o desenvolvimento de L<sub>3</sub>, provavelmente pelo efeito residual do extrato nas fezes dos animais tratados, que poderá auxiliar no controle das nematodioses, reduzindo a contaminação das pastagens com o estágio infectante (L<sub>3</sub>).

Ao tratar caprinos com 0,9 g/kgPV/dia do resíduo líquido de *A. sisalana* durante período de oito dias de tratamento, Domingues et al. (2010) encontrou apenas 36% de redução do número total de larvas L<sub>3</sub> nas coproculturas, mas não houve diminuição do OPG. A dose diária do extrato utilizada, no presente estudo, foi 95% superior à empregada por esse autor, o

que pode explicar maior percentual de redução do OPG e LPG e o que sugere uma associação entre o aumento da dose e efeito anti-helmíntico.

Diferenças na eficácia anti-helmíntica foram observadas entre os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo*. Isto pode ser explicado pelo fato de nos ensaios *in vitro*, os extratos estão em contato direto com os parasitos e as concentrações de substâncias potencialmente ativas contidas no mesmo nem sempre correspondem à sua biodisponibilidade *in vivo* (GITHIORI et al., 2006); além da possibilidade de biotransformação desses compostos no organismo animal (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004; VANDAMME e ELLIS, 2004).

Em animais poligástricos, os microorganismos ruminais podem atuar sobre os constituintes químicos da planta, reduzindo sua biodisponibilidade (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004), o que pode ter contribuído para a baixa eficácia anti-helmíntica do extrato aquoso de *A. sisalana*. A degradação de saponinas extraídas de *Yucca schidigera* e *Quillaja saponaria* foi elevada em avaliações *in vitro* do metabolismo ruminal (MAKKAR e BECKER, 1997; WANG et al., 1998), o que foi confirmado também em cordeiros com a administração intra-ruminal de saponinas de *Y. schidigera*, na qual ocorreu rápida hidrólise no rúmen, e conseqüentemente quantidade expressiva de saponinas livres no omaso e abomaso (FLAOYEN et al., 2002). Relatos de degradação de flavonoides por bactérias do rúmen de bovinos (KRUMHOLZ et al., 1986) e do intestino humano (BRAUNE et al., 2001) também tem sido descritos.

A eficácia do levamisol sobre nematoides no grupo controle positivo foi inferior a 90%. Além disso, o OPG de um animal deste grupo permaneceu alto, o que levou a morte onze dias após o tratamento. Isto pode ser um indicativo de resistência destes parasitos, como já registrado em caprinos e ovinos no Brasil (MELO et al., 2003; SCZESNY-MORAES et al., 2010).

O tratamento de caprinos por via oral com o extrato aquoso de sisal não causou alterações clínicas sugestivas de toxicidade. A baixa absorção intestinal das saponinas pode ser responsável pela reduzida toxicidade quando administradas oralmente (PRICE et al., 1987). Domingues et al. (2010) também não observaram influência do tratamento de caprinos com o resíduo líquido de sisal (0,9 g/kgPV), durante oito dias, sobre os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Entretanto, as saponinas podem interferir na fermentação ruminal, com aumento do pH, diminuição da população de protozoários, da concentração de ácidos graxos voláteis (SANTOSO et al., 2007), do nível de NH<sub>3</sub>-N (amônia-nitrogênio) e da produção de metano (WANG et al., 2009).

Todos os parâmetros hematológicos avaliados encontraram-se dentro do valor de referência (PUGH, 2004). Apenas para o nível de hemoglobina houve diferença significativa após o tratamento, sendo maior no grupo II (controle positivo) quando comparado aos demais grupos, possivelmente em virtude do menor nível de infecção parasitária, uma vez que pode existir correlação inversa entre OPG e hemoglobina (FARIAS et al., 2002). Contudo, hemólise é uma alteração frequentemente associada à exposição por saponinas, possivelmente devido a sua capacidade de formar complexos com esteróis da membrana dos eritrócitos, o que causa aumento na permeabilidade e conseqüentemente perda da hemoglobina. Em estudos *in vitro* com saponinas esteroidais de *A. sisalana* sobre eritrócitos de humanos foi verificada alta atividade hemolítica (SANTOS et al., 1997).

Diferenças estatísticas nas análises de eritrócitos, monócitos, AST e GGT foram observadas intragrupos entre os dias 0 e 9. Variações fisiológicas que são influenciadas por raça, idade, sexo, regime de manejo, stress, condições nutricionais e ambientais podem ter contribuído para este resultado (TUCCI et al., 1989; SILVA et al., 2004).

Os níveis séricos de AST, ALT e fosfatase alcalina (TUCCI et al., 1989) e GGT (SILVA et al., 2004) conservaram-se na faixa de normalidade, o mesmo ocorrendo com os níveis de ureia e creatinina (D'ANGELINO et al., 1990; SILVA et al., 2003), apesar do aumento significativo nas dosagens no grupo tratado com extrato aquoso de sisal. Contudo, lesões hepáticas de caráter discreto foram evidenciadas pela histopatologia, tanto nos animais tratados quanto nos controles, que podem ser conseqüentes a fatores não explorados neste estudo. A infecção por *H. contortus*, pode causar anemia (VIEIRA, 2005) resultando em hipóxia e conseqüentemente alterações nos hepatócitos (MCGAVIN E ZACHARY, 2009). Apesar dos animais não apresentarem, no momento, anemia, não há um histórico clínico, e o acompanhamento dos animais foi realizado durante 22 dias. Nefrite intersticial linfocitária aguda de caráter discreto e focal também foi encontrada em apenas um animal do grupo I, provavelmente sem associação com a atividade da planta.

Estudo realizado por Wisloff et al. (2008) demonstrou que a administração intraruminal do suco de *Y. schidigera* (63 e 126 mg/kg de sapogenina) em cordeiros, durante 21 dias, resultou em diarreia, desidratação, aumento dos níveis de creatinina e uréia, e necrose tubular aguda e hemorragia intersticial nos rins, enquanto que não foi observada alteração nas dosagens de AST, GGT e bilirrubina, mas houve acúmulo de glicogênio e gotículas de lipídios no citoplasma das células hepáticas.

As lesões verificadas no trato gastrointestinal foram compatíveis com infecções por nematoides gastrointestinais (VIEIRA et al., 2009) e semelhantes às encontradas por Domingues et al. (2010) ao tratar caprinos com o resíduo líquido de sisal.

Os tratamentos de cultivos de células Vero com os EA, EE e FS de *A. sisalana* promoveram efeitos citotóxicos. Em ambos os testes utilizados (MTT e exclusão ao corante azul de tripan), a FS mostrou maior citotoxicidade ao promover completa inviabilidade celular em concentração 40 e 8 vezes menor que a dos EA e EE respectivamente, o que sugere ser esta fração possivelmente responsável pela atividade citotóxica de *A. sisalana*. O teste de MTT mostrou melhor sensibilidade para detectar a inibição da viabilidade celular induzida por estes extratos e FF. Este método permite identificar alterações na atividade das desidrogenases mitocondriais envolvidas na cadeia respiratória celular.

A fração flavonoídica causou pequena diminuição da redução do MTT, enquanto que no teste de exclusão ao corante azul de tripan não foi observada nenhuma alteração significativa. Cultivos de células Vero também não foram sensíveis ao tratamento com isoflavonoides dos frutos de *S.torvum*, na concentração de 50 µg/mL (ARTHAN et al., 2002). Quercitina, flavonoide isolado de *Athrixia phyllicoides* com potente atividade antioxidante, apresentou baixa citotoxicidade sobre células Vero (MAVUNDZA et al., 2010). O homoisoflavonoide de *Dracaena draco* não foi ativo sobre células cancerígenas (leucêmicas e de carcinoma epidermoide humano), enquanto que a saponina mostrou moderada atividade contra essas células (HERNÁNDEZ et al., 2006).

A avaliação microscópica dos cultivos revelou a presença de vacúolos citoplasmáticos após 24 horas de exposição ao EA, EE e FS, sendo esta alteração mais evidente para a FS. Vacuolização citoplasmática foi relatada por Danloy et al. (1994), ao tratar cultivos de melanoma e fibroblastos de ratos com  $\alpha$ -hederina, saponina triterpênica isolada de *H. helix*. A sapogenina, 20(S)-protopanaxadiol obtida de *Panax ginseng*, induziu a formação de vacúolos e apoptose em células de hepatocarcinoma humano. A origem destes vacúolos foi correlacionada com possíveis alterações no retículo endoplasmático e complexo de golgi (ZHU et al., 2011).

Outro estudo também verificou potencial citotóxico de saponinas e sapogeninas isoladas de *A. sisalana* sobre células cancerígenas mamária, pulmonar e glioblastoma de humanos. Entre os dez compostos isolados, quatro inibiram o crescimento celular, com  $CI_{50}$  variando entre 1,2 a 11,9 µM. As saponinas esteroidais foram mais tóxicas em comparação com as suas agliconas, demonstrando o importante papel das cadeias de açúcar na bioatividade dessas substâncias (CHEN, P. et al., 2011).

Citotoxicidade de saponinas esteroidais extraídas de espécies de monocotiledôneas sobre cultivos de células Vero tem sido documentado, com  $CI_{50}$  entre 2,8 a 15  $\mu\text{g/mL}$  (YANG et al., 2006; ZHANG et al., 2006). Entretanto, saponinas triterpênicas de *G. sylvestre* e *E. prostrata* não apresentaram efeito sobre células Vero na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , apesar de serem ativas contra células de tumor mamário humano (KHANNA e KANNABIRAN., 2009).

O mecanismo de ação de saponinas sobre células provavelmente está relacionado com sua característica anfipática e capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas, fosfolipídeos de membranas, o que pode levar a uma desorganização das membranas celulares. A atividade antiproliferativa de saponinas esteroidais de *B. aegyptiaca* sobre células cancerígenas mamária e do cólon humano foi associado com a indução de apoptose, através da ativação da caspase 3 e da produção de substâncias oxidantes (YANNAI et al., 2011). Alta taxa de apoptose também foi identificada em células de tumor de mama após exposição à saponinas triterpênicas de *C. ganpiniana* (DING et al., 2009).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos testes *in vitro* com nematoides gastrintestinais permitem inferir que os extratos aquoso, acetato de etila e a fração flavonoídica obtidos do resíduo de *A. sisalana* têm elevado efeito ovicida, sendo que a substância responsável por esta atividade possivelmente é um homoisoflavonoide. No entanto, no ensaio com larvas infectantes, a fração saponínica mostrou maior atividade sobre a migração larvar. Dessa forma, a atividade anti-helmíntica de *A. sisalana* possivelmente está relacionada aos compostos homoisoflavonoides e saponinas, que apresentaram ação diferenciada sobre estádios específicos dos nematoides.

No estudo *in vivo*, o extrato aquoso de *A. sisalana*, na dose utilizada, apresentou moderada atividade sobre ovos e estádios de vida livre, porém não foi eficaz para parasitos adultos. Este tratamento não mostrou potencial tóxico para caprinos.

A fração saponínica de *A. sisalana* foi a mais citotóxica em cultivo de células Vero.

O presente estudo contribuiu para o conhecimento da atividade anti-helmíntica do resíduo de *A. sisalana* contra nematoides gastrintestinais de caprinos e identificação de seus possíveis princípios ativos. O aproveitamento do resíduo da exploração de sisal pode ser uma alternativa para a obtenção de novos produtos com alto valor agregado.

## REFERÊNCIAS

- ADEMOLA, I.O.; ELOFF, J.N. *In vitro* anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.1-2, p.198-203, 2010.
- ADEMOLA, I.O; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Bioseparation and activity of *Khaya senegalensis* fractions against infective larvae of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.170-174, 2009.
- AFROSE, S. et al. Karaya saponin exerts a hypocholesterolemic response in rats fed a high-cholesterol diet. **Nutrition Research**, v.29, n.5, p.350-354, 2009.
- AKROUM, S. et al. Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v.4, n.2, p.93-96, 2009.
- ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C.; SANTOS, S.C.S. Frequência de helmintos gastrintestinais em caprinos leiteiros criados no estado da Bahia: Influência do sistema de criação e dos fatores etário e racial. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, suplemento 1, p.53, 1997.
- ALMEIDA, W.V.F. et al. Avaliação de plantas medicinais em caprinos da região do semi-árido paraibano naturalmente infectados por nematoides gastrintestinais. **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.1-7, 2007.
- ALONSO-DÍAZ, M.A. et al. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, no prelo, disponível on line em 8 de abril de 2011.
- ALONSO-DÍAZ, M.A. et al. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n.3-4, p.313-319, 2008.
- AL-SHAIBANI, I.R.M. et al. Ovicidal and larvicidal properties of *Adhatoda vasica* (L.) extracts against gastrointestinal nematodes of sheep *in vitro*. **Pakistan Veterinary Journal**, v.28, n.2, p.79-83, 2008.
- AMARANTE, A.F.T. et al. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n.1-2, p.91-106, 2004.
- ARAÚJO, J.V. et al. Controle biológico de nematoides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1177-1181, 2007.
- ARGENTIERI, M.P. et al. Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.120, n.2, p.189-197, 2008.
- AROSEMENA, N.A.E. et al. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid área in Brazil. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.150, n.11, p.873-876, 1999.
- ARTHAN, D. et al. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. **Phytochemistry**, v.59, n.4, p.459-463, 2002.
- ASSIS, L.M. et al. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.1-2, p. 43-49, 2003.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, n.4, p.631-639, 2004.
- AYERS, S. et al. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity *in vitro*. **Phytochemistry**, v. 69, n.2, p. 541-545, 2008.

- BACHAYA, H.A. et al. Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematodes of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.2, p.325-329, 2009.
- BAHUAUD, D. et al. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. **Parasitology**, v.132, n.4, p.545-554, 2006.
- BANDEIRA, D.A.; SILVA, O.R.R.F. Aproveitamento de resíduos. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília: APEX, 2006. p.58-61.
- BARRAU, E. et al. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, v.131, n.4, p.531-538, 2005.
- BARRETO, M.A. et al. Resistência de nematódeos gastrintestinais de caprinos a ivermectina, albendazole, levamisole e abamectina nos pólos Remanso, Coité e Jaguariri no semi-árido baiano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 19, 2005. Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2005. CD-ROM.
- BATATINHA, M.J.M. et al. Efeitos do suco de alho (*Allium sativum* L.) sobre nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1265-1266, 2004.
- BELTRÃO, N.E.M. A Planta. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília: APEX, 2006. p.24-28.
- BIRD, A.F. Vital staining of glycoprotein secreted by infective third stage larvae of *Haemonchus contortus* prior to exsheathment. **International Journal of Parasitology**, v.20, n.5, p.619-623, 1990.
- BLUNDEN, G.; PATEL, A.V. Barbourgenin, a new steroidal sapogenin from *Agave sisalana* leaves. **Journal of Natural Products**, v.49, n.4, p.687-689, 1986.
- BLUNDEN, G.; YI, Y. A reinvestigation of the steroidal sapogenins of *Agave sisalana*. **Lloydia**, v.37, n.1, p.10-16, 1974.
- BORGES, C.C.L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitologia Latinoamericana**, v.58, n.3-4, p.142-147, 2003.
- BOUTALEB-CHARKI, S. et al. Activity and mode of action of flavonoids compounds against intracellular and extracellular forms of *Trypanosoma cruzi* **The Open Natural Products Journal**, v.4, p.1-7, 2011.
- BRANCO, A. et al. D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial Crops and Products**, v.32, n.3, p.507-510, 2010.
- BRASIL, Conselho Federal de Medicina Veterinária. Procedimentos e Métodos de eutanásia em animais. Resolução Nº. 714, de 20 de junho de 2002.
- BRAUNE, A. et al. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.5558-5567, 2001.
- BROUDISCOU, L.P. et al. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, n.3-4, p.263-277, 2000.
- BRUNET, S. et al. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. **Parasitology**, v.134, n.9, p.1253-1262, 2007.
- BURKE, J.M. et al. Garlic and papaya lack control over gastrointestinal nematodes in goats and lambs. **Veterinary Parasitology**, v.159, n.2, p.171-174, 2009a.
- BURKE, J.M. Herbal dewormer fails to control gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1-2, p.168-170, 2009b.
- BUTTLE, D.J. et al. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, v.4, p.1-11, 2011.



- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.
- CHAGAS, A.C.S. et al. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes® in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v.151, n.1, p. 68-73, 2008.
- CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L.S. Ação de *Azadirachta indica* (neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.1, p.49-55, 2007.
- CHAPAGAIN, B.P. et al. Larvicidal activity of saponinas from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. **Bioresource Technology**, v.99, n.5, p.1165-1168, 2008.
- CHEN, H.J. et al. Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from Adlay bran. **Food Chemistry**, v.126, n.4, p.1741-1748, 2011.
- CHEN, P.Y et al. Cytotoxic steroidal saponinas from *Agave sisalana*. **Planta Medica**, v.77, n.9, p.929-933, 2011.
- CHEN, P.Y. et al. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. **Molecules**, v.14, p.1789-1795, 2009.
- CHO, Y.M. et al. A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered saponin-rich and isoflavones-containing soybean extract in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n.8, p.2150-2156, 2009.
- COLES, G.C. et al. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, n.1-2, p.35-43, 1992.
- COSTA, C.T.C. et al. Controle por fitoterápicos. In: CAVALCANTE, A.C.R. et al. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap.18. p.429-438.
- COSTA, C.T.C. et al. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v.74, n.1-3, p.284-287, 2008.
- COSTA, V.M.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.7, p. 563-568, 2009.
- D'ANGELINO, J.L. et al. Valores padrões de constituintes bioquímicos do soro de caprinos sadios no estado de São Paulo. Estudo da influência do fator etário. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.27, p.91-97, 1990.
- DANLOY, S. et al. Effects of alpha-hederin, a saponin extracted from *Hedera helix*, on cell cultured *in vitro*. **Planta Medica**, v.60, n.1, p.45-49, 1994.
- DAWIDAR, A.A.; FAYEZ, M.B.E. Steroid saponin. III. Distribution of steroid saponin in the sisal plant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.92, p. 420-423, 1961.
- DAWO, F.; TIBBO, M. Anthelmintic effect of *Halothamus somalensis* in Arsi-Bale goats. **Livestock Research for Rural Development**, v.17, n.6, 2005. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd17/6/dawo17068.htm>. Acesso em: 13 março 2011.
- DEBNATH, M. et al. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.3, p.177-187, 2010.
- DEEPAK, M. et al. Tribulosin and  $\beta$ -sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. **Phytomedicine**, v.9, n.3, p.753-756, 2002.
- DING, Q. et al. Cytotoxic and antibacterial triterpenoids derivatives from *Clematis ganpiniana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, n.10, p.383-385, 2009.
- DING, Y. et al. Steroidal saponinas from a cultivated form of *Agave sisalana*. **Phytochemistry**, v.28, n.10, p.2787-2791, 1989.

- DING, Y. et al. Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong no.1. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.41, n.3, p.557-560, 1993.
- DOLIGALSKA, M. et al. Triterpenoid saponins affect the function of P-glycoprotein and reduce the survival of the free living stages of *Heligmosomoides bakeri*. **Veterinary Parasitology**, v.179, n.1-3, p.144-151, 2011.
- DOMINGUES, L.F. et al. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.4, p.270-272, 2010.
- DUEÑAS, M. et al. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. **European Food Research and Technology**, v.232, n.1, p.103-111, 2011.
- DUNDER, R.J. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of hydrolysed extract of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Asparagaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.376-381, 2010.
- EGUALE, T. et al. *Haemonchus contortus*: *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental Parasitology**, v.116, n.4, p.340-345, 2007a.
- EGUALE, T. et al. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.3, p.428-433, 2007b.
- FARIAS, S.P. et al. Uso da contagem fecal de ovos de nematoides (OPG) para estimar a condição clínica de caprinos. **Ciência Veterinária nos Tropicós**, v.5, p.86-92, 2002.
- FERNANDES, L.H. et al. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p.733-740, 2004.
- FETTERER, R.H.; RHOADS, M.L. Biochemistry of nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Veterinary Parasitology**, v.46, n.1-4, p.103-111, 1993.
- FLAØYEN, A.; WILKINS, A.L.; SANDVIK, M. Ruminal metabolism in sheep of saponins from *Yucca schidigera*. **Veterinary Research Communications**, v.26, n.2, p.159-169, 2002.
- FOSTER, I.G. et al. *In vitro* analysis of anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.3-4, p.298-306, 2011.
- FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.6, p.587-605, 2002.
- GEBREMARIAM D.Y.; MACHIN, D.H. Evaluation of sun dried sisal pulp (*Agave sisalana* Perrine) as feed for sheep in Eritrea. **Livestock Research for Rural Development**, v.20, n.11, 2008. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd20/11/gebr20183.htm>. Acesso em: 13 março 2011.
- GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.4, p.308-320, 2006.
- GNUOLA, C. et al. Nematocidal compounds from the seeds of *Balanites aegyptiaca* isolation and structure elucidation. **International Journal of Pharmacology**, v.3, n.3, p. 280-284, 2007.
- GONDIM, T.M.S.; SOUZA, L.C. **Caracterização de frutos e sementes de sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 6p. (Circular Técnica, 127).
- GORDON, H.M., WHITLOCK, H.V.A. New technique for counting nematodes eggs in sheep feces. **Journal of the Council Scientific Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

- GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, I.M.; RÍO, J.C. Chemical composition of lipophilic extractives from sisal (*Agave sisalana*) fibers. **Industrial Crops and Products**, v.28, n.1, p. 81-87, 2008.
- HAMED, R.R. et al. Effect of *Agave attenuata* extracts on detoxification enzymes of *Biomphalaria alexandrina*. **The Environmentalist**, v.26, n.3, p. 157-164, 2006.
- HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v.119, n.2, p.203-210, 1989.
- HERNÁNDEZ, J.C. et al. A homo-isoflavonoid and a cytotoxic saponin from *Dracaena draco*. **Chemistry & Biodiversity**, v.3, n.1, p.62-68, 2006.
- HOSTE, H. et al. Goat-nematode interactions: think differently. **Trends in Parasitology**, v.26, n.8, p.376-381, 2010.
- HOSTE, H. et al. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v.22, n.6, p.253-261, 2006.
- HOSTE, H.; TORRES-COSTA, J.F.J. Non chemical control of helminthes in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.144-154, 2011.
- HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The Veterinary Record**, v.130, p.442-446, 1992.
- HUNG, T.M. et al. Homoisoflavonoid derivatives from the roots of *Ophiopogon japonicus* and their *in vitro* anti-inflammation activity. **Bioorganic & Medical Chemistry letters**, v.20, n.8, p.2412-2416, 2010.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**, v.36, p.1-93, 2009a.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, v.37, p.1-55, 2009b.
- IGLESIAS, L.E et al. Impacto ambiental de la ivermectina eliminada por bovinos tratados em otoño, sobre la coprofauna y la degradación de la materia fecal em pasturas (tandil, argentina). **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v.34, n.3, p. 83-103, 2005.
- IQBAL, Z. et al. Anthelmintic activity of *Swertia chirata* against gastrointestinal nematodes of sheep. **Fitoterapia**, v.77, n.6, p.463-465, 2006.
- JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
- JOSHI, B.R. et al. Effect of feeding *Sericea lespedeza* leaf meal in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.178, n.1-2, p.192-197, 2011.
- KAHIYA, C.; MUKARATIRWA, S.; THAMSBORG, S.M. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. **Veterinary Parasitology**, v.115, n.3, p. 265-274, 2003.
- KAMINSKY, R. et al. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, v.103, n.4, p.931-939, 2008.
- KHANNA, V.G.; KANNABIRAN, K. Anticancer-cytotoxic activity of saponins isolated from the leaves of *Gymnema sylvestris* and *Eclipta prostrata* on Hela cells. **International Journal of Green Pharmacy**, v.3, p.227-229, 2009.
- KAR, P.K.; TANDON, V.; SAHA, N. Anthelmintic efficacy of genistein, the active principle of *Flemingia vestita* (Fabaceae): alterations in the free amino acid pool and ammonia levels in the fluke, *Fasciolopsis buski*. **Parasitology International**, v.53, n.4, p.287-291, 2004.
- KASSU, A. et al. Ethnomedical aspects of the commonly used toothbrush sticks in Ethiopia. **East African Medical Journal**, v.76, p.651-653, 1999.

- 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.
- KERIKO, J.M.; MUTUA, M.M. Insecticidal activities of the sisal plant, *Agave sisalana*, Agavaceae extracts against white termites, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) Rhinotermitidae. **Journal of Agriculture, Science and Technology**, v.10, n.1, p.70-75, 2008.
- KETZIS, J.K. et al. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. **Small Ruminant Research**, v.44, n.3, p.193-200, 2002.
- KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.
- KRUMHOLZ, L.R. et al. A rumen bacterium degrading quercetin and trihydroxybenzenoids with concurrent use to formate or H<sub>2</sub>. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.213, p.211-214, 1986.
- LAKSHMI, V. et al. Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoids tested against *Brugia malay*. **Acta Tropica**, v.116, n.2, p.127-133, 2010.
- LANDAU, S. et al. Anthelmintic activity of *Pistacia lentiscus* foliage in two Middle Eastern breeds of goats differing in their propensity to consume tannin-rich browse. **Veterinary Parasitology**, v.173, n.3-4, p. 280-286, 2010.
- LIMA, M.M et al. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.94-100, 2010.
- LIN, Y. et al. Characterization of homoisoflavonoids in different cultivation regions of *Ophiopogon japonicus* and related antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, n.5, p.757-762, 2010.
- LIU, Y. et al. Studies on the interaction of total saponins of panax notoginseng and human serum albumin by Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.59, n.12, p.2747-2758, 2003
- LUNA, L.G. Preparation of tissue. In: Luna, L.G. (Ed.), **Manual of the histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258pp.
- MACEDO, I.T.F. et al. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.173, n.1-2, p.93-98, 2010.
- MACIEL, M.V. et al. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.1-2, p.98-104, 2006.
- MAGID, A.A. et al. Cytotoxic triterpenoid saponinas from the stem bark of *Antonia ovata*. **Phytochemistry**, v.71, n.4, p. 429-434, 2010.
- MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Degradation of quilaja saponinas by mixed culture of rumen microbes. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, n.4, p.243-245, 1997.
- MANSFIELD, L.S.; GAMBLE, H.R.; FETTERER, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* – I. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.103B, n.3, p.681-686, 1992.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 15, de 25 de maio de 2009. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 30 agosto 2010.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 6, de 16 de março de 2010. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 30 agosto 2010.

- MARIE-MAGDELEINE, C. et al. *In vitro* effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.173, n.1-2, p.85-92, 2010a.
- MARIE-MAGDELEINE, C. et al. *In vitro* effects of *Curcubita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.161, n.1-2, p.99-105, 2009.
- MARIE-MAGDELEINE, C. et al. *In vitro* effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v.89, n.1, p.88-92, 2010b.
- MARINHO, M.L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.3, p.64-69, 2007.
- MARTÍN, R.S.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponinas. **Crop Protection**, v.27, n.3-5, p.310-319, 2008.
- MAVUNDZA, E.J. et al. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of flavonoids isolated from *Athrixia phyllicoides*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.23, p.2584-2587, 2010.
- MAX, R.A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.1-2, p.138-143, 2010.
- McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: \_\_\_\_\_. **Bases da Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. pp.420-421.
- MELO, A.C.F.L. et al. Nematodeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos no estado do Ceará. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.339-344, 2003.
- MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L.; REIS, I.F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.294-300, 2009.
- MOLAN, A.L. et al. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v.33, n.14, p.1691-1698, 2003.
- MOLENTO, M.B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p.82-87, 2004.
- MOLENTO, M.B. et al. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.126-132, 2011.
- MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.3, p.117-121, 2001.
- NANDI, B. et al. Free radicals mediated membrane damage by the saponinas acaciaside A and acaciaside B. **Phytotherapy Research**, v.18, n.3, p.191-194, 2004.
- NEGESSE, T.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutritive value of some non-conventional feed resources of Ethiopia determined by chemical analyses and a *in vitro* gas method. **Animal Feed Science and Technology**, v.154, n.3-4, p.204-217, 2009.
- NERY, P.S.; DUARTE, E.R.; MARTINS, E.R. Eficácia de plantas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.3, p.330-338, 2009.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.
- O'DONNELL, G. et al. Phytochemistry and antimycobacterial activity of *Chlorophytum inornatum*. **Phytochemistry**, v.67, n.2, p.178-182, 2006.
- OLIVEIRA, L.M.B. et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.159, n.1, p.55-59, 2009.

- ORHAN, D.D. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v.165, n.6, p.496-504, 2010.
- PAOLINI, V. et al. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.113, n.3-4, p.253-261, 2003.
- PAOLINI, V. et al. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. **The Veterinary Journal**, v.170, n.2, p.260-263, 2005.
- PENG, J. et al. Subchronic toxicity and plasma pharmacokinetic studies on wogonin, a natural flavonoid, in beagle dogs. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, n.2, p.257-262, 2009.
- PEREIRA, R.H.M.A. et al. Diagnóstico da resistência dos nematoides gastrintestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, n.1, p.16-19, 2008.
- PESSOA, L.M. et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1-2, p.59-63, 2002.
- PIRES, M.F.C.; PURCHIO, A. Mycological evaluation of filtrated juice of *Agave sisalana* Perrine's leaf. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.3, p.272-275, 1991.
- PIZARRO, A.P.B. et al. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1, p.23-29, 1999.
- PLOCK, A.; SOCOLOWSKA-KÖHLER, W.; PRESBER, W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. **Experimental Parasitology**, v.97, n.3, p.141-153, 2001.
- POTTER, S.M. et al. Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.8, p.1287-1291, 1993.
- PRICE, K.R., JOHNSON, I.T., FENWICK, G.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.26, p.27-135, 1987.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **AFIP Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992. p.278.
- PUGH, D.G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 528pp.
- QI, J. et al. New features on the fragmentation patterns of homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* by high-performance liquid chromatography/diode-array detection/electrospray ionization with multistage tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.24, n.15, p.2193-2206, 2010.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, n.5, p.603-613, 2001.
- RODRIGUES, A.B. et al. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n.4, p.162-166, 2007.
- ROGERS, W.P.; BROOKS, F. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v.7, n.1, p.61-65, 1977.
- ROSENBERGER, G., DIRKSEN, G., GRÜNDER, H., STÖBER, M. (Eds.). Exame clínico dos bovinos. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.
- SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. Brasília: Embrapa-SPI; Sobral: Embrapa-CNPC, 1996. 220p.
- SANTOS, B.L. et al. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, v.127, n.2, p.404-411, 2011.
- SANTOS, F.C.B. et al. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do Nordeste brasileiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.142-149, 2005.

- SANTOS, J.D. Produção e consumo. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília: APEX, 2006. p.46-53.
- SANTOS, J.D.G et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.22, p.6181-6184, 2009.
- SANTOS, J.D.G. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e caracterização parcial de saponinas obtidas a partir do resíduo de *Agave sisalana* Perrine (sisal). 2009. 113f. Dissertação (Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. 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.16. p.403-412.
- SANTOS, W.R et al. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponina on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v.15, n.9, p.1024-1029, 1997.
- SANTOSO, B.; KILMASKOSSU, A.; SAMBODO, P. Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, n.1-2, p.58-68, 2007.
- 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.
- SCZESNY-MORAES, E.A. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.229-236, 2010.
- SHEN, J. et al. Evidence of gastro-intestinal system as an active and toxic target of sasanqua saponinas extract. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.60, n.1, p.43-49, 2008.
- SIDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. Mercado veterinário por classe terapêutica, 2009. Disponível em: <http://www.sidan.org.br/sd/sidan/index.html>. Acesso em: 23 agosto 2010.
- SILVA, O.R.R.; BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa SPI; Campina Grande: Embrapa CNPA, 1999. 205 p.
- SILVA, O.R.R.F. et al. **Cultivo do sisal no nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 24p. (Circular Técnica, 123).
- SILVA, S.L.; FAGLIARI, J.J.; CESCO, F.T.R.S. Atividade sérica das enzimas AST, ALP e GGT de caprinos das raças anglo-nubiana e saanen criados nos estados de São Paulo e Paraíba. **Ars Veterinária**, v.20, n.1, p.22-27, 2004.
- SILVA, S.L.; FAGLIARI, J.J.; CESCO, F.T.R.S. Concentrações séricas de cálcio, fósforo, magnésio, bilirrubinas, uréia e creatinina de caprinos das raças anglo-nubiana e saanen criados nos estados de São Paulo e Paraíba. **Ars Veterinária**, v.19, n.1, p.87-95, 2003.
- SILVA, V.C. et al. Atividade anti-helmíntica dos flavonoides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.573-576, 2008.
- SILVEIRA, R.X. Influência do resíduo líquido do sisal (*Agave sisalana*, Perrine) sobre o desenvolvimento, *in vitro*, de nematoides gastrintestinais de ovinos e caprinos. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- SINHA BABU, S.P. et al. Enhancement of membrane damage by saponinas isolated from *Acacia auriculiformis*. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.75, n.4, p.451-454, 1997.
- SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. 7.ed. Londres: Bailliere Tindall, 1982. 809p.
- SOUZA, W.H. O agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.1, n.1, p.51-58, 2007.

- SOUZA, W.M.A. et al. Avaliação *in vitro* do extrato hidroalcoólico (EHA) de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrointestinais (Trichostrongylidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.278-291, 2010.
- SUINAGA, J.D.; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. A História. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília: APEX, 2006. p.18-21.
- TAM, K.I; RONEER, M.R. Characterization of *in vivo* anti-rotavirus activities of saponin extracts from *Quillaja saponaria* Molina. *Antiviral Research*, v.90, n.3, p.231-241, 2011.
- 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.
- TAYLOR, M.A.; HUNTI, K.R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.183-194, 2002.
- TERRILL, T.H. et al. Efficacy of *Sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats: dose titration study. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.1-2, p.52-56, 2009.
- TUCCI, T.V. et al. Estudo comparativo dos valores normais das provas de função hepática em caprinos das raças saanen, parda alpina e mestiços do estado de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.26, p.241-247, 1989.
- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4.ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 150p.
- UJIKAWA, K.; PURCHIO, A. Substâncias antifúngicas, inibidoras de *Aspergillus flavus* e de outras espécies fúngicas, isoladas de *Agave sisalana* (sisal). **Ciência e Cultura**, v.41, n.12, p.1218-1224, 1989.
- VANDAMME, T.F.; ELLIS, K.J. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, n.10, p.1415-1436, 2004.
- VERCRUYSSSE, J. et al. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.3, p.171-193, 2001.
- VIEIRA, L.S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa-CNPC, 2005. 32p.
- VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.2, p.49-56, 2008.
- VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R.; XIMENES, L.J.F. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do nordeste do Brasil**. Sobral: Embrapa-CNPC; São Paulo: Merial, 1997. 50p.
- VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B. Nematoides gastrintestinais e pulmonares de caprinos. In: CAVALCANTE, A.C.R. et al. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap.2. p.65-94.
- VINCKEN, J.P. et al. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v.68, n.3, p.275-297, 2007.
- WANG, C.J.; WANG, S.P.; ZHOU, H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.148, n.2, p.157-166, 2009.
- WANG, G.X. et al. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. **Phytomedicine**, v.17, n.14, p.1102-1105, 2010.
- WANG, Y. et al. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). **Animal Feed Science and Technology**, v.74, n.2, p.143-153, 1998.
- WANG, Y. et al. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, n.7, p. 2528-2532, 2007.



- WHITLEY, N.C. et al. Effect of high tannin grain sorghum on gastrointestinal parasite fecal egg counts in goats. **Small Ruminant Research**, v.87, n.1-3, p.105-107, 2009.
- WISLØFF, H. et al. Toxicity testing of saponin-containing *Yucca schidigera* Roetzl. Juice in relation to hepato- and nephrotoxicity of *Nartheicum ossifragum* (L.) Huds. **Toxicon**, v.51, n.1, p.140-150, 2008.
- YANG, C. et al. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.5, p.1710-1714, 2006.
- YANNAI, E.B. et al. Antiproliferative activity of steroidal saponins from *Balanites aegyptiaca* – An *in vitro* study. **Phytochemistry Letters**, v.4, n.1, p.43-47, 2011.
- YEN, C.T. et al. Antitumor agents 271: total synthesis and evaluation of brazilein and analogs as anti-inflammatory and cytotoxic agents. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**, v.20, n.3, p.1037-1039, 2010.
- YOON, Y. et al. Relationships between the larval growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* by apigenin derivatives and the structures. **Archives of Pharmacal Research**, v.29, n.6, p.582-586, 2006.
- ZHANG, Y. et al. Atropurosides A-G, new steroidal saponins from *Smilacina atropurpurea*. **Steroids**, v.71, n.8, p.712-719, 2006.
- ZHU, G.Y. et al. 20(S)-Protopanaxadiol, a metabolite of ginsenosides, induced cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma HepG2 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n.1-2, p.88-98, 2011.
- ZOU, P. et al. The NMR studies on two new furostanol saponins from *Agave sisalana* leaves. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.44, n.12, p.1090-1095, 2006.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. 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.577-609.
- ZULLO, M.A.T. et al. Saponinas esteroidicas em sisal. **Bragantia**, v.48, n.1, p.21-25, 1989.

ANEXO A - Média e desvio padrão do percentual de inibição da eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais com os extratos e frações de *A. sisalana*

| <b>Extratos/<br/>Frações</b> | <b>Concentrações<br/>(mg/mL)</b> | <b>% inibição da<br/>eclosão de ovos</b> |
|------------------------------|----------------------------------|--|
| Aquoso                       | 0                                | 8,6 ± 1,2 <sup>a</sup>                   |
|                              | 0,625                            | 8,9 ± 2,1 <sup>a</sup>                   |
|                              | 1,25                             | 13,2 ± 1,1 <sup>b</sup>                  |
|                              | 2,5                              | 19,1 ± 2,5 <sup>c</sup>                  |
|                              | 5,0                              | 58,5 ± 4,7 <sup>d</sup>                  |
|                              | 10                               | 99,8 ± 0,4 <sup>e</sup>                  |
| Acetato de etila             | 0                                | 7,5 ± 2,2 <sup>a</sup>                   |
|                              | 0,02                             | 10,7 ± 3,5 <sup>b</sup>                  |
|                              | 0,04                             | 15,2 ± 1,3 <sup>c</sup>                  |
|                              | 0,08                             | 22,2 ± 3,9 <sup>d</sup>                  |
|                              | 0,16                             | 98,2 ± 0,6 <sup>e</sup>                  |
|                              | 0,32                             | 99,8 ± 0,5 <sup>e</sup>                  |
| Flavonoídica                 | 0                                | 10,2 ± 2,6 <sup>a</sup>                  |
|                              | 0,02                             | 18,55 ± 2,1 <sup>b</sup>                 |
|                              | 0,04                             | 35,90 ± 4,7 <sup>c</sup>                 |
|                              | 0,08                             | 93,60 ± 10,1 <sup>d</sup>                |
|                              | 0,16                             | 100 ± 0,0 <sup>e</sup>                   |
|                              | 0,32                             | 100 ± 0,0 <sup>e</sup>                   |
| Saponínica                   | 0                                | 10,2 ± 1,4 <sup>a</sup>                  |
|                              | 0,32                             | 12,0 ± 2,6 <sup>a</sup>                  |

ANEXO B - Média e desvio padrão do número de larvas de nematoides gastrintestinais recuperadas no teste de migração após o tratamento com os extratos e frações de *A. sisalana*

| <b>Extratos/Frações</b> | <b>Concentração<br/>(mg/mL)</b> | <b>Média ± DP</b>         |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Aquoso                  | 100                             | 215 ± 26,7 <sup>a</sup>   |
| Acetato de etila        | 100                             | 160 ± 29,7 <sup>b</sup>   |
| Flavanoídica            | 2,5                             | 326,7 ± 12,1 <sup>c</sup> |
| Saponínica              | 2,5                             | 115 ± 10,5 <sup>d</sup>   |
| Levamisol               | 0,5                             | 8,3 ± 7,5 <sup>e</sup>    |
| PBS                     | -                               | 318,3 ± 7,5 <sup>c</sup>  |

ANEXO C - Média e desvio padrão do percentual de viabilidade celular, pelo teste MTT, após o tratamento com extratos e frações de *A. sisalana*

| <b>Extratos/<br/>Frações</b> | <b>Concentrações<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>%viabilidade<br/>celular</b> |
|------------------------------|--|---------------------------------|
| Extrato aquoso               | 0  | $102 \pm 12,1^a$                |
|                              | 62,5   | $91,0 \pm 8,6^a$                |
|                              | 125  | $86,4 \pm 8,2^a$                |
|                              | 250  | $81,7 \pm 9,9^a$                |
|                              | 500  | $54,6 \pm 7,9^b$                |
|                              | 1000   | $34,6 \pm 3,5^b$                |
| Extrato acetato<br>de etila  | 0  | $101,3 \pm 4,3^a$               |
|                              | 62,5   | $88,5 \pm 8,5^{ab}$             |
|                              | 125  | $57,0 \pm 10,5^b$               |
|                              | 250  | $48,9 \pm 9,4^b$                |
|                              | 500  | $8,8 \pm 5,2^c$                 |
|                              | 1000   | $0,0 \pm 0,0^c$                 |
| Fração<br>flavonoídica       | 0  | $99,7 \pm 8,1^a$                |
|                              | 62,5   | $90,8 \pm 7,7^{ab}$             |
|                              | 125  | $82,4 \pm 6,4^{bc}$             |
|                              | 250  | $82,0 \pm 4,7^{bc}$             |
|                              | 500  | $81,4 \pm 7,0^{bc}$             |
|                              | 1000   | $72,3 \pm 5,7^c$                |
| Fração<br>saponínica         | 0  | $99,9 \pm 15,4^a$               |
|                              | 7,8  | $72,5 \pm 7,0^{ab}$             |
|                              | 15,6   | $41,8 \pm 3,4^{bc}$             |
|                              | 31,25  | $28,9 \pm 6,0^{cd}$             |
|                              | 62,5   | $14,4 \pm 4,4^{de}$             |
|                              | 125  | $0,0 \pm 0,0^e$                 |

ANEXO D - Média e desvio padrão do percentual de células viáveis, pelo teste azul de tripan, após o tratamento com extratos e frações de *A. sisalana*

| Extratos/ Frações | Concentrações<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % células viáveis  |
|-------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Aquoso            | 0                                     | $95,9 \pm 1,8^a$   |
|                   | 62,5                                  | $95,9 \pm 2,0^a$   |
|                   | 125                                   | $95,4 \pm 0,8^a$   |
|                   | 250                                   | $94,2 \pm 1,5^a$   |
|                   | 500                                   | $93,7 \pm 1,7^a$   |
|                   | 1000                                  | $88,1 \pm 2,0^b$   |
| Acetato de etila  | 0                                     | $96,3 \pm 2,2^a$   |
|                   | 62,5                                  | $92,8 \pm 2,8^a$   |
|                   | 125                                   | $93,8 \pm 1,1^a$   |
|                   | 250                                   | $92,1 \pm 3,4^a$   |
|                   | 500                                   | $55,5 \pm 14,8^b$  |
|                   | 1000                                  | $0 \pm 0^c$        |
| Flavonoídica      | 0                                     | $10,2 \pm 2,6^a$   |
|                   | 62,5                                  | $18,55 \pm 2,1^a$  |
|                   | 125                                   | $35,90 \pm 4,7^a$  |
|                   | 250                                   | $93,60 \pm 10,1^a$ |
|                   | 500                                   | $100 \pm 0,0^a$    |
| Saponínica        | 1000                                  | $100 \pm 0,0^a$    |
|                   | 0                                     | $93,6 \pm 2,4^a$   |
|                   | 7,8                                   | $95,8 \pm 1,4^a$   |
|                   | 15,6                                  | $95,1 \pm 1,8^a$   |
|                   | 31,25                                 | $94,6 \pm 1,5^a$   |
|                   | 62,5                                  | $93,8 \pm 1,5^a$   |
|                   | 125                                   | $0 \pm 0^b$        |

ANEXO E – Artigo científico intitulado “In vivo anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats” publicado na revista *Veterinary Parasitology*.