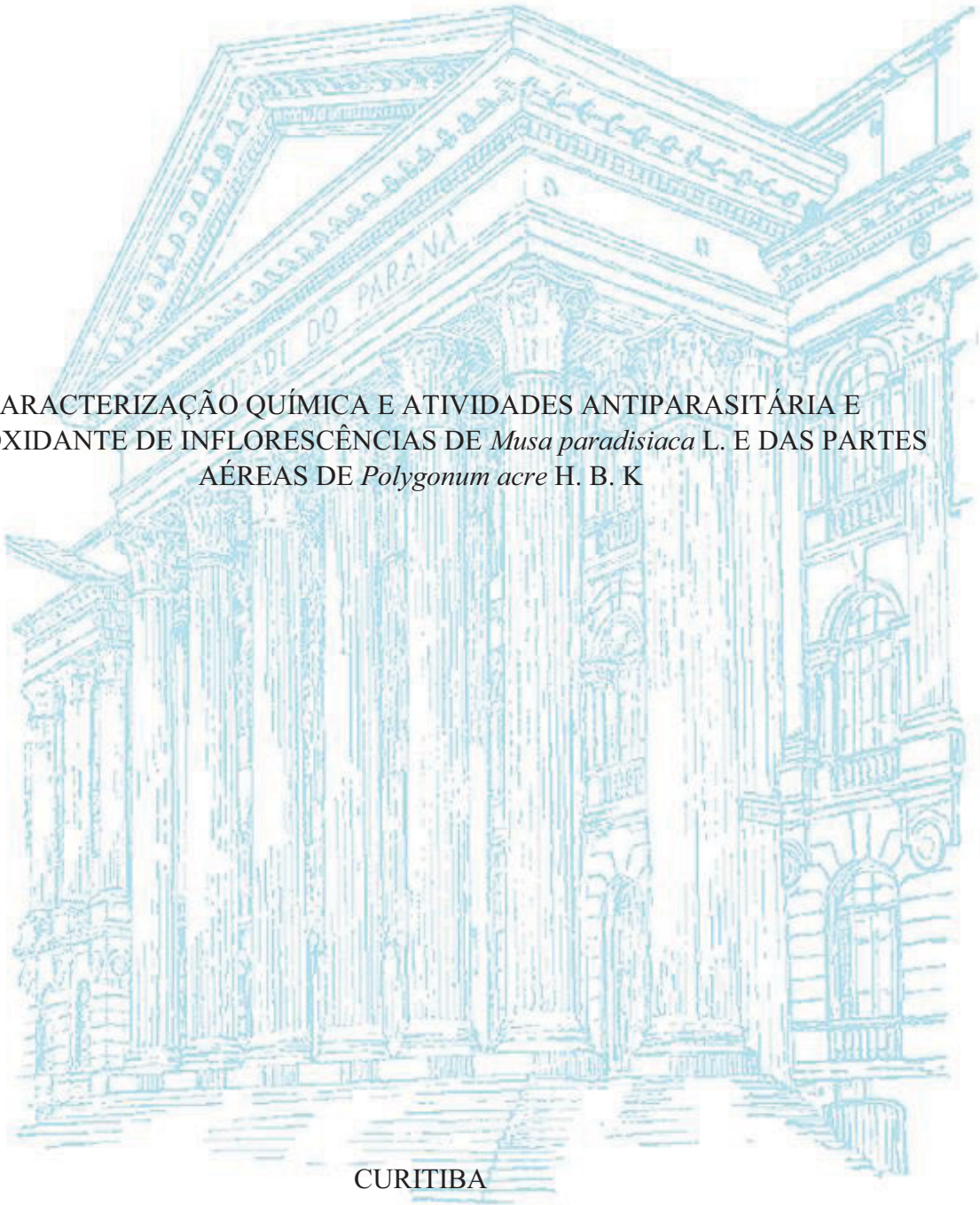
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELINA SEYFRIED

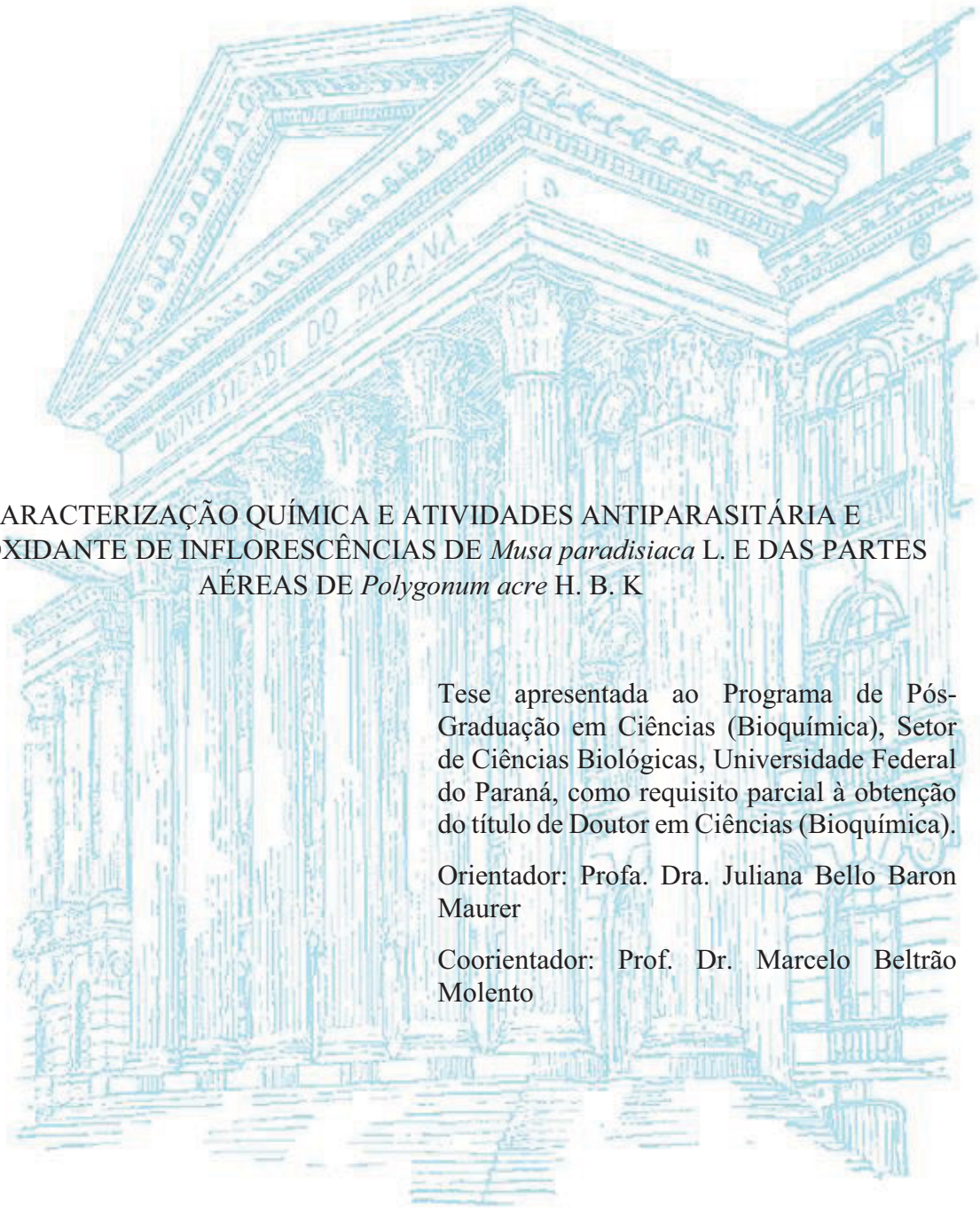
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIPARASITÁRIA E ANTIOXIDANTE DE INFLORESCÊNCIAS DE *Musa paradisiaca* L. E DAS PARTES AÉREAS DE *Polygonum acre* H. B. K



CURITIBA

2018

MELINA SEYFRIED



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIPARASITÁRIA E ANTIOXIDANTE DE INFLORESCÊNCIAS DE *Musa paradisiaca* L. E DAS PARTES AÉREAS DE *Polygonum acre* H. B. K

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Profa. Dra. Juliana Bello Baron Maurer

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940).

Seyfried, Melina.
Caracterização química e atividades antiparasitária e antioxidante de inflorescências de Musa paradisíaca L. e das partes aéreas de Polygonum acre H. B. K. / Melina Seyfried. – Curitiba, 2018.
164 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Bello Baron Maurer.
Coorientador: Marcelo Beltrão Molento.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Plantas medicinais. 2. Quercetina. 3. Haemonchus contortus. 4. Rutina. I. Título. II. Maurer, Juliana Bello Baron. III. Molento, Marcelo Beltrão. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (20. ed.) 581.634

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MELINA SEYFRIED** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIPARASITÁRIA E ANTIOXIDANTE DE INFLORESCÊNCIAS DE *Musa paradisiaca* L. E DE PARTES AÉREAS DE *Polygonum acre* H. B. K**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Agosto de 2018.

JULIANA BELLO BARON MAURER
Presidente da Banca Examinadora

FABIANO CLEBER BERTOLDI
Avaliador Externo

MARIA ELIANE MERLIN ROCHA
Avaliador Interno

CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR
Avaliador Externo

SELMA FARIA ZAWADZKI BAGGIO
Avaliador Externo

NOTA EXPLICATIVA

Os principais resultados obtidos estão representados na forma de artigo científico e *short communications*. Este formato está de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná. A tese é composta por introdução, revisão bibliográfica, objetivos, dois artigos científicos, dois *shorts communications* e conclusões.

Ao meu bem maior, minha família!

A Deus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, tenho que agradecer as pessoas que mais incentivaram e incentivam, que mais me apoiaram e apoiam, que mais sofreram e sofrem comigo, que a mais de 15 anos sentem pela minha ausência e que acreditaram e acreditam no meu potencial, mesmo eu não acreditando - *minha família*. Aos meus pais, Maria D. P. L Seyfried e Osmar Seyfried, que mesmo não se cuidando e ainda dando vários sustos, simplesmente quando eu estava mais *surtada/ocupada/enlouquecida/atrasada*, são os maiores presentes que Deus poderia ter me dado. Ao meu irmão, a minha cunhada e ao meu sobrinho, Arthur Seyfried, Flavia Flores Seyfried e Pedro Q. Seyfried, minha vida não estaria completa sem vocês. Obrigada por existirem na minha vida. E a todos da minha família que, de alguma forma, me apoiaram, incentivaram ou, simplesmente, oraram pelo meu sucesso, a minha gratidão eterna! **<3**

A Profa. Dra. Juliana Bello Baron Maurer (Departamento de Bioquímica - UFPR, Nupplamed), minha orientadora. Uma das pessoas mais incríveis que eu conheço. Obrigada pelo acolhimento nesses quase 11 anos. Se um dia eu chegar perto de 1% da pessoa e da profissional que você é, estarei realizada. Mais uma vez não tenho palavras para expressar toda a admiração e o carinho que sinto por você, muito obrigada por tudo. A profa. Dra. Selma Faria Zawadzki Baggio (Departamento de Bioquímica - UFPR, Nupplamed), minha "desorientadora", minha banca interna e minha amiga. Também gostaria de ser *tico* da pessoa maravilhosa que você é, ainda mais se eu puxasse os dotes para o bolos maravilhosos. Obrigada por me acolher mais uma vez. Para fechar o trio ternura, a Profa. Dra. Fabiola Regina Stevan (Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Universidade Positivo, Nupplamed). Pessoa essa, que sempre terá um lugar especial no meu coração, principalmente, por ter abertos as portas para a minha vida científica e profissional. Obrigada por tudo! Que essas três mulheres sensacionais permaneçam sempre pertinho de mim! **<3**

Ao pessoal do Núcleo Paranaense de Pesquisa Científica e Educacional de Plantas Medicinais (Nupplamed). Quantos *perrengues*, quantas *gambiarras*, quantos desfiles com luva rosa, quantos *jeitinhos*, quantos sentimentos de *bicarbonato de ódio* e quantas risadas. Como um lugar consegue atrair tantas pessoas boas?

E falando destas pessoas, tenho que iniciar os agradecimentos com a minha eterna *nega, miga, cumadre e together*, Andressa Soldera Silva. Você foi o meu porto mais que seguro em todos esses anos no laboratório, obrigada por tudo! Não tenho palavras para expressar todo esse amor! Que bom que os nossos caminhos se cruzaram, pois agora você nunca mais sairá do meu!

Ao *jaaaaaapoooonêis* como calcula isso? favorito, ao Fábio Tomio Yamassaki. Sorte do Nupplamed por ter tido, durantes todos estes anos, alguém tão querido, engraçado e inteligente como ele. E bota inteligente nisso, viu? Obrigada por toda a companhia e ajuda durantes estes anos!

A uma das primeiras pessoas que conheci no Nupplamed e que levarei para o resto da minha vida. Raquely Moreira Lenzi obrigada pela nossa amizade (dentro e fora do laboratório), por toda a ajuda nos experimentos e pelas ótimas tardes, mesmo aquelas quando tudo dava errado, pois era hora do "vamos fazer um café?".

As doces meninas, Monique Adriani Garcia da Silva e Hayana Santos, obrigada por toda a ajuda e companhia nesse tempinho. O nosso laboratório também não seria o mesmo sem vocês!

E para fechar o time Nupplamed, meu agradecimento ao Dr. Luciano H. Campestrini! Gente, o que é esse homem? *Tioooooooooo Lu,* praticamente tudo que eu aprendi nesses anos, foi graças a você! Obrigada pela amizade, pela paciência, por responder as mensagens desesperadas de madrugada e por sempre achar uma solução para salvar nossas vidas. Quero você por perto pelo resto da minha vida! **<3**

Ao meu co-orientador, o Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento (Departamento de Medicina Veterinária - UFPR). Obrigada por aceitar duas intrusas, que chegaram cheias de curiosidade e querendo mudar protocolos no seu laboratório, e por nos mostrar uma nova e linda linha de pesquisa. Aproveitando esse barco, gostaria também de agradecer a todos do Laboratório de Doenças Parasitárias - UFPR pelo convívio e por toda a ajuda prestada.

A Profa. Dra. Alda Lúcia Gomes Monteiro (Departamento de Zootecnia - UFPR), Coordenadora do Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovino e Caprinos (LAPOC - UFPR), pela disponibilização do LAPOC e aos estagiários e funcionários por toda a ajuda proporcionada.

Ao Dr. Alessandro Pelegrine Minho, pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Pecuária Sudeste). Obrigada por aceitar fazer parte da minha banca interna, por abrir as portas do laboratório de Sanidade animal (Embrapa Pecuária Sul - Bagé/RS) e por toda a ajuda durante este doutorado.

A Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez (Departamento de Bioquímica - UFPR) e demais professores e alunos do grupo de Oxidações Biológicas pela disponibilização dos equipamentos e a querida Profa Dra. Maria Eliane Merlin Roca (Departamento de Bioquímica - UFPR), do mesmo grupo, pela riquíssima contribuição na minha banca de defesa.

A Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior (Pontifícia Universidade Católica do Paraná) e ao pesquisador Dr. Fabiano Cleber Bertoldi (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) - UFPR pela oportunidade e incentivo. Aos coordenadores em vigor entre os anos de 2014 a 2018, aos demais professores e aos funcionários deste Programa, por todo ensinamento e ajudada prestada.

A Unidade Gestora do Fundo Paraná (Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior - Gov. PR (UGF/SETI/Gov. PR), PRONEX (CNPq/Fundação Araucária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos, que mesmo de fora do mundo bioquímico, sempre me incentivaram a sempre seguir em frente e para todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram com este trabalho.

Muitíssimo obrigada!!!!!!

Ser feliz não é ter uma vida perfeita.
Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância.
Usar as perdas para refinar a paciência.
Usar as falhas para esculpir a serenidade.
Usar a dor para lapidar o prazer e
usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.
Ser feliz, é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, perdas e frustações.
Ser feliz é deixar de ser vítima do problemas e se tornar autor da própria história

Augusto Cury

RESUMO

As plantas medicinais são amplamente utilizadas e estudadas por serem uma rica fonte de compostos bioativos, como os polifenólicos, pertencente à classe de metabólitos secundários. Esta classe, contendo numerosos compostos com pelo menos um grupamento fenol em sua estrutura, possui diversas propriedades biológicas que, por sua vez, lhe conferem uma vasta aplicabilidade em diversas áreas como: na terapêutica (como propriedades anti-inflamatória e antiparasitária) e na nutracêutica (como antioxidante), por exemplo. *Musa paradisiaca* L. (bananeira) e *Polygonum acre* H.B.K (erva de bicho) foram as espécies vegetais selecionadas em função da sua importância na medicina tradicional, bem como, devido as suas propriedades antiparasitárias e antioxidantes, relatadas em estudos científicos. A presente tese teve como objetivo caracterizar quimicamente os compostos fenólicos de inflorescências de *M. paradisiaca* e de partes áreas de *P.* acre e investigar suas propriedades anti-helmíntica e antioxidante, em modelos experimentais *in vitro*. As análises e os experimentos foram conduzidos com o intuito de relacionar ou correlacionar a composição fenólica com as propriedades apresentadas. Primeiramente, foram realizadas extrações aquosas a quente e hidroetanólicas, para ambos materiais acima mencionados. A estes extratos, ainda foram realizadas extrações em fase sólida (EFS). Em adição, ao material de *P. acre*, ainda foram realizadas extrações na forma tradicional (infusão, decocção e tintura). Análises químicas por espectrofotometria UV/VIS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a diferentes detectores (UV, EM/EM) foram utilizadas para caracterização química dos extratos obtidos. A atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* foi avaliada *in vitro* pelos testes de eclodibilidade de ovos (TEO) e de migração larval (TML) e a atividade antioxidante pelos testes *in vitro* de captação dos radicais ABTS e $O_2^{\bullet-}$ e pela redução do ferro. Tanto os extratos como as frações apresentaram conteúdo de compostos fenólicos (p. ex. ácidos fenólicos e flavonoides), com valores compatíveis com outras espécies citadas na literatura. Os extratos obtidos de *M. paradisiaca* apresentaram a melhor atividade ovicida, sendo o aquoso o mais eficiente (IC50 = 62,58 μg/mL). Apesar da rutina ter sido o composto majoritário, indicado pela análise de CLAE, nas condições testadas, o composto isolado não apresentou atividade ovicida efetiva, sugerindo que outros compostos, como o ácido clorogênico, podem contribuir com a propriedade observada. A EFS causou enriquecimento de cerca de 310% em relação ao conteúdo fenólico para a fração aquosa a quente da *M. paradisiaca* e de 70,9% para *P. acre.* A análise de CLAE-IES-EM/EM das frações EFS, confirmaram a abundância de rutina nas inflorescências de *M. paradisiaca* e demonstraram, que nas partes aéreas de *P. acre*, os flavonoides majoritários foram a quercetina e a isoquercetrina. Os resultados dos experimentos antioxidantes, foram estatisticamente significativos em relação aos teores de compostos fenólicos, mas não para de flavonoides. Os extratos oriundos das partes aéreas de *P. acre*, foram mais efetivos em relação as propriedades antioxidantes que os das inflorescências de *M. paradisiaca*, especialmente, em relação a captação do $O_2^{\bullet}$. Os resultados apresentados demonstram que os extratos e/ou frações de ambas as espécies vegetais, podem ser utilizadas para futuras aplicações em preparações anti-helmínticas e antioxidantes.

Palavras-chave: CLAE-IES-EM/EM, rutina, quercetina, ácido clorogênico, TEO, LMT, FRAP, ABTS, ânion superóxido, *Haemonchus contortus*.

ABSTRACT

Medicinal plants are widely used and studied as an alternative source of bioactive compounds, such as, polyphenolic compounds, which, belong to one of the secondary metabolite classes. This class is constituted by numerous compounds (with at least a phenol group), presenting several biological properties with applications in various areas such as therapeutical (as anti-inflammatory and anti-parasitic) and nutraceutical (as antioxidant). *Musa paradisiaca* L. (banana) and *Polygonum acre* H. B. K (water-pepper) were the selected plant species because of the importance in traditional medicine and scientific studies demonstrating their anti-parasitic and antioxidant properties. The present thesis aimed to characterize chemically the phenolic compounds from inflorescences of *M. paradisiaca* and aerial parts of *P. acre* and investigate its anti-parasitic and antioxidant properties, by *in vitro* experimental models. The experiments and analyses were conducted to relate or correlate the phenolic composition with the presented biological properties. Firstly, were performed hot aqueous and hydroalcoholic extractions, for both above mentioned materials. To these extracts, solid phase extractions (SAIs) were also carried out. In addition, to the material of *P. acre*, extractions were also carried out in the traditional form (infusion, decoction and tincture). Chemical analysis by spectrophotometry UV-VIS and high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to different detectors (UV, MS/MS) were used for chemical characterization of the extracts obtained. The anti-parasitic activity against *Haemonchus contortus* was evaluated *in vitro* by the egg hatch (EHT) ang larval migration (LMT) tests and the antioxidant activity by the capture of the ABTS and $O2^{\bullet-}$ radicals scavenging and iron reduction, *in vitro*. Both extracts as fractions showed the content of phenolic compounds (as example phenolic acids and flavonoids), with compatible values with other species mentioned in the literature. The extracts obtained from *M. paradisiaca* showed the best ovicidal activity, being the aqueous extract the more efficient (IC50 = 62.58 μg/mL). Despite rutin had been the majority compound, as indicated by HPLC analysis, under the conditions tested, the isolated compound not presented effective activity, suggesting that other compounds, such as chlorogenic acid, may contribute to the observed property. The SPE process caused an enrichment, in relation to total phenolic content, of 310% for the hot-aqueous extract of *M. paradisiaca* and 70.9% for *P. acre*. The HPLC-ESI-MS/MS analysis of the SPE extract confirmed the presence of rutin (*M. paradisiaca*) and quercetin and isoquercetrin (*P. acre*) as abundant compounds. The antioxidant experiment showed a positive correlation between the total phenolics content but not to the flavonoid one. Extracts and/or fractions from the aerial parts of *P. acre*, have been more effective in relation to antioxidant properties than those of the inflorescences of *M. paradisiaca*, especially, for capture of $O2^{\bullet-}$ radicals. The results demonstrated that the extracts and/or fractions of both plant species, can be used for future applications as anti-parasitic and antioxidant preparations.

Keywords: HPLC-ESI-MS/MS, rutin, quercetin, chlorogenic acid, EHT, LMT, FRAP, ABTS, anion superoxide, *Haemonchus contortus.*

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - MODELO ESQUEMÁTICO DAS PRINCIPAIS ROTAS BIOSSINTÉTICAS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS..... 30

FIGURA 2 - MODELO ESQUEMÁTICO DAS UNIDADES FUNDAMENTAIS C5 DOS TERPENOS..... 32

FIGURA 3 - ESTRUTURAS MOLECULARES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NITROGENADOS..... 33

FIGURA 4 - MODELO ESQUEMÁTICO DA ROTA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO ... 35

FIGURA 5 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS PRINCIPAIS FENILPROPANOIDES..... 37

FIGURA 6 - ESTRUTRA BÁSICA DAS CUMARINAS..... 37

FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS ISÔMEROS DOS NÚCLEOS CHALCONOIDES..... 38

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESQUELETO MOLECULAR CENTRAL DAS DIFERENTES CLASSES DE FLAVONOIDES..... 40

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA SIMPLES DA ESTRUTURA MOLECULAR DOS TANINOS HIDROLISÁVEIS E CONDENSADOS..... 43

FIGURA 10 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Musa paradisiaca* L. 45

FIGURA 11 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Polygonum acre* H.B.K. 49

FIGURA 12 - CICLO DE VIDA DO *Haemonchus contortus*..... 51

FIGURA 13 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO OVO, DA LARVA E DA FÊMEA ADULTA DE *Haemonchus contortus* 53

FIGURA 14 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICO DO ESTÔMAGO RUMINANTE..... 53

FIGURA 15 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS PRINCIPAIS ANTI-HELMÍNTICOS COMERCIAIS..... 58

FIGURA 16 - POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DE DIFERENTES FITOQUÍMICOS 62
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA AÇÃO NOCIVA DOS RADICAIS LIVRES 64
FIGURA 18 - DOENÇAS RELACIONADAS COM O ESTRESSE OXIDATIVO EM HUMANOS 65
FIGURA 19 - MODELO ESQUEMÁTICO DAS PRINCIPAIS LINHAS DE DEFESAS ANTIOXIDANTE 66
FIGURA 20 - MODELO ESQUEMÁTICO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DO α-TOCOFEROL FRENTE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA 67

ARTIGO I

FIGURE 1 - HPLC PROFILE AT 254 NM OF PHENOLIC STANDARDS (A), OF THE AQUEOUS (EHW-I) (B) AND HYDROALCOHOLIC (EOH-I) (C) EXTRACTS OBTAINED FROM THE INFLORESCENCES OF *Musa paradisiaca* 82
FIGURE 2 - STRUCTURES OF PHENOLIC COMPOUNDS IDENTIFIED BY HPLC OF *Musa paradisiaca* INFLORESCENCES 83
FIGURE 3 - EGG HATCH INHIBITION AND IC DETERMINATION OF THE AQUEOUS (EHW-I) (A, a), HYDROALCOHOLIC (EOH-I) (B, b) EXTRACTS OBTAINED FROM THE INFLORESCENCES OF *Musa paradisiaca*, PHENOLIC COMMERCIAL STANDARDS (CHLOROGENIC ACID AND RUTIN) (C, c) AND ALBENDAZOLE SULFOXIDE (D, d) USING THE EGG HATCH TEST 86
FIGURE 4 - GENERAL ASPECTS OF EGGS AND LARVAE ON THE EGG HATCH TEST 87
FIGURE 5 - LARVAL MIGRATION INHIBITION AND IC DETERMINATION OF THE AQUEOUS (EHW-I) (A, a) AND HYDROALCOHOLIC (EOH-I) (B, b) EXTRACTS OBTAINED FROM THE INFLORESCENCES OF *Musa paradisiaca* ON THE LARVAL MIGRATION TEST 88

ARTIGO II

FIGURE 1 - FLOW CHARTS FOR TRADITIONAL AND LABORATORY EXTRACTION METHODS 99

FIGURE 2 - STRUCTURES OF PHENOLIC COMPOUNDS IDENTIFIED BY HPLC-ESI-MS/MS 109

FIGURE 3 - PROFILE OF THE ACTIVITY CURVES OF $ABTS^{\bullet+}$ SCAVENGING OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM THE AERIAL PARTS OF *Polygonum acre* 111

FIGURE 4 - PROFILE OF THE ACTIVITY CURVES OF $O_2^{\bullet-}$ RADICAL SCAVENGING OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM THE AERIAL PARTS OF *Polygonum acre* 114

FIGURE S1 - GRAPHIC ILLUSTRATION OF PEARSON'S CORRELATION BETWEEN ABTS RADICAL SCAVENGING (A, a), FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (B, b), SUPEROXIDE ANION RADICAL SCAVENGING (C, c) AND TOTAL PHENOLIC (MG GAE/ G DRY EXTRACT) OR FLAVONOID (MG RE/ G DRY EXTRACT) CONTENT OF *Polygonum acre* FRACTIONS. THE WERE FOUND SIGNIFICANTLY CORRELATED AT $P < 0.05$ (TWO-TAILED) 122

SHORT COMMUNICATION I

FIGURE S1 - GRAPHIC ILLUSTRATION OF PEARSON'S CORRELATION BETWEEN ABTS RADICAL SCAVENGING (A, a), FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (B, b) AND TOTAL PHENOLIC (MG GAE/ G DRY EXTRACT) OR FLAVONOID (MG RE/ G DRY EXTRACT) CONTENT OF *Musa paradisiaca* 132

SHORT COMMUNICATION II

FIGURE 1 - EGG HATCH INHIBITION OF THE AQUEOUS (EHW-PA) AND HYDROALCOHOLIC (EOH-PA) EXTRACTS OBTAINED FROM AERIALS PARTS OF *Polygonum acre* USING THE EGG HATCH TEST 137

FIGURE 2 - HPLC PROFILE AT 280 NM OF THE AQUEOUS (EHW-PA) EXTRACT OBTAINED FROM THE AERIALS PARTS OF *Polygonum acre* 137

FIGURA S1 - LARVAL MIGRATION INHIBITION OF THE AQUEOUS (EHW-I) AND HYDROALCOHOLIC (EOH-I) EXTRACTS OBTAINED FROM THE AERIALS PARTS OF *Polygonum acre* ON THE LARVAL MIGRATION TEST 139

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - PRINCIPAIS CLASSES E SUBCLASSES DE FLAVONOIDES 41
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA *Musa paradisiaca* L. 44
TABELA 3 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS APRESENTADAS PELA *Musa paradisiaca* L. 46
TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *Polygonum acre* H. B. K..... 48
TABELA 5 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS APRESENTADAS PELO *Polygonum acre* H. B. K 50
TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *Haemonchus contortus* 52
TABELA 7 - ESPÉCIES VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA 60

ARTIGO I

TABLE 1 - CHEMICAL DATA OF THE AQUEOUS (EHW-I) AND HYDROALCOHOLIC (EOH-I) EXTRACTS OBTAINED FROM THE INFLORESCENCES OF *Musa paradisiaca* 80
TABLE 2 - QUANTIFICATION OF PHENOLIC AND FLAVONOID COMPOUNDS IN THE AQUEOUS (EHW-I) AND HYDROALCOHOLIC (EOH-I) EXTRACTS OBTAINED FROM INFLORESCENCES OF *Musa paradisiaca* 83

ARTIGO 2

TABLE 1 - FRACTIONAL PHYTOCHEMICAL DATA FOR THE AERIAL PARTS OF *Polygonum acre* 106
TABLE 2 - QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS PRESENT IN EHW-PA-C AND ETOHPA-C IN HPLC-ESI-MS/MS 108

TABLE 3 - ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM THE AERIAL PARTS OF *Polygonum acre* 112

SHORT COMMUNICATION I

TABLE 1 - YIELDS AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS FROM THE AQUEOUS AND HYDROALCOHOLIC EXTRACTS OBTAINED FROM I NFLORESCENCE OF *Musa paradisiaca* 127
TABLE 2 - QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS PRESENTS IN EHW-I-C AND ETOH-I-C BY HPLC-ESI-MS/MS 128
TABLE 3 - ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM THE INFLORESCENCE OF *Musa paradisiaca* 128
TABLE S1 - QUALITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS PRESENTS IN EHW-I-C AND EOH-I-C BY HPLC-ESI MS/MS 131

SHORT COMMUNICATION II

TABELA 1 - QUALITATIVE CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM THE AERIAL PARTS OF *Polygonum acre* 136

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ABTS -	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
BHA -	Butil-hidroxi-anisol
BHT-	Butil-hidroxi-tolueno
CLAE -	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMAPP -	Isopentenila dimetilalila
DOX -	1-desoxi-D-Xilulose
E4P -	Eritrose-4-fosfato;
EC_{50} -	Concentração que resulta na mudança de 50% de uma resposta.
EFS -	Extração em fase sólida
EHT-	*Egg hatch test*
EHW-I -	Extração (40%, m/v) aquosa a quente das inflorescências de *Musa paradisiaca*
EHW-PA -	Extração (6,7%, m/v) aquosa a quente das partes aéreas de *Polygonum acre*
EM/EM -	Espectrometria de massas sequencial
EREs -	Espécies reativas do enxofre
ERNs -	Espécies reativas do nitrogênio
EROs -	Espécies reativas do oxigênio
ERs -	Espécies reativas
IES -	Ionização por *eletrospray*
ESI -	*Electrospray ionization*
ETOH-I -	Extração (40%, m/v) hidroetanólica (70%, v/v) a temperatura ambiente das inflorescências de *Musa paradisiaca*
ETOH-PA -	Extração (12%, m/v) hidroetanólica (70%, v/v) a temperatura ambiente das partes aéreas de *Polygonum acre*
FRAP -	*Ferric reducing antioxidant power*
FRAP -	Ensaio antioxidante do poder redutor do ferro
GABA-	Ácido Gama-Aminobutírico
GI -	Gastrintestinal
H.B.K -	Aimé Bonpland, Alexander von Humboldt, Karl Sigismund Kunth
$HOH^{\bullet}$ -	Radical peroxil
HPLC-ESI-MS/MS	*High-performance liquid chromatography with electrospray ionization* tandem mass spectrometry
HTS -	Triagem de alto desempenho (*high throughput screening)*
IC_{50} -	Concentração que causa a inibição de 50% de uma resposta
IES -	Ionização por *eletrospray*
IPP -	Pirofosfato de isopentenila
L.-	Carl Nilsson Linnaeus
LMT	*Larval migration test*
MEP -	Metileritriol-4-fosfato
NO -	Óxido nítrico
nRLs -	Compostos não radicalares

$O_2^{\bullet-}$ - Radical ânion superóxido

$OH^{\bullet}$ - Radical hidroxila

OPG - Ovos por grama de fezes

PA-DA - Extração (0,4%, m/v) na forma de decocção das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-DB - Extração (0,6%, m/v) na forma de decocção das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-DC - Extração (0,83%, m/v) na forma de decocção das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-DD - Extração (1%, m/v) na forma de decocção das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-DE - Extração (3%, m/v) na forma de decocção das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-IA - Extração (0,4%, m/v) na forma de infusão das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-IB - Extração (0,6%, m/v) na forma de infusão das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-IC - Extração (0,83%, m/v) na forma de infusão das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-ID - Extração (1%, m/v) na forma de infusão das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-IE - Extração (3%, m/v) na forma de infusão das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-TA - Extração (10%, m/v) na forma de tintura das partes aéreas de *Polygonum acre*

PA-TB - Extração (13,64%, m/v) na forma de tintura das partes aéreas de *Polygonum acre*

PEP - Fosfoenolpiruvato

PGA - 3-Fosfoglicerato

Phe - Fenilalanina

RLs - Radicais livres

$ROO^{\bullet}$ - Radical peroxil

SPE- *Solid-phase extraction*

TCA - Ciclo dos ácidos cítricos

TEO - Teste de eclodibilidade de ovos

TML - Teste de migração larval

Trp - Triptofano

Tyr - Tirosina

UV/VIS - Espectroscopia Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27
2.1 PLANTAS MEDICINAIS: BREVE HISTÓRICO 27
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS: METABÓLITOS VEGETAIS 28
2.2.1 Metabólitos primários 29
2.2.2 Metabólitos secundários 29
2.2.2.1 Terpenos e compostos nitrogenados 31
2.2.2.2 Compostos fenólicos 34
a) Principais classes de compostos fenólicos 36
2.3 ESPÉCIES VEGETAIS DE INTERESSE 44
2.3.1 *Musa paradisiaca* L. 44
2.3.2 *Polygonum acre* H. B. K 47
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS 51
2.4.1 Atividade antiparasitária 51
2.4.1.1 Saúde animal x *Haemonchus contortus* 51
2.4.1.2 Características naturais da resistência do hospedeiro: sistema imunológico 54
2.4.1.3 Anti-helmínticos comerciais: resistência parasitária 56
2.4.1.4 Plantas medicinais e a atividade anti-helmíntica 59
2.4.2 Atividade antioxidante 62
2.4.2.1 Espécies reativas, radicas livres e estresse oxidativo 62
2.4.2.2 Antioxidantes: endógenos e exógenos 65
2.4.2.3 Plantas medicinais e a atividade antioxidante 68
3. OBJETIVOS 70
3.1 OBJETIVO GERAL 70
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 70
3.2.1 Artigo I: Ovicidal activity of polyphenol-rich extracts from inflorescences of *Musa paradisiaca* L 70
3.2.2 Artigo II: Phytochemical characterization and antioxidant activities of extracts of *Polygonum acre* H. B. K 70
3.2.3 Short communication I: *In vitro* antioxidant activity of the phenolic compounds presents in the inflorescences of *Musa paradisiaca* L 71

3.2.4 Short communication II: *In vitro* anthelmintic activity of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre* H. B. K 71

4. ARTIGOS

4.1 ARTIGO I - Ovicidal Activity of Polyphenol-rich Extracts from Inflorescences of *Musa paradisiaca* L 73

Abstract.....73

Keywords 73

1. Introduction.....74

2. Material and methods.....75

2.1 Chemicals and reagents 75

2.2 Plant material and preparing of aqueous and hydroalcoholic extracts of the inflorescences 76

2.3 Colorimetric methods 76

2.4 High-performance liquid chromatography analysis 76

2.5 Mass spectrometry analysis.....77

2.6 In vitro anthelmintic activity.....77

2.6.1Egg Hatch Test (EHT) 78

2.6.2 Larval migration test (LMT) 79

2.7 Statistical Analysis.....79

3. Results and discussion 80

3.1 Chemical characterization of M. paradisiaca inflorescence extracts.....80

3.2 Egg hatch activity 83

3.3 Larval migration test - LMT 88

4. Conclusions.....89

Conflict of interest 89

Acknowledgement.....89

References.....89

4.2 ARTIGO II - Phytochemical characterization and antioxidant activities of extracts of *Polygonum acre* H. B. K 94

SHORT ABSTRACT 95

ACKNOWLEDGEMENTS AND FINANCIAL INFORMATON 95

ABSTRACT 96

KEYWORDS 96

INTRODUCTION **96**
EXPERIMENTAL **97**
Chemicals and reagents **97**
Collection of plant samples from the aerial parts of *P. acre* **98**
Traditional extractions 98
Laboratory extractions 98
Chemical characterization **99**
Colorimetric determination of total carbohydrates, proteins, phenolic, flavonoid, condensed, and hydrolyzed tannin contents 99
Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) **100**
***In vitro* antioxidant assays** **101**
ABTS radical scavenging assay 101
Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay 102
Superoxide anion radical scavenging activities 102
Statistical Analysis **103**
RESULTS AND DISCUSSION **103**
Phytochemical characterization of fractions obtained by traditional and laboratory extractions from *P. acre* **103**
Colorimetric dosages 104
Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS **107**
***In vitro* antioxidant activity** **110**
Conflict of interest **115**
REFERENCES **116**
Supplementary material **122**
5. SHORT COMMUNICATIONS **123**
5.1 SHORT COMMUNICATION I - *In vitro* antioxidant activity of the phenolic compounds presents in the inflorescences of *Musa paradisiaca* L. **124**
Abstract **124**
1. INTRODUCTION **124**
2. METHOD **125**
2.1 Chemical 125

2.2. Plant material and extracts of the inflorescences....125
2.3 Contents of phenolic compounds and flavonoids....125
2.4 High Performance Liquid chromatography coupled to mass spectrometry/electron spray ionization (HPLC-ESI-MS/MS) analysis....125
2.5. Antioxidant assays *in vitro* 126
2.5.1 ABTS radical capture assays....126
2.5.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) 126
2.5.3 Superoxide anion radical scavenging 126
2.6 Statistical Analysis....127
3. FINDINGS 127
3.1. Yields and spectrophotometric chemical analysis....127
3.2 High Performance Liquid chromatography coupled to mass spectrometry/electron spray ionization (HPLC-ESI-MS/MS) analysis....127
3.3 Antioxidant assays *in vitro* 128
4. DISCUSSION AND CONCLUSION....128
Acknowledgement 129
Conflict of interest....129
5. REFERENCES....129
Supplementary material 131
5.2 SHORT COMMUNICATION II - *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum* a*cre* H. B. K.....134
1. Introduction 134
2. Methods....134
2.1 Aqueous and hydroalcoholic extractions of aerial parts of Polygonum acre....134
2.2 Qualitative phytochemical screening....135
2.3 High-performance liquid chromatography analysis (HPLC)....135
2.4 In vitro anthelmintic activity....135
2.4.1 The egg hatch test (EHT)....135
2.4.2 Larval migration test (LMT)....136
2.5 Statistical Analysis....136
3 Results and Discussion....136
Conflict of interest 138
Acknowledgement....138

References.....**138**

Supplementary material.....**139**

6 CONCLUSÕES.....**140**

REFERÊNCIAS.....**141**

ANEXOS.....**163**

ANEXO 1 - LAUDO TÉCNICO DE CONTROLE DE QUALIDADE DO FORNECEDOR COMERCIAL DO *Polygonum acre*.....163

ANEXO 2 - CERTIFICADO APROVADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.....164

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam uma rica mistura de diferentes compostos químicos e este fato, juntamente com todo o conhecimento adquirido ao longo do tempo, na medicina tradicional, estão proporcionando a descoberta de agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças. Atualmente, cerca de 7000 compostos naturais são utilizados na medicina moderna, sendo que grande parte destes são usados há séculos pelos curandeiros tradicionais. Outro fator importante é que estes compostos bioativos, geralmente, são biodegradações em produtos não tóxicos e, desta forma, potencialmente adequados para o consumo. Por fim, além do seu papel dietético e terapêutico, as plantas e/ou os seus derivados ainda apresentam grande importância econômica, pois a sua comercialização corresponde a uma mobilização superior a US$ 100 bilhões por ano (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997; CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; PESSOA et al., 2002; GURIB-FAKIM, 2006; KAMARAJ; RAHUMAN, 2011; EDDOUKS et al., 2014; SANTOS; CARVALHO, 2014).

Os compostos químicos vegetais, por convenção, podem ser classificados em metabólitos primários (ou essenciais) ou secundários (ou especiais). No metabolismo primário, encontram-se substâncias amplamente distribuídas em todas as plantas e que são responsáveis por processos metabólicos que desempenham atividades vitais, tais como: fotossíntese, respiração e transporte de solutos (BRISKIN, 2000; BRANDÃO et al., 2010). Produzidos a partir das moléculas do metabolismo primário, os produtos do metabolismo secundário são caracterizados por apresentarem estruturas complexas, baixa massa molecular e distintas atividades biológicas. Essas substâncias estão separadas em três grupos, distintos quimicamente, de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Sua concentração no vegetal é reduzida e a sua distribuição não é universal em os táxons. Embora sua função não seja essencial para a planta completar o seu ciclo de vida, como os produtos do metabolismo primário, essas moléculas desempenham importantes papéis na relação da planta com seu meio, gerando vantagens na perpetuação da espécie. (BALANDRIN et al., 1985; BRANDÃO et al*.,* 2010).

A *Musa paradisiaca* L., conhecida popularmente como banana-da-terra e pertencente à família Musaceae, possui grande importância nutricional e comercial, devido ao seu fruto. Entretanto, também é amplamente utilizada na medicina popular (IMAM; AKTER, 2011; PELISSARI et al., 2012). Tradicionalmente, diferentes partes da planta são utilizadas no tratamento de abscessos, queimaduras, câncer, diabetes, mordidas de cães, gangrena, dor, micose, além de atuarem como agente analgésico e antiasmático (COSTA; ANTÔNIO; BRITO,

1997; CAPOTE; SÁNCHEZ; FERNÁNDEZ, 2007; IMAM; AKTER, 2011; VENKATESH, et al., 2013).

O *Polygonum acre* H.B.K corresponde a uma planta herbácea anual que pertence à família Polygonaceae. É popularmente conhecido como erva de bicho, pimenta do brejo, pimenta d'água e persicária (LOPES et al*.,* 2003). Relatos demonstram que, tradicionalmente, infusões desta planta são aplicadas diretamente sobre varizes inflamadas e úlceras varicosas ou na forma de banhos para o tratamento de sarna. Outra espécie deste gênero, *P. hydropiperoides*, atualmente é comercializada farmacêuticamente, na forma de pomadas, pílulas e supositórios para tratamento de hemorroidas (CARDOSO, HONDA, DIAS, 2006; LIMA et al., 2009).

Ambas as espécies estão listadas em programa nacionais de estudos de plantas medicinais: A *M. paradisiaca* é integrante do Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos enquanto o *P. acre* está na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Apesar de serem utilizadas pelo homem, poucos dados científicos sobre as suas atividades biológicas e a composição químicas destas espécies, são encontrados na literatura.

O parasitismo interno, ou gastrintestinal, constitui um dos maiores problemas na produção de ruminantes ao redor do mundo, sendo uma das principais causas do retardo da produção, do alto custo de produção e em casos extremos, da morte dos animais, acarretando grandes perdas econômicas (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003; WALLER, 2006; KAMARAJ; RAHUMAN, 2011). O controle parasitário é realizado através do uso de fármacos anti-helmínticos sintéticos e semi-sintéticos, porém, negligências neste tipo de tratamento geraram o desenvolvimento de populações de parasitas resistentes a todas as classes de medicamentos comerciais, além, que estes (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997; PESSOA et al., 2002; NARI, 2003; KAMARAJ; RAHUMAN, 2011; EDDOUKS et al., 2014).

As células, em seu metabolismo normal, produzem espécies reativas do oxigênio (EROs). Porém, o seu acúmulo, ocasionado pela seu alto teor em relação às moléculas que as neutralizam (antioxidantes), em um processo chamado de estresse oxidativo podem ocasionar severos danos às membranas celulares, às proteínas, aos lipídeos e ácidos nucléicos (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Desta forma, este trabalho possui o propósito de investigar as frações vegetais provenientes destas espécies vegetais, principalmente, quanto ao conteúdo de compostos fenólicos e a sua ação em modelos experimentais, *in vitro*, para a atividade antiparasitário e antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS: BREVE HISTÓRICO

Acredita-se que o conhecimento sobre as plantas medicinais surgiu de forma instintiva, através da observação dos animais (HUFFMAN; VITAZKOVA, 2007; PETROVSKA, 2012; HOSSEINZADEH et al*.,* 2015). O compilado de informações adquiridas ao longo dos anos, sobre quais plantas utilizar e para qual finalidade, foi passado de gerações a gerações, primeiramente de forma oral e, após a sua invenção, na forma escrita (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009). A mais antiga prova registrada da utilização de plantas medicinais pelo homem, data de aproximadamente 5.000 anos atrás e corresponde a uma tábua de argila Suméria contendo 12 receitas para preparação de drogas, que utilizam mais de 250 espécies vegetais (PETROVSKA, 2012; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Na idade média (V até XV), as plantas medicinais foram, por muitos anos, utilizadas de forma empírica, sem conhecimento relacionado aos mecanismos de ações, em formulações farmacêuticas simples, que consistiam de tinturas, emplastros, pós, macerações, infusões e decocções (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; ATANASOV et al., 2015).

Entre os séculos XV e XVIII, a medicina herbária teve uma grande e crescente dissipação pois, nesta época, os documentos começaram a serem traduzidos em vários idiomas, além, do início da organização e classificação das plantas por Linnaeus (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; DAVID; WOLFFENDER; DIAS, 2015). No final do século XVIII e início do século XIX, foram desenvolvidas as primeiras técnicas de isolamento de compostos de origem vegetal, assim, dando início às primeiras investigações estruturais e clínicas sobre ervas medicinais. Neste período, foram descobertos os alcaloides, os taninos, as saponinas e as vitaminas, as quais, abriram caminhos para que, nas décadas seguintes, ocorresse o isolamento de muitos outros bioativos naturais, como por exemplo a quinina, a cafeína, a nicotina, a codeína, a atropina, a colchicina, a cocaína, a capsaicina e fitohormônios (SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; ATANASOV et al*.,* 2015).

No final do século XIX, as primeiras sínteses laboratoriais químicas dos compostos naturais começaram a serem feitas e, no início do século seguinte, após a descoberta da penicilina e do início da Segunda Guerra Mundial, o uso terapêutico de extratos e produtos naturais, parcialmente purificados, começou a ser substituído pelo uso de compostos puros e

sintéticos (BEUTLER, 2009; DAVID; WOLFFENDER; DIAS, 2015; ATANASOV et al., 2015).

Em um passado recente, fatores como a dificuldade de identificação da espécie vegetal, o baixo teor do produto natural na planta, a dificuldade da acessibilidade ao local da planta, a ameaça de extinção de espécies, as preocupações ecológicas para proteção da biodiversidade, a qualidade ambiental do local a qual a planta é cultivada, a complexidade estrutural dos compostos químicos, a incompatibilidade dos métodos de triagem de alto desempenho (HTS - *high throughput screening*), a dificuldade da identificação do mecanismo de ação e da patenteabilidade de produtos naturais, acarretaram no declínio da pesquisa dos compostos naturais. Como resultado, grandes empresas farmacêuticas, encerraram seus programas de pesquisas, deixando esse papel, quase que exclusivamente, para os centros de pesquisas universitários (BEUTLER, 2009; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; DAVID; WOLFFENDER; DIAS, 2015; ATANASOV et al., 2015).

Apesar do advento da química sintética e das pesquisas em sistemas robotizados (HTS), o impacto dos produtos naturais ainda é relevante, pois, das 1.073 pequenas moléculas químicas bioativas aprovadas como produtos, entre os anos de 1981 e 2010, apenas 36% eram puramente sintéticas (NEWMANN; CRAGG, 2012).

Os resultados obtidos, no presente momento, através de HTS sobre bibliotecas de compostos sintéticos, não estão superando as expectativas, pois, os compostos gerados por este mecanismo não possuem alta diversidade química (ATANASOV et al., 2015). Estes dados, juntamente com os efeitos colaterais indesejados, resultante da quantidade de drogas sintéticas ingeridas, estão resultando na sua contraindicação e no ressurgindo do interesse sobre as propriedades terapêuticas dos compostos presentes nas plantas medicinais (SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS: METABÓLITOS VEGETAIS

Compostos bioativos vegetais são moléculas presentes na planta que possuem efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos no homem e nos animais (BERNHOFT, 2010),

Estas substâncias correspondem a metabólitos, que por sua vez, podem ser moléculas intermediárias ou produtos obtidos através do metabolismo, que desempenham, como por exemplo, funções energéticas, estruturais, sinalizadoras, estimuladoras, inibitórias, catalíticas, de defesa e interação com outros organismos (TIWARI; RANA, 2015).

A rede metabólica vegetal é uma das mais extensas. Esses organismos produzem um notório repertório de compostos orgânicos a qual, a grande maioria, parece não participar diretamente nas funções vitais dos vegetais (AHARONI; GALILI, 2011; TIWARI; RANA, 2015). Didaticamente, são divididos em dois grandes grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários (GIADA, 2013).

2.2.1 Metabólitos primários

Os metabólitos primários, também conhecidos como essenciais, possuem distribuição universal, ou seja, são produzidos por todas os vegetais, além, de serem comuns nos seres vivos. Compreendem os blocos de construções fundamentais dos carboidratos, das proteínas, dos ácidos nucléicos, dos lipídeos e das moléculas presentes nos processos de obtenção de energia (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; BRANDÃO et al*.,* 2010; AHARONI; GALILI, 2011; GIADA, 2013).

Estão associados diretamente na sobrevivência da planta, atuando, de forma resumida, na formação, manutenção e reprodução vegetal e são obtido diretamente da fotossíntese, usando as mesmas, ou quase as mesmas, vias bioquímicas (BRISKIN, 2000; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; HOUNSOME et al., 2008; RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; OLIVEIRA et al*.,* 2011; BRANDÃO et al*.,* 2010; AHARONI; GALILI, 2011; GIADA, 2013).

Em geral, os produtos vegetais comerciais provenientes das moléculas deste metabolismo são aqueles obtidos em alta quantidade e, assim, de baixo valor comercial. Eles são usados como matérias-primas industriais, alimentícia ou como aditivos alimentares, tendo como exemplo os óleos vegetais, carboidratos (sacarose, amido, pectina e celulose) e proteínas (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009).

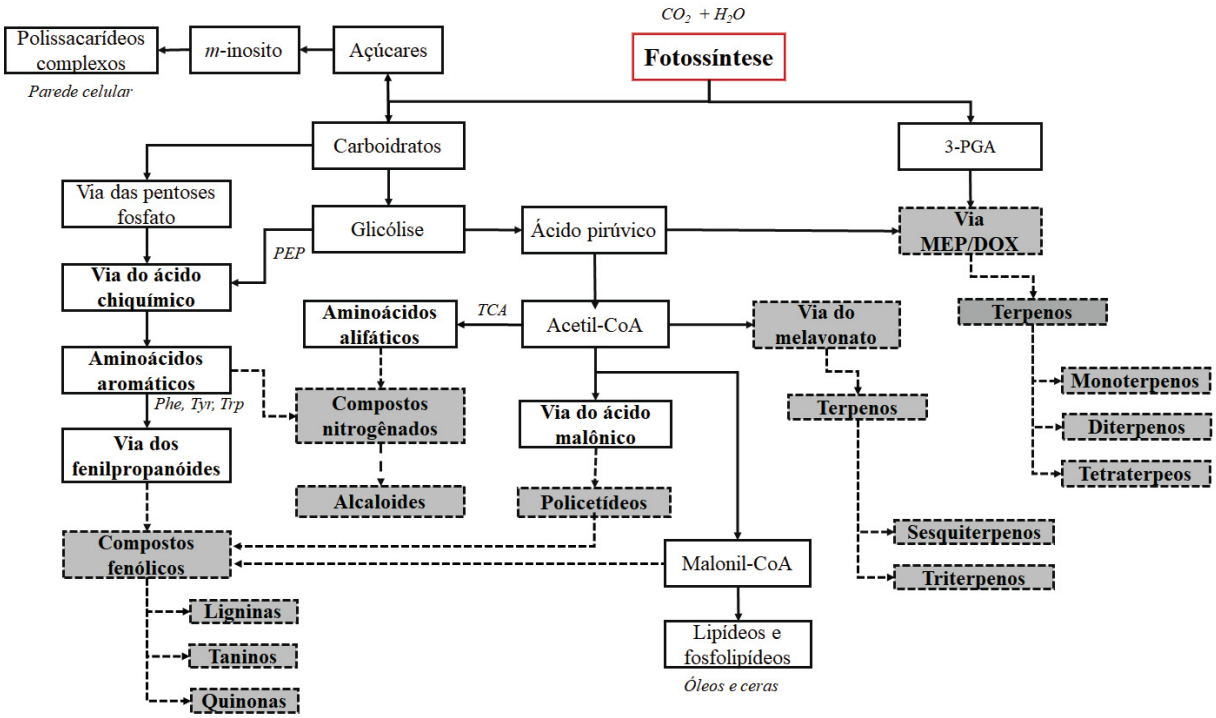
2.2.2 Metabólitos secundários

Diferente do primário, as moléculas do metabolismo secundário evoluíram em resposta às necessidades e desafios ambientais, para elevar a aptidão das plantas para completarem o seu ciclo de vida (BALANDRIN et al*.,* 1985; HOUNSOME et al., 2008; RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; BRANDÃO et al., 2010; GIADA, 2013).

Estes metabólitos, também chamados de especiais ou especializados, não possuem distribuição universal no reino vegetal, são produzidos em baixas concentrações e alguns, ainda podem estar restritos a grupos taxonômicos específicos (BALANDRIN et al., 1985; HOUNSOME et al., 2008; BRANDÃO, et al, 2010; AHARONI; GALILI, 2011; GIADA, 2013). Atuam na proteção contra: infecções microbianas (vírus, fungos e bactérias), ataques de herbívoros (lesmas, caramujos, artrópodes e vertebrados) e radiação ultravioleta (UV); na atração de polinizadores e frugívoros, bem como, substâncias alelopáticas e adequadores químicos no estresse biológico (BEUTLER, 2009; BRANDÃO, et al., 2010; AHARONI; GALILI, 2011; WINK, 2012).

São produzidos a partir de moléculas presentes nas rotas biossintéticas primárias, possuem baixo peso molecular e apresentam uma vasta e complexa variedade estrutural (HOUNSOME et al., 2008; BERNHOFT, 2010). A Figura 1 demonstra, de forma simplificada, as principais rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.

FIGURA 1 - MODELO ESQUEMÁTICO DAS PRINCIPAIS ROTAS BIOSSINTÉTICAS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS



FONTE: Adaptado de RAMAWAT; DASS; MATHUR (2009); GHASEMZADEH; JAAFAR (2011); TAIZ et al. (2015).

NOTA: Retângulos brancos: rotas biossintéticas do metabolismo primário; Retângulos cinzas: rotas biossintéticas de metabólitos secundários; MEP - Via metileritritol; DOX - Deoxi-D-Xilulose; Phe - Fenilalanina; Tyr - Tirosina; Trp - Triptofano; E4P - Eritrose-4-fosfato; PEP - Fosfoenolpiruvato; TCA - Ciclo dos ácidos cítricos; 3-PGA - 3-Fosfoglicerato.

A classificação destes compostos é variada, porém, é comum encontrar a divisão de acordo com as origens biossintéticas. Neste tipo de classificação, os metabólitos secundários, são separados em três grandes e distintos grupos químicos: *terpenos*, *compostos fenólicos* e *compostos contendo nitrogênio* (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; BERNHOFT, 2010; ATANASOV et al., 2015; TAIZ et al., 2015)

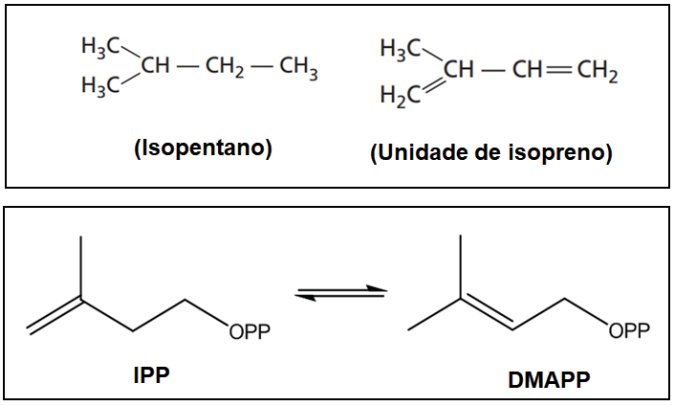
2.2.2.1 Terpenos e compostos nitrogenados

Os terpenos, também chamados de terpenoides ou óleos essenciais, compreendem o grupo mais variado de metabólitos secundários e, cerca de 30.000 terpenos já foram identificados (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; ANULIKA et al., 2016). Possuem um esqueleto hidrocarbônico que, por sua vez, torna a grande maioria dos terpenos hidrofóbicos e voláteis. A unidade de construção biológica desta classe, que corresponde ao pirofosfato de isopentenila (IPP) ou o seu isômero isopentenila dimetilalila (DMAPP), pode ser sintetizada a partir da união de três moléculas de Acetil-CoA, através da via citoplasmática do ácido mevalônico (6 C), ou a partir do rearranjo e redução, no cloroplasto, da 1-desoxiglucose 4-fosfato (intermediário glicolítico ou do ciclo de redução de carbono fotossintético), pela via MEP (metileritriol-4-fosfato) ou via DOX (1-desoxi-D-Xilulose), como observado na FIGURA 1 (HOUNSOME et al., 2008; RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; TAIZ et al*.,* 2015; ANULIKA et al., 2016).

Todos os terpenos são derivados da união repetitiva de grupamentos de cinco carbono, com forma teórica estrutural do isopentano, chamadas de unidades C5 ou unidades isoprênicas/isopreno (Figura 2). A classificação destes compostos se dá pelo quantidade de unidades C5 presentes na molécula: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos ($[C5]_n$, $n>8$) (GERSHENZON, 2002; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; TAIZ et al*.,* 2015).

Estas moléculas possuem ampla distribuição nos vegetais, sendo encontrada nas sementes, flores, folhas e raízes. Sua função é variada: alguns terpenos são precursores de vitaminas (A, K e), outros atuam, por exemplo, como hormônios, fatores de crescimento, inseticidas, aromaticidas, atratores de polinizadores e dispersores e inibidores de plantas (GERSHENZON, 2002; RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; BERNHOFT, 2010).

FIGURA 2 - MODELO ESQUEMÁTICO DAS UNIDADES FUNDAMENTAIS C5 DOS TERPENOS



FONTE: Adaptado de TAIZ et al. (2015).

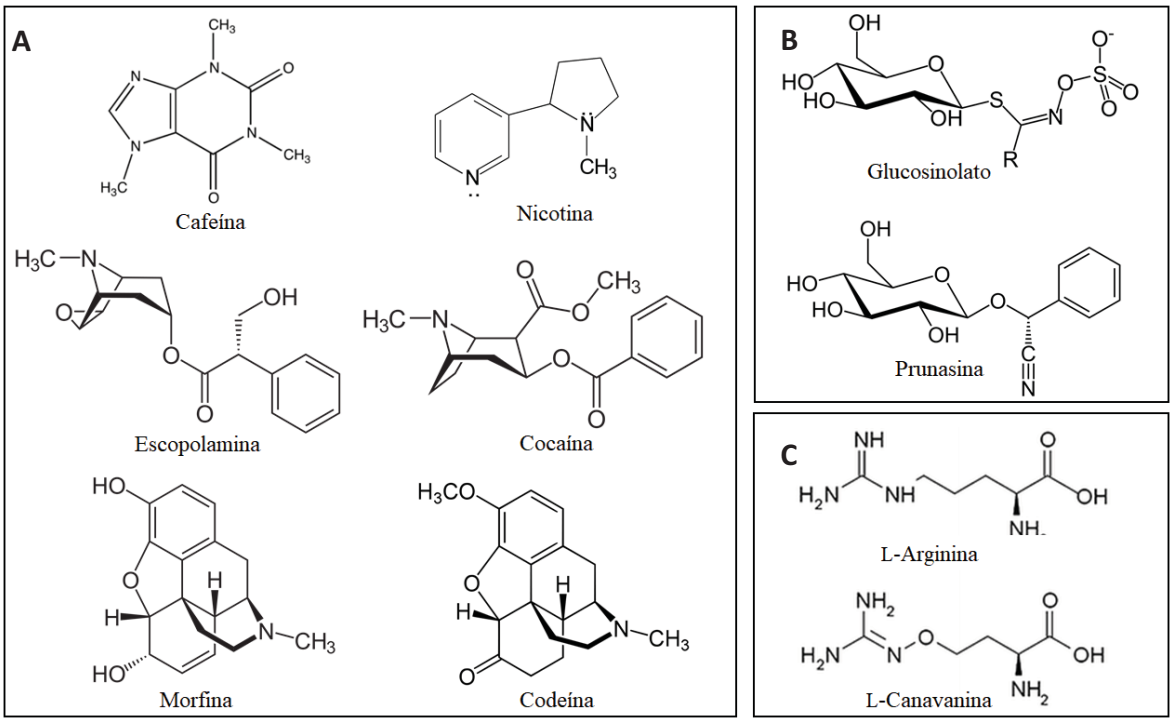
NOTA: Apesar da unidade básica ser chamada de isopreno, esta molécula não é a precursora biológica dos terpenos. IPP - pirofosfato de isopentenila; DMAPP - isopentenila dimetilalila.

Uma grande variedade de substâncias vegetais possui o nitrogênio como parte de sua estrutura. Os compostos naturais contendo nitrogênio, ou compostos nitrogenados, correspondem ao segundo grande grupo de metabólitos secundários (ZENK; JUENGER, 2007; TAIZ et al., 2015). A biossíntese destas moléculas é dada pela via do ácido chiquímico, também chamado de chiquimato (Figura 1). Esta rota, que é ausente nos animais, compreende várias etapas metabólicas iniciadas pelo acoplamento do fosfoenolpiruvato na eritrose-4-fosfato para gerar o corismato, que consiste do percursor para a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) (VARED; GAD, 2010; KOUGAN et al., 2013; TAIZ et al., 2015). Estes aminoácidos, além de essenciais para a síntese de proteínas, servem como base para a síntese de uma vasta gama de metabólitos secundários importantes para o crescimento e defesa contra predadores (VARED; GAD, 2010; TAIZ et al., 2015). São divididos em três distintas classes químicas: *alcaloides*, *glicosídeos cianogênicos* e *glucosinolatos* e *aminoácidos incomuns*:

- Os *alcaloides* correspondem a maior classe de moléculas presentes no grupo de compostos nitrogenados. São encontrados em 20% das espécies vegetais e cerca de 15.000 moléculas já foram identificadas (WANSI et al., 2013; RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009). Estes compostos possuem, geralmente em comum, um átomo de nitrogênio como integrante de um anel heterocíclico carbônico proveniente, na maioria das vezes, da via da síntese dos terpenos. Desempenham papéis significativos na planta, principalmente em relação a defesa contra herbívoros (HARTMANN, 2004) e corresponde a classe de moléculas mais utilizada pelo homem. A morfina, a codeína e

a escopolamina, por exemplo, são empregadas de forma farmacológica em baixas dosagens, enquanto a nicotina, cafeína e cocaína são utilizadas como estimulantes e sedativos. Suas estruturas estão esquematizadas na Figura 3A (ZENK; JUENGER, 2007; TAIZ et al., 2015).

FIGURA 3 - ESTRUTURAS MOLECULARES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NITROGENADOS



FONTE: Adaptado de THEODORIDIS et al., (2003); BIERI et al. (2006); FREDHOLM, (2011); MOGHBEL, N.; RYU, B.; STEADMAN, (2015); TAIZ et al. (2015); YAZICI, L.; YILMAZ, (2017).

NOTA: A - Alcaloides: a cafeína pode ser encontrando em mais de 100 espécies vegetais; a nicotina é produzida em altas concentrações em espécies do gênero *Nicotiana*; a escopolamina é um alcaloide presente em grandes quantidades em espécies da família Solanaceae; enquanto a cocaína está presente nas folhas de espécies do gênero *Erythroxylum*; a codeía e a morfina são alcaloides originados do ópio de *Papaver somniferum*; B - Estrutura geral dos glucosinolatos e do glicosídeo cianogênico prunasina ; C - Aminoácidos incomuns: a L- canavanina possui estrutura análoga ao do aminoácido essencial L-arginina.

- Além dos alcaloides, existem outras moléculas contendo nitrogênio que atuam na proteção vegetal, como por exemplo os *glicosídeos cianogênicos* e *glucosinolatos*, ilustrados na Figura 3B. Na sua forma nativa na planta, estas substâncias não possuem caráter tóxico, porém, podem ser facilmente degradadas liberando substâncias extremamente voláteis e nocivas. No caso dos glicosídeos cianogênicos, o gás cianeto (HCN) é liberado quando a planta sofre alguma injúria (ZENK; JUENGER, 2007; TAIZ et al., 2015). As folhas e raízes da mandioca (*Manihot esculenta*), do sorgo (*Sorghum bicolor*) e as semente dos frutos de espécies da família Rosaceae (maçã, pera, pêssego, cereja, ameixa e damasco, por exemplo), são exemplos de estruturas vegetais

cianogênicas (MIDIO; MARTINS, 2000; HAQUE; BRADBURY, 2002; TAIZ et al., 2015). Os glucosinolatos são encontrados principalmente na família *Brassicaceae* (repolho, brócolis e rabanetes). Quando hidrolisados, a porção aglicona da molécula perde o sulfato e sofre um rearranjo químico, tornando essa molécula pungente e reativa. Estres produtos defensivos atuam como toxinas e repelentes de herbívoros (TAIZ et al., 2015).

- As plantas possuem a capacidade de sintetizar *aminoácidos incomuns*. Estas moléculas são diferentes dos 20 aminoácidos essenciais, porém, possuem estruturas análogas e não são incorporados nas proteínas vegetais, permanecendo na forma livre (Figura 3C). O feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), uma leguminosa tropical, possui altas concentrações de um tipo de aminoácido incomum, chamado canavanina, em suas sementes. Este aminoácido de estrutura análoga a arginina, atua através da incorporação, de forma errônea, nas proteínas dos predadores, tornando-as não-funcionais, e contribuindo para a defesa vegetal (TAIZ et al*.,* 2015).

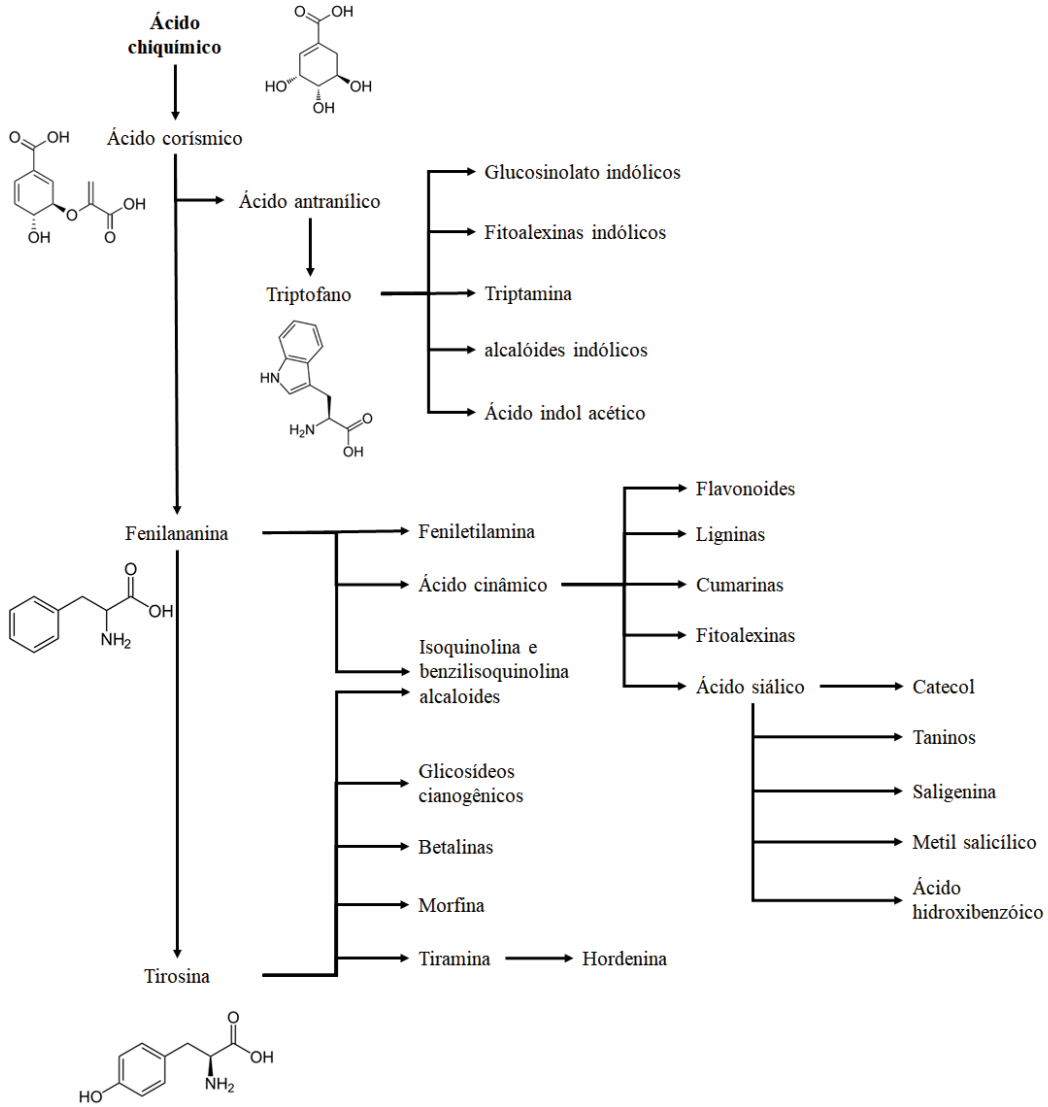
2.2.2.2 Compostos fenólicos

O terceiro grande grupo de metabólitos secundários, é aquele referente as moléculas que possuem em comum a presença de pelo menos um anel aromático contendo uma hidroxila funcional (grupamento fenol). Os compostos fenólicos, são substâncias extremamente heterogêneas, amplamente distribuídas nos grupos vegetais e, atualmente, já foram identificadas e caracterizadas cerca de 10.000 moléculas. Sua variedade é gerada devido a sua síntese poder ocorrer em diferentes rotas metabólicas e incluem características como a solubilidade, alguns são solúveis em solventes orgânicos, enquanto os ácidos carboxílicos são solúveis em água. Outras moléculas apresentam-se na forma de polímeros grandes e insolúveis, já outras são encontrados livre nos tecidos vegetais. Entretanto, os fenólicos isolados tendem a ter caráter tóxico e, desta forma, geralmente encontram-se associados com um ou mais resíduos de açúcares, proteínas, lipídeos e outros fenólicos (BRAVO, 1998; GIADA, 2013). Os açúcares são as moléculas mais comumente associadas aos fenólicos, principalmente, na forma de glicosídeos, no entanto, em menor escala, também podem estar ligados diretamente a um dos carbonos constituintes do anel aromático (BRAVO, 1998; GIADA, 2013; TAIZ et al*.,* 2015). A glucose é o monossacarídeo mais usual, porém, também podem ser encontrados compostos fenólicos associados a galactose, ramnose, xilose, arabinose e a ácidos urônicos (glucurônico e

galacturônico), na forma de monossacarídeos, dissacarídeos e até como oligossacarídeos. (BRAVO, 1998).

Duas vias de síntese já foram bem estudadas. A primeira, via do ácido chiquímico (Figura 1 e 4), é responsável pela síntese da maioria dos ácidos fenólicos vegetais, também chamados de fenilpropanoides. Nesta rota (Figura 4), o intermediário ácido chiquímico, que é sintetizado a partir dos precursores carboidratos simples derivados da glicólise e da via das pentoses fosfato, é convertido nos três aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr e Trp), que por sua vez, podem ser convertidos em compostos fenólicos (BRAVO, 1998; GIADA, 2013; TAIZ et al., 2015). A segunda via, é de grande importância para a síntese de fenóis simples em bactérias e fungos, e corresponde a via do acetato-malonato ou via do ácido malônico (Figura 1), porém, ela é pouco utilizada pelas plantas superiores (BRAVO, 1998; GIADA, 2013; TAIZ et al., 2015).

FIGURA 4 - MODELO ESQUEMÁTICO DA ROTA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO



FONTE: Adaptado de RAMAWAT; DASS; MATHUR (2009); TAIZ et al. (2015).

a) Principais classes de compostos fenólicos

Por se tratar de um grupo estruturalmente muito diversificado, onde as moléculas podem variar de homogêneas a heterogêneas com estruturas simples ou altamente polimerizadas, a sua classificação fica a critério do autor. Em geral, eles são classificados quanto a sua distribuição natural ou quanto a sua cadeia carbônica (BRAVO, 1998; GIADA, 2013).

Em relação a distribuição, estes podem ser divido em três classes:

- *Pouco distribuídos* entre as plantas: Neste grupo encontra-se fenóis simples como o pirocatecol, hidroquinona e resorcinol, e aldeídos derivados do ácido benzoico, como aqueles presentes em óleos essenciais, como a vanilina.
- *Amplamente distribuído* entre as plantas: Neste grupo enquadram-se os flavonoides e seus derivados, as cumarinas e ácidos fenólicos, como o ácido benzoico, cinâmico e seus derivados.
- *Distribuídos na forma de polímeros*: Como os taninos (condensados e hidrolisáveis e as ligninas (GIADA, 2013).

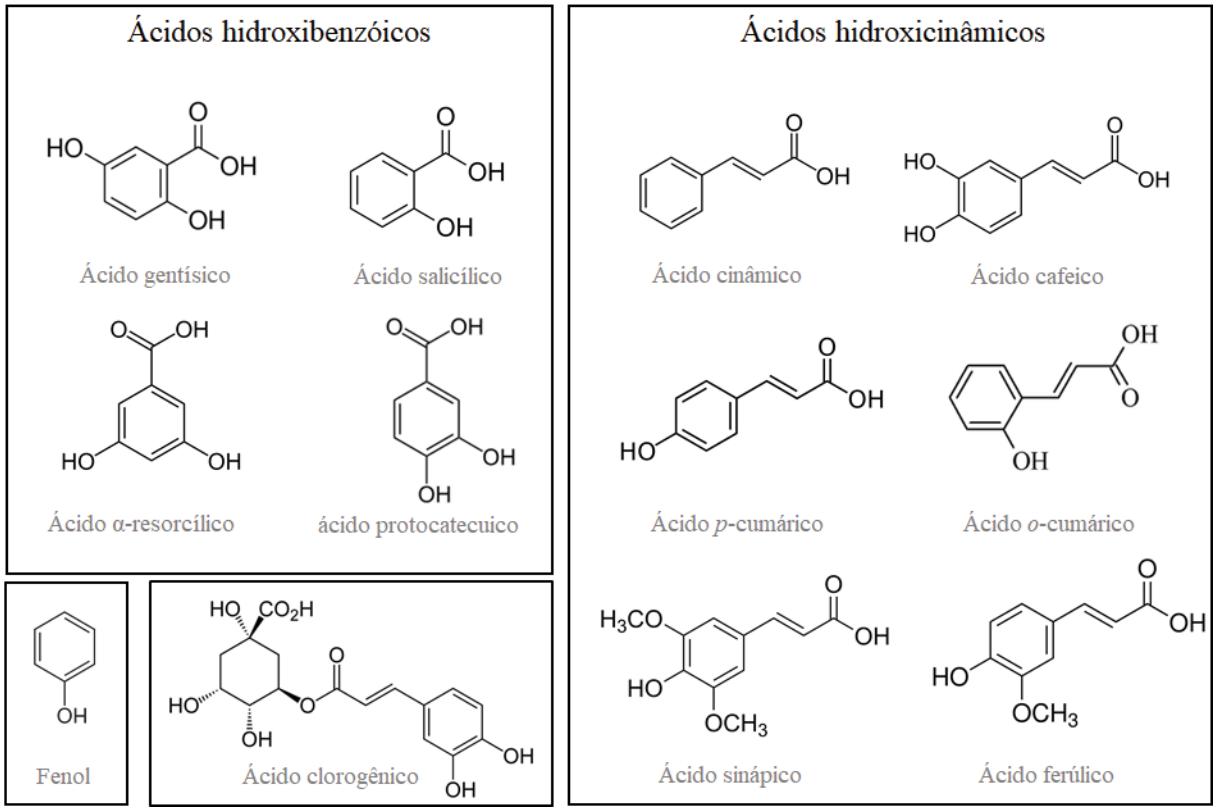
De acordo com a cadeia carbônica, os compostos fenólicos podem ser divididos em até 16 subclasses , que podem ser agrupadas em 5 classes principais (GIADA, 2013):

Os *fenilpropanoides simples (1)*, possuem em sua estrutura um anel benzênico ligado a uma cadeia lateral simples. Em grande parte, são ácidos fenólicos, que podem ser agrupados em: derivados do ácido benzoico e derivados do ácido cinâmico. Os ácidos benzoicos possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e correspondem aos compostos fenólicos vegetais mais simples (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009; GIADA, 2013). Estas moléculas podem conjugar-se com alguns intermediários da via do ácido chiquímico, como o próprio ácido quínico, para formar outros compostos, como o ácido clorogênico (RAMAWAT; DASS; MATHUR, 2009), como visto na Figura 5.

Os ácidos cinâmicos (ou hidroxicinâmicos), por sua vez, se apresentam com sete ou nove átomos de carbono (C6-C1 e C6-C3). Essa estrutura corresponde a um anel benzênico ligado a um ou mais grupamentos hidroxilas e/ou metoxilas (GIADA, 2013). Os mais abundantes, nos vegetais, são aqueles derivados da Phe (Figura 4), por meio da eliminação da molécula de amônia, formando o ácido cinâmico, pela enzima fenilalanina amônia-liase. Esta enzima, corresponde um dos pontos de ramificação entre o metabolismo primário e secundário vegetal.

As reações subsequentes a essa enzima, correspondem a adições de outros grupamentos hidroxila e outros substituintes, como ilustrado na Figura 5 (TAIZ et al., 2015).

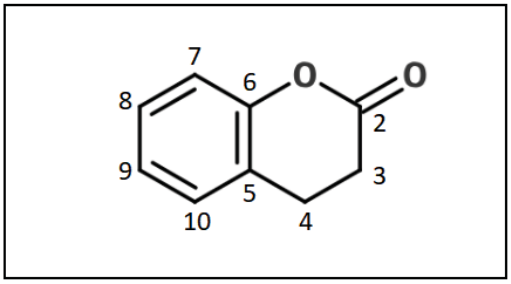
FIGURA 5 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS PRINCIPAIS FENILPROPANOIDES



FONTE: ČORIĆ et al. (2009); ALMEIDA et al. (2010); VINHOLES; SILVA; SILVA, 2015.

As *cumarinas (2)*, ilustrada na Figura 6, são derivadas do ácido cinâmico, via orto-hidroxilação, isomerização trans-cis da ligação dupla da cadeia lateral e lactonização.

FIGURA 6 - ESTRUTURA BÁSICA DAS CUMARINAS



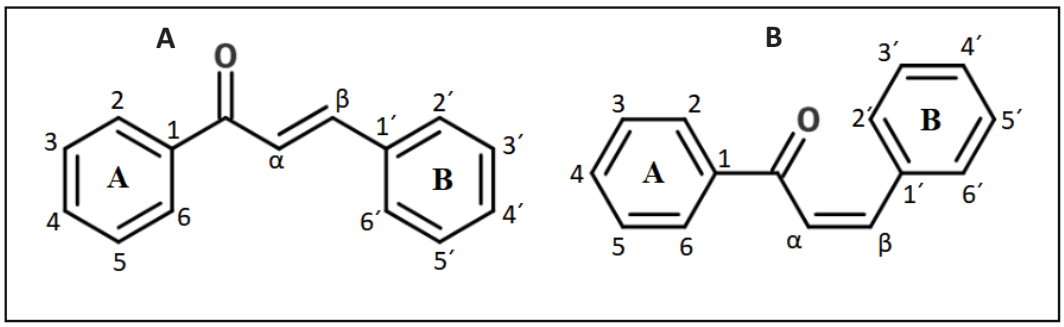
FONTE: Adaptado de KUŞ et al. (2007).

Compreendem uma grande classe de compostos fenólicos, a qual já foram identificadas mais de 1300 moléculas, especialmente nas flores e plantas verdes (HOULT; PAYÁ, 1996;

KUSTER; ROCHA, 2003; GIADA, 2013; MATOS et al., 2015). Entretendo, também são encontradas em alto níveis em alguns óleos essenciais, como aquele presente na casca da canela, nas folhas da cássia e da lavanda (JAIN; JOSH, 2012), em algumas frutas, como o mirtilo e a amora silvestre e, até, no chá verde. São moléculas insolúveis em água, porém, uma substituição 4-hidroxi confere propriedades levemente ácidas e solúveis em água ligeiramente alcalina (JAIN; JOSH, 2012; GIADA, 2013; MATOS et al*.,* 2015). Seu representante mais simples é a cumarina 1,2-benzopirona (KUSTER; ROCHA, 2003; RADÜNZ et al*.,* 2012), entretanto, é normal encontrara-las na natureza em combinação com açúcares. Estas moléculas, que estão associadas a mecanismos de defesa contra herbívoros e ataques por microrganismos, ainda podem ser categorizada em: *simples* como os derivados hidroxilados, alcoxilados e alquilados da cumarina e seus glicosídeos; *furanocumarinas* (lineares e angulares): que compreendem moléculas compostas por uma anel furano ligado ao núcleo cumarínico com substituições; *piranocumarinas*, moléculas análogas as furanocumarinas, porém, possuem um anel contendo seis elementos; e as *cumarinas substituídas* no anel de lactona, maioritariamente nas posições C-3 ou C-4. (LACY; O´KENNEDY, 2004; MATOS et al., 2015).

As *chalconas (3)* correspondem a uma estrutura química que serve como base para diversos outros metabólitos secundários vegetais (DAO; LINTHORST; VEPOORTE, 2011; GOMES et al*.,* 2017; ZHUANG et al., 2017) O esqueleto principal das chalconas, chamado de chalconoide, corresponde ao 1,3-diaril-2-propeno-1-ona, que pode existir na isoforma *cis* (Z) ou *trans* (E), como visto na Figura 7. Entretanto, a isoforma *trans* é mais estável do ponto de vista termodinâmico, o que torna essa configuração predominante entre as chalconas. A configuração *cis* apresenta caráter instável devido aos efeitos estéricos entre o grupo carbonila e o anel A (GOMES et al., 2017; ZHUANG et al., 2017).

FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS ISÔMEROS DOS NÚCLEOS CHALCONOIDES



FONTE: Adaptado de GOMES et al. (2017).

NOTA: As chalconas são compostas por dois anéis aromáticos, designados A e B, unidos por um sistema carbonílico α, β-insaturado de três carbonos, que podem existem na forma de isômeros *trans* (A) ou *cis* (B).

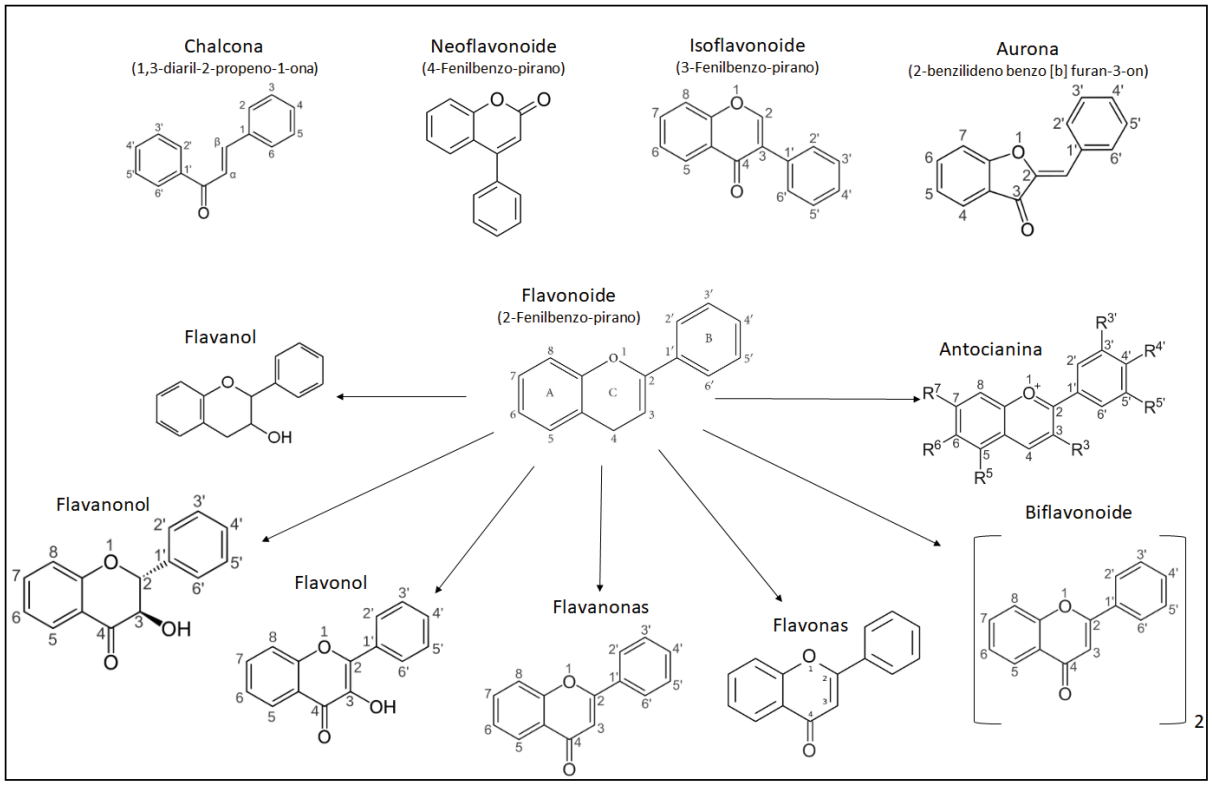
De forma resumida, as chalconas são moléculas de cadeia aberta, que possuem dois anéis aromáticos ligados por um fragmento enona (cetona α, β-insaturada) de três carbonos, ou seja, consiste de um anel aromático ligado diretamente à carbonila α, formando o Anel A e o outro anel ligado ao carbono β, da função olefínica, gerando o anel B (Figura 7). Esta estrutura é sintetizada através de intermediários da via do fenilpropanoide (ácido chiquímico) e do policetídeo (via do ácido malônico). A Phe obtida (via do ácido chiquímico), sofre diversas reações até chegar ao *p*-cumário na forma de CoA, que por sua vez reage com três moléculas de malonil-CoA, oriundas da via do ácido malônico, através da enzima chalcona sintase, formando a naringenina chalcona (SAKUTA, 2000; POURCEL et al., 2006). As chalconas podem ser classificadas, de modo superficial, em duas categorias: chalconas simples/clássicas e chalconas híbridas, sendo estas últimas, com estrutura central de 1,3-diaril-propen-1-ona. Elas existem naturalmente como pigmentos amarelos, como o xantoangelol na espécie *Angelica keiskei*, no cerne, folhas, frutos e raízes, além, de também serem geradas em respostas a estresses ocasionados por ataques de organismos e insetos, radiação UV, temperatura e umidade (SAKUTA, 2000; NI; MENG; SIKORSKI, 2004; DAO; LINTHORST; VEPOORTE, 2011).

Os pigmentos presentes nas flores, frutas e sementes pertencem a um dos maiores grupos de compostos fenólicos vegetais, chamado de *flavonoides (4)* (FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; PETRUSSA et al*.,* 2013). Mais de 8000 flavonoides já foram identificados e a tendência é que este número logo aumente (PIETTA, 2000; BUER; IMIN; DJORDJEVIC, 2010; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012). São moléculas de baixa massa molecular sintetizadas a partir das chalconas, geradas nas vias do ácido chiquímico e dos fenilpropanoides (DAO; LINTHORST; VEPOORTE, 2011; SAMANTA; DAS; DAS, 2011; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012). Sua estrutura básica consiste de um núcleo flavano, contendo 15 átomos de carbono, arranjados na forma de três anéis (C6-C3-C6), sendo um benzeno (Anel A), um fenil (anel B) e um α-pirona ou sua dihidroderivada, acoplada ao anel A (Anel C) (PIETTA, 2000; DORNAS et al., 2007), como ilustrado na Figura 8.

Os flavonoides ocorrem desde organismos primitivos, como musgos e pteridófitas, até plantas terrestres superiores (TAKAHASHI; OHNISHI, 2004). Estima-se que 2% de todo o carbono fotossintetizado por estes organismos, seja convertido em flavonoides (VIJAYAKUMAR; PRESANNAKUMAR; VIJAYALAKSHMI, 2008). Estas moléculas podem existir na forma de agliconas, glicosídeos e metilados (NARAYANA et al., 2001; KUMAR; PANDEY, 2013). Os flavonoides agliconas consistem somente do anel benzênico (A) condensado ao anel de seis membros (C), contendo, na posição C-2, um anel fenílico (B) como substituinte (NARAYANA et al., 2001). Quando glicosilados, a ligação glicosídica é

normalmente localizada nas posições 3 ou 7 e a porção glicídica consiste, geralmente, de L-ramnose, D-glicose, glucoramnose, galactose ou arabinose (NARAYANA et al., 2001).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTIDA DO ESQUELETO MOLECULAR CENTRAL DAS DIFERENTES CLASSES DE FLAVONOIDES

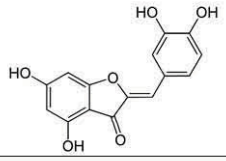
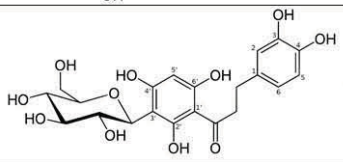
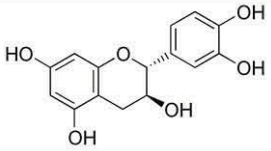
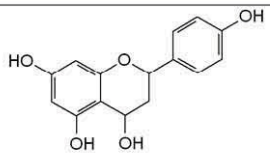
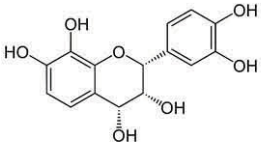
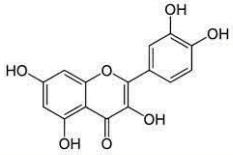
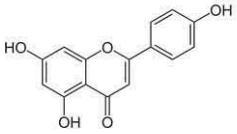
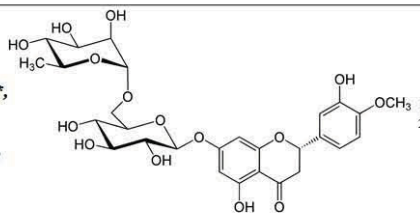
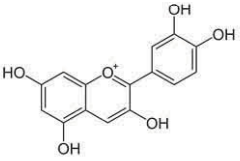


Fonte: Adaptado de PANCHE; DIWAN; CHANDRA (2016); OLIVEIRA-JÚNIOR et al. (2017).

Nota: O núcleo flavano dos compostos fenólicos (2-fenilbenzo-pirano), pode dar origens a diversas classes de flavonoides.

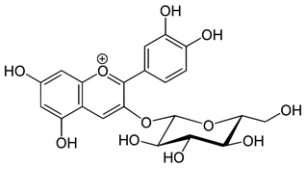
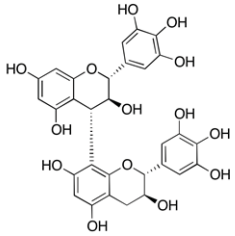
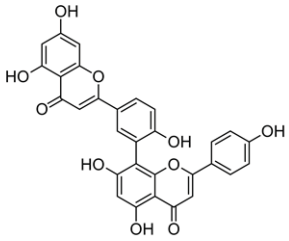
As várias classes de flavonoides, diferem entre si, pelo carbono do anel C, a qual o anel B está ligado e pela insaturação e oxidação do anel C. Na mesma classe, as moléculas ainda se diferenciam pelo padrão de substituições nos anéis A e B (PIETTA, 2000; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008; PANCHE, DIWAN; CHANDRA, 2016). Elas podem ser separadas em três grandes subclasses (neoflavonoides, isoflavonoides e flavonoides), de acordo com a posição da ligação do anel B, como visto na Figura 8 e Tabela 1, e de 6 a 13 subclasses diferentes, dependendo do autor, que incluem as chalconas, dihidrochalconas, flavan-3-ol (flavanois), flavan-4-ol, flavan-3,4-diois (leucoanticianidinas), flavonois, flavonas, flavanonas, antocianidinas, antocianinas, polímeros protoantocianidinas (taninos condensados) e os dímeros biflavonoides, como visto na Tabela 1 (BRAVO, 1998; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; GIADA, 2013).

TABELA 1 - PRINCIPAIS CLASSES E SUBCLASSES DE FLAVONOIDES

Nome da classe	Características estruturais	Exemplos	Estrutura molecular	Referência
⁂Auronas (*Z* - 2-benzilideno-1-benzofurano-3-ona)	Moléculas que contendo um benzofurano ligado pelo C-2 do benzilideno	***Aureusidina****, *Sulferetina e maritimetina*		KRISHNA, 2007; DETSI et al., 2009
⁂Dihidrochalconas	Moléculas que que possuem três carbonos de cadeia saturada aberta, interligando os A e B. Ocorrem na forma de glicosídeos	***Aspalatina****, *ploridzina*		NAKAMURA et al., 2003
Flavanóis (Flavan-3-ol)	Moléculas contendo grupamento hidroxil na posição C-3 do anel C do núcleo flavano. Também servem de monômeros para as protoancianidinas	***Catequina****, *epicatequina, galactocatequina*		FERREIRA; SLADE, 2002 VELAYUTHAM, BABU, LIU, 2008; KHAN; HUMA; DANGLES, 2014
⁂ Flavan-4-ol	Molécula contendo grupamento hidroxil na posição C-4 do anel C do núcleo flavano	***Apiforol****, *luteoforol*		KUHNAU, 1976; SOUZA et al., 2008
Leucoantocianidinas (Flavan-3,4-diois ou flavandiol)	Moléculas contendo grupamentos hidroxila nas posições C-3 e C-4, do anel C do núcleo de flavano. Também servem de monômeros para as protoancianidinas	***Melacacidina****e *teracacidina*		DREWES; ROUX, 1966; FERREIRA; SLADE, 2002; RATNAVATHI; PATIL; CHAVAN, 2016
Flavonóis	Moléculas contendo um grupamento carbonila em C-4, hidroxila em C-3 e dupla ligação entre C-2 e C-3, do anel C do núcleo flavano.	***Quercetina****, *Kaempferol, Quercitagetina, miricetina*		D'ARCHIVIO *et al.*, 2007 KUMAR; PANDEY, 2013
Flavonas	Moléculas contendo grupamento carbonila em C-4 (cetona) e dupla ligação entre C-2 e C-3, do anel C do núcleo flavano.	*Rutina,* ***Apigerina****e *luteoleína*		D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; TODOROVA *et al.*, 2013; PANCHE; DIWAN. CHANDRA, 2016
Flavanonas	Moléculas contendo cadeia saturada e uma carbonila em C-4, no anel C do núcleo flavano. *Existem na forma aglicona e glicosilidada na posição C-7.	***Hesperidina****, *narirutina, eriocitrina, naringenina*		D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; KHAN; HUMA; DANGLES, 2014
Antocianidinas	Moléculas que possuem o núcleo básico flavílio: Dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos condensados por um oxigênio *Forma aglicoa	***Cianidina****, *petunidina, malvidina, pelargonidina, Peonidina, delfinidina*		KHOO *et al.*, 2017

(Continua)

NOTA: Nome em negrito e sublinho correspondem às moléculas exemplificadas

Antocianinas (Íon flavilio)	Correspondem as antocianidinas glicosiladas nas posições C-3 e/ou C-5 e/ou C-7. Também podem estar estar aciladas com os ácidos cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e málicos.	*Peonidinao-3-glusídeo, elargonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, delfinidina-3-glicosídeo e* ***cianidina 3-glicosídeo****		KUSKOSKI et al., 2004; KHOO et al., 2017
Proantocianidinas	Polímeros de flavan-3,4-diol, de flaval-4-ol ou de flavan-3-ol, sendo o último mais comum. Ligação tipo A: Dupla, C-4→C-6 e O7 →C2 Ligação tipo B: Simples, C-4→C-6 ou C-4→C-8	***Prodelfinidina B3****, *propelargonidina tipo A, Procianidina B5 Procianidina triméria tipo A*		FERREIRA; SLADE, 2002; HOWELL et al., 2005; YOKOTA et al., 2013; OU; GU, 2014
Biflavonoides	Duas moléculas de flavonoides, ligados um ao outro através de ligações covalantes C-C ou C-O-C - flavona-flavona, flavanona-flavona e flavanona-flavanona	*Sulcatona-A, ginkgetina e* ***Amentoflavona****		LIN et al., 2001; KANG et al., 2005

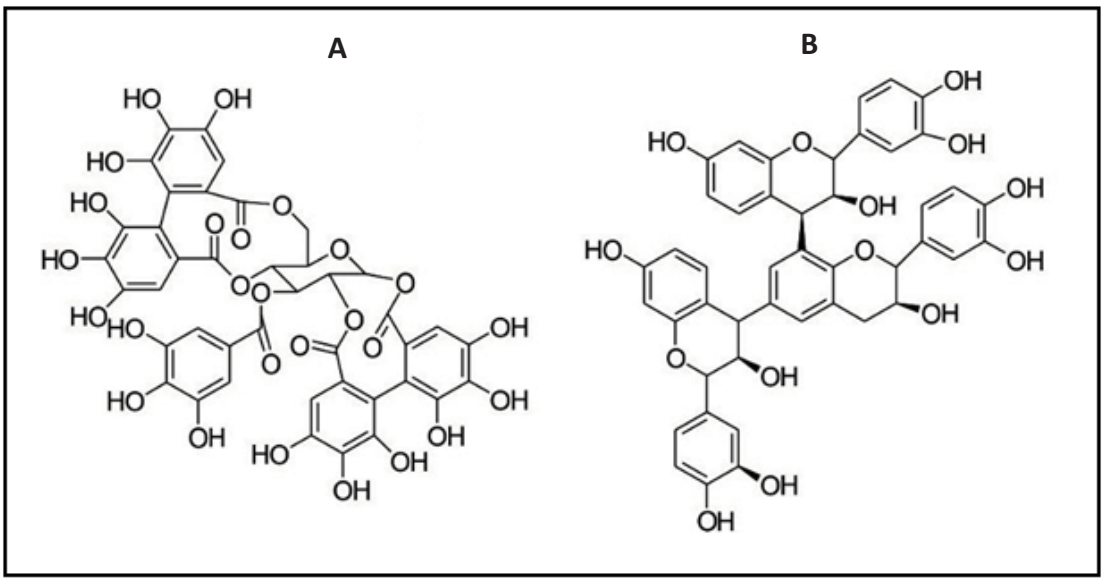
NOTA: Nome em negrito e sublinho correspondem às moléculas exemplificadas

Os flavonoides atuam na proteção contra estresses bióticos e abióticos e na interação do vegetal com o seu ambiente a volta (POURCEL et al., 2006; SAMANTA; DAS; DAS, 2011). São potentes pigmentos capazes de absorver da radiação UV, entre 230 e 380 nm, protegendo as células dos danos induzidos pelos raios UV (TAKAHASHI; OHNISHI, 2004), além, de serem os responsáveis pelos tons amarelo claro, marfim, rosa, magenta, vermelho, azul e violeta, das flores (BARB; WERNER; GRIESBACK, 2008).

A sua presença no vegetal, ainda atua na modulação do transporte de certos fitohormônios, como por exemplo a auxina, um hormônio relacionado ao crescimento e desenvolvimento vegetal (PEER; MURPHY, 2007). Ainda podem atuar como moléculas de sinalização (PEER; MURPHY, 2007), como fitoalexinas (FAWE et al., 1998; MCNALLY et al., 2003), como agentes desintoxicantes (YAMASAKI; SAKIHANA; IKEHARA, 1997; JANSEN et al., 2001; MICHALAK, 2006), como estimulantes da germinação de esporos de fungos, que interagem beneficamente com a planta (MORANDI; BRANZANTI; GIANINAZZI-PEARSON, 1992; BAGGA; STRANEY, 2000) e de sementes (DOUGHTY; ALJABRI; SCOTT, 2014), sobre a aclimatização de temperatura (KAPLAN et al., 2004), em resposta a estresse a seca (HERNÁNDEZ; ALEGRE; MUNNÉ-BOSCH, 2004), além de aturem como agentes aleloquímicos (MAMOLOS; KALBURTJI, 2001; DUKE, 2007).

Os *taninos hidrolisáveis (5)* são menores e menos comuns que os taninos condensados, (proantocianidinas), porém são estruturalmente diversificados e amplamente distribuídos nas plantas (HARVEY, 2001; SALMINEN; LEMPA, 2002; HELDT, 2005; TAIZ et al*.,* 2015). Eles consistem de polímeros heterogêneos (Figura 9) contendo um núcleo de glucose ou um álcool poli-hídrico parcialmente ou completamente esterificado aos ácidos fenólicos, como o ácido gálico ou ácido elágico, formando o galotaninos e elagitaninos, respectivamente (GIADA, 2013). Estas moléculas podem ser facilmente hidrolisadas por ácidos, bases e enzimas (GIADA, 2013; TAIZ et al., 2015). São biossintetizados pela via do ácido chiquímico (Figura 1) a qual está, geralmente, esterificado a uma hexose, ou outro poliol, formando o núcleo central (KOLECKAR et al*.,* 2008). Supõe-se que estejam relacionados com a interação da planta com predadores herbívoros, devido a sua capacidade de precipitar proteínas, característica esta, uma comum de todos os taninos (SALMINEN; LEMPA, 2002; MOCTEZUMA et al., 2014). Entretanto, devido a sua heterogeneidade estrutural, também estão envolvidos em outras atividades biológicas (SALMINEN; LEMPA, 2002).

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA SIMPLES DA ESTRUTURA MOLECULAR DOS TANINOS HIDROLISÁVEIS E CONDENSADOS



FONTE: RAJA et al (2014).

NOTA: Os taninos hidrolisáveis (A) são polímeros compostos por ésteres de ácido gálico ou elágico, ligados a um núcleo glicídicos, enquanto que os taninos condensados (B), ou antocianidinas, são compostos pela ligação de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol.

2.3 ESPÉCIES VEGETAIS DE INTERESSE

2.3.1 *Musa paradisiaca* L.

A *Musa paradisiaca* L. corresponde a uma espécie tropical e originária do sudoeste do pacífico. Por volta de 600 a.C. espalhou-se pela Índia e, posteriormente, entre os anos de 200 e 300 a.C. já era encontrada em todas as regiões tropicas ao redor do mundo (SAVALI; BHINGE; CHITAPURKAR, 2011; IMAM; AKTER, 2011). É cultivada principalmente na Flórida, Ilhas Canárias, Egito, Brasil e sul do Japão (SWATHI; JYOTHI; SRAVANTHI, 2011). Pertence à família Musaceae, como visto na Tabela 2, e é popularmente conhecida como bananeira.

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA *Musa paradisiaca* L.

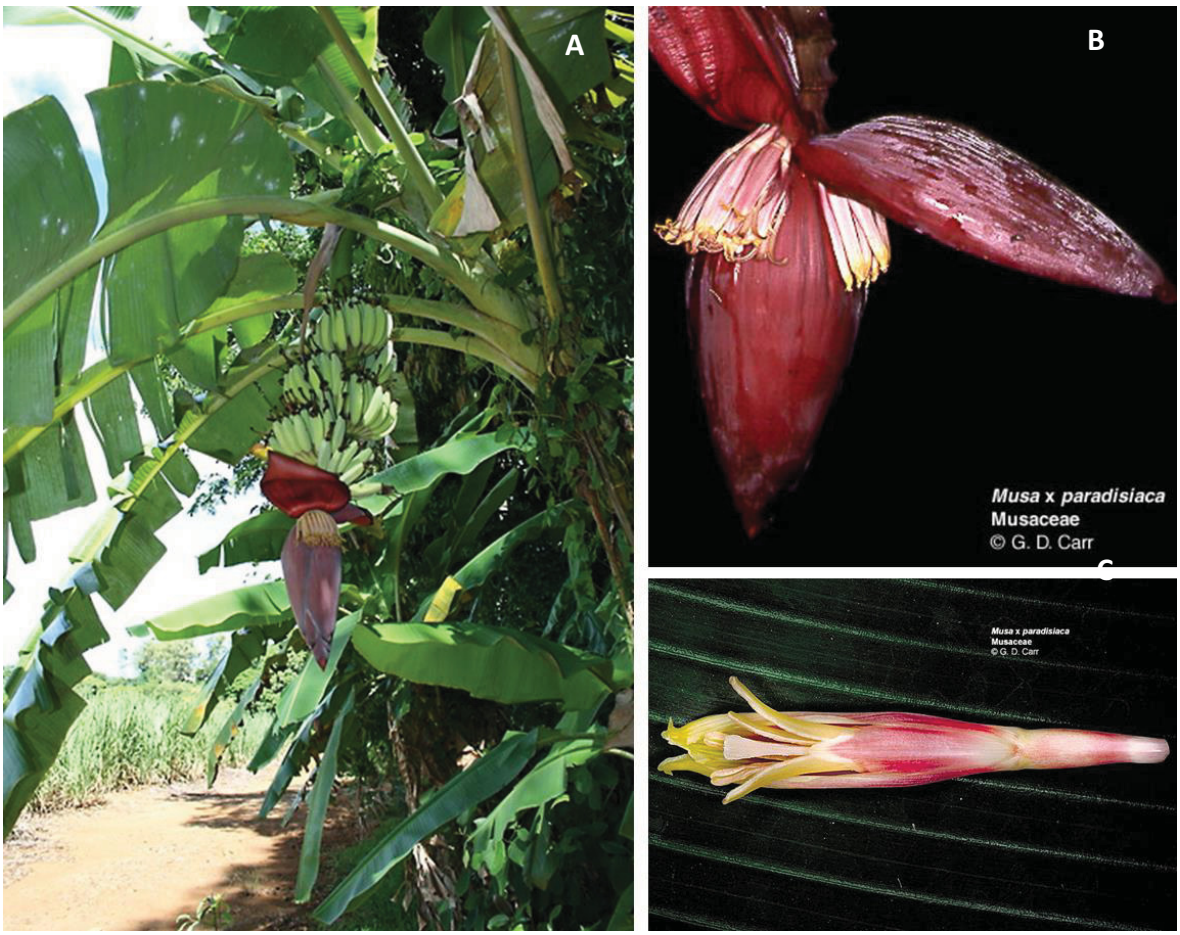
Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Liliopsida
Ordem:	Zingiberales
Família:	Musaceae
Gênero:	*Musa*
Espécie:	*Musa paradisiaca*

FONTE: IMAM; AKTER, 2011

É uma planta herbácea de até 9 metros de comprimento, com pseudocaule espesso e composto por bainhas foliares convolutas, como o observado na Figura 10 A (MALLICK et al., 2007; SWATHI; JYOTHI; SRAVANTHI, 2011; IMAM; AKTER, 2011; SHANMUGA; SUBRAMANIAN, 2012). Suas folhas são grandes, oblongas (≅ 365 x 61 cm) e verdes, contendo uma proeminente nervura central (MALLICK et al., 2007; IMAM; AKTER, 2011). Cada planta produz uma única inflorescência contendo grandes brácteas ovadas, côncavas (≅ 15-20 cm), levemente carnudas e de coloração vermelha escura a marrom escura, as quais, se abrem em sucessão, Figura 10 A e B (IMAM; AKTER, 2011; ABBAS et al., 2015; YAKUBU et al., 2015). As flores são longas e de coloração esbranquiçada a rosada (Figura 10 C), sendo as fêmeas que geram os frutos sem fertilização. São organizadas radialmente em grupos de 11 a 13 flores no talo de floração, que por sua vez é coberta por uma bráctea (ABBAS et al., 2015; YAKUBU et al., 2015). Os frutos (Figura 10 A), verdes ou verdes-amarelados, são oblongos, carnudos, com aproximadamente de 5 a 7 cm de comprimento na forma selvagem e mais longos em plantas cultivadas e, nesta espécie, não produzem sementes (IMAM; AKTER, 2011; YAKUBU et al., 2015).

A *M. paradisiaca* consiste de uma planta, amplamente utilizada na medicina tradicional. (MALLICK et al., 2007; SWATHI; JYOTHI; SRAVANTHI, 2011; IMAM; AKTER, 2011; JAWLA; JUMAR; KHAN, 2012; YAKUBU et al., 2015). Seus frutos são utilizados tradicionalmente no tratamento de diarreia, de disenteria, das lesões intestinais causadas por colite ulcerativa, diabetes, uremia, nefrite, gota, hipertensão e doenças cardíacas (LOGANAYAKI; RAJENDRAKUMARAN; MANIAN, 2010; IMAM; AKTER, 2011). As folhas tenras são utilizadas em eczemas (cinzas), queimaduras, bolhas, sarna e inflamações (OKOLI, 2007; LOGANAYAKI; RAJENDRAKUMARAN; MANIAN, 2010; IMAM; AKTER, 2011). O suco das flores é adstringente e utilizado em disenteria e menorragia, enquanto as raízes são utilizadas contra helmintos, doenças do sangue e venéreas e o suco caule é utilizado para problemas intestinais (diarreia e disenteria), cólera, otalgia e hemoptise (LOGANAYAKI; RAJENDRAKUMARAN; MANIAN, 2010; IMAM; AKTER, 2011).

FIGURA 10 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Musa paradisiaca* L.



FONTE: CARR (2004); KREJČÍK (2009).

NOTA: A - Visão geral da planta; B - Inflorescência, mostrando a folha modificada com função de proteção (brácteas) e as flores; C - Detalhe de uma flor isolada.

Devido a sua grande utilização na medicina tradicional, a planta como um todos vem sendo estudada quanto a diversas atividades biológicas, como demonstrado na Tabela 3. Já foram identificados diversos compostos fenólicos com ações biológicas, sendo as leucoantocianidinas (flavon-3.4-diol) um dos principais (LOGANAYAKI; RAJENDRAKUMARAN; MANIAN, 2010).

TABELA 3 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS APRESENTADAS PELA *Musa paradisiaca* L.

Partes da planta	Extrato/solvente	Compostos	Propriedade	Ref.
Brácteas	Metanólica ácida (HCl, 0,15%)	Antocianinas (cianidina-3-rutosídeo)	Pigmento natural	1
Pseudocaule	Suco exsudado (seiva)	Polifenois e taninos	Inibição da fosfolipase A2 *in vitro* (*Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi*)	2
Caule	Suco fresco	-	Hiperglicemiante *in vivo* (ratos wistar)	3
Cascas dos frutos	Decocção aquosa	Glicosídeos, antocianinas, taninos, flavonoides e carboidratos	Antimicrobiana *in vitro* (*Staphylococcus sp*. E *Pseudomonas sp*)	4
Flor e caule frescos	Maceração sequencial com clorofórmio, acetona e metanol (80%)	-	Antioxidante *in vitro* (FRAP, DPPH, ABTS, quelação de ferro e antihemolítica)	5
Raiz	Maceração metanólica	-	Anticocidial *in vivo* (*Eimeria tenella*, frangos de corte)	6
Folhas	Maceração metanólica (70%)	-	Anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* (*H. contortus*, ovelhas)	7
Caule	Maceração aquosa e etanólica (soxhlet)	Alcaloides, fitoesteróis, fenólicos, proteínas, aminoácidos, flavonoides, taninos e carboidratos.	Hepatoprotetor *in vivo* (Ratos wistar)	8

(Continua)

NOTA: FRAP - Ensaio antioxidante do poder redutor do ferro; ABTS **-** Ensaio antioxidante de captação do radical ABTS (*ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico*); DPPH: redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila).

Folhas frescas	Extração sucessiva com hexano, acetato de etila e metanol (55 - 80%)	-	Antimicrobiano *in vitro* (*E. coli, P. aeruginosa* e *Citrobacter* sp) e antioxidante *in vitro* (formação do complexo fosfomolibdênio)	**9**
Inflorescência	Fração acetato de etila (extração metanólica e partição com éter de petróleo e acetato de etila)	Ácido gálico, quercetina, epicatequina	Redução do estresse oxidativo, hiperglicemia e inflamação *in vivo* (Ratos wistar diabéticos)	**10**
Fruto imaturo	Maceração aquosa	Apigenina, miricetina, luteolina, capsaicina, isorhamnetina, ácido cafeico, kampferol, quercetina, ácido *p*-hidroxibenzóico, shogaol, gliciteina e gingerol	Antioxidante *in vitro* (DPPH, captação do radical hidroxila)	**11**
Caule	Seiva	Alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, compostos fenólicos e esteroides	Antidiarreica *in vivo* (ratos wistar)	**12**

FONTES: 1 - PAZMIÑO-DURAN et al. (2001); 2 - BORGES et al. (2005); 3 - SINGH et al. (2007); 4 - ALISI et al. (2008); 5 - LOGANAYAKI; RAJENDRAKUMARAN; MANIAN (2010); 6 - ANOSA; OKORO (2011); 7 - HUSSAIN et al. (2011); 8 - NIRMALA et al. (2012); 9 - KARUPPIAH; MUSTAFFA (2013); 10 - NISHA; MINI, (2013); 11 - SHODEHINDE; OBOH (2013); 12 - YAKUBU et al. (2015).

NOTA: FRAP - Ensaio antioxidante do poder redutor do ferro; ABTS **-** Ensaio antioxidante de captação do radical ABTS (ácido 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); DPPH: redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila).

Diversos estudos relacionam as atividades biológicas dos vegetais com o seu conteúdo de flavonoides. Estudos científicos, demonstram que estas moléculas possuem propriedades anti-inflamatórias, antineoplásicas, hepatoprotetoras, hipoglicêmicas, hipolipidêmicas e antioxidantes, além de reduzirem a secreção de ácido pelas células parietais (SAIJA et al*.,* 1995; VIJAYAKUMAR; PRESANNAKUMAR; VIJAYALAKSHMI, 2008).

2.3.2 *Polygonum acre* H. B. K

O gênero *Polygonum* pertence à família *Polygonaceae* (Tabela 4) e foi estabelecido em 1753 por Linnaeus. Ele contém cerca de 40 gêneros e mais de 300 espécies catalogadas, as quais, estão distribuídas, principalmente, em regiões temperadas ao redor do mundo (MELO, 1996; NARASIMHULU; REDDY; MOHAMED, 2014). São descritas as seguintes espécies

do gênero *Polygonum* na flora brasileira: *P. acuminatum* Kunth, *P. ferrugineum* Wedd, *P. hydropiperoides* Michaux, *P. meisnerianum* Cham., *P. punctatum* Elliott., *P. stelligerum* Cham. (SILVA-BRAMBILLA; MOSCHETA, 2001).

Polygonum acre H.B.K, também conhecido pelas sinonímias botânicas *Polygonum punctatum* Ell. e *Persicaria punctata* Ell. Small, corresponde a uma planta perene que alcança até 1 m de altura. Possui folhas lanceoladas com ápice atenuado (Figura 11 A), base aguda e glândulas puntiformes reluzentes em ambos os lados. Possui um fruto pequeno (≅ 1,5 a 2 mm), liso, brilhante e com perianto frutífero. Seu caule cilíndrico é avermelhado e compostos por nós e entrenós bem nítidos, contendo perigônio cobertos por glândulas escuras e visíveis a olho nu. Apresentarem a ócrea ciliada (Figura 11 B), que corresponde a uma estrutura com aspecto da bainha envolvente no caule, a qual é característico das plantas da família Polygonaceae. Suas flores são bissexuais, pentâmeras, monoclamídeas, actinomorfas com coloração que varia do branco ao rosado e suas inflorescências estão dispostas em espiga, como visto na Figura 11 C (FASSETT, 1949; ALVES et al., 2001; LIMA et al., 2010).

TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *Polygonum acre* H. B. K.

Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordem:	Caryophyllales
Família:	Polygonaceae
Gênero:	*Polygonum*
Espécie:	*Polygonum acre*

FONTE: Adaptado de WILSON, 2003; MS, 2014

É conhecida popularmente como erva-de-bicho, pimenta d´ água, capiçoba, cataia e pimenta-do-brejo (ALVES et al., 2001; LIMA et al., 2009). É nativa das Américas (Canadá até a Argentina), porém, foi acidentalmente introduzida na Nova Zelândia, Paquistão e Havaí (FASSETT, 1949; MAIZ-TOME, 2016). É encontrada principalmente em zonas baixas úmidas ou inundáveis, como margens de rios, lagos, lagoas e brejos com água corrente, como visto na Figura 11 D (CIALDELLA; BRANDBYGE, 2001; SILVA-BRAMBILLA; MOSCHETA, 2001, LOPES et al., 2003; LIMA et al., 2009).

Todas as estruturas desta espécie são utilizadas na medicina tradicional, na forma de infusos, tinturas ou banhos (LIMA et al., 2001), principalmente, como hemostático para o tratamento de problemas circulatórios, como varizes e hemorroidas, além de hemorragias tópicas e internas, como a uterina (ALVES et al., 2001; LIMA et al., 2001; SILVA-

BRAMBILLA; MOSCHETA, 2001; LIMA et al., 2009; 2010; PASTORI et al., 2015), Ainda é utilizado como antidiarreico, adstringente (JÁCOME et al., 2004), antirreumático (ALVES et al., 2001; BUDEL et al., 2007). Esta planta é utilizada pelos índios Toba, da região nordeste da Argentina, na forma de infusão para a lavagem e desinfecção de erupções cutâneas, feridas e hemorroidas (MARTÍNEZ-CROVETTO, 1964). Suas folhas podem ser aplicadas topicamente para curar inchaços (CHOUDHARY; OH; LEE, 2011), seu suco puro ou diluído é eficaz na retirada de pus das feridas (PENNA et al., 2001) e a infusão da raiz é tomado contra a gripe (ZAMORA-MARTINEZ; POLA, 1992; ALVES et al., 2001).

FIGURA 11 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Polygonum acre* H.B.K.

FONTE: CARR (2004); MILLIKEN; KLITGÅRD; BARACAT (2009); FRANCO (2014).

NOTA: A - Detalhe das folhas; B - Detalhe da ócrea: estrutura características das plantas da família *Polygonaceae*; C - Habitat natural; D - Detalhe das flores dispostas em forma de espiga.

As espécies do gênero *Polygonum* apresentam grande diversidade de metabólitos secundários, sendo ricas em compostos fenólicos (como flavonoides), sequiterpenos (como sulfatos de estilbenos e poligonal), taninos, cumarinas, isocumarinas (poligonolídeo) e outras classes de metabólitos (FUKUYAMA et al., 1982; 1983, 1985; FURUTA et al., 1986; LIMA et al., 2001; JÁCOME et al.; 2004; PASTORI et al., 2015).

Estudos farmacológicos prévios com os extratos etanólico e aquoso, de toda a planta, revelaram atividades anti-histamínica, anti-inflamatória, antipirética e hipotensora (ALVES et al., 2001). Ensaios de toxicidade *in vivo* (murino) utilizando os extratos metanólico e aquoso, indicaram uma LC_{50} > 1g / kg (BHAKUNI et al. 1969 *apud* ALVES et al., 2001). Extratos brutos feitos com diclorometanos das partes aéreas, apresentaram uma forte atividade antimicrobiana frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*, tendo como princípio ativo o sesquiterpeno dialdeído poligodial (ALVES et al., 2001). Apesar de existirem relatos literários científicos sobre *P. acre*, como visto na Tabela 5, informações sobre esta espécie vegetal ainda são escassas.

TABELA 5 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS APRESENTADA PELO *Polygonum acre* H.B.K.

Partes da planta	Extrato/solvente	Compostos	Propriedade	Ref.
Folhas	Extrato aquoso	-	Efeito protetor sobre hemorragias pulmonares artificiais *in vivo* (camundongos)	**1**
Folhas	Extrato aquoso	-	Antidiarreico *in vitro*	**2**
Parte aéreas	Extrato aquoso	-	Anti-inflamatório oral *in vivo* (Edema de pata murina)	**3**
Partes aéreas	Extração aquosa	-	Antiviral *in vitro* (RSV e HSV-1)	**4**
Partes aéreas	Maceração com diclorometano	Poligodial	Antifúngico *in vitro* (*Cladosporium Sphaerospermum)*	**5**
Partes aéreas	Extrato diclorometano	-	Antimicrobiano *in vitro* (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor* sp. *Aspergillus niger*)	**6**
Folhas	Infusão	-	Antiproliferativa *in vitro* (*Allium cepa*)	**7**

FONTES: 1 - TEIXEIRA et al. (1989); 2 - ALMEIDA et al. (1995); 3 - GORZALCZANY et al. (1996); 4 - KOTT et al. (1999); 5 - ALVES et al. (2001); 6 - PENNA et al. (2001); 7 - PASTORI et al. (2015).

NOTA: Partes aéreas correspondem as folhas e caules do vegetal; RSV: Vírus sincicial respiratório; HSV-1: Vírus de herpes simples do tipo 1.

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Muitas plantas medicinais são comercializadas e consumidas, atualmente, com pouca ou nenhuma comprovação das suas propriedades farmacológicas (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Desta forma, a avaliação do potencial terapêutico das plantas e de seus constituintes químicos, como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, entre outros metabólitos é de extrema importância (FOGLIO et al., 2006). Para referir as propriedades tradicionais, são realizados testes biológicos *in vitro* e *in vivo*, a fim de comprovar e demonstrar a sua eficácia, bem como, o seu mecanismo de ação (FOGLIO et al., 2006; SASIDHARAN et al., 2011).

2.4.1 Atividade antiparasitária

2.4.1.1 Saúde animal x *Haemonchus contortus*

O parasitismo gastrintestinal (GI), constitui um dos maiores problemas na produção de ruminantes ao redor do mundo. Nos países em desenvolvimento, principalmente naqueles localizados em regiões tropicais e subtropicais, a infecção por nematoides GI continua sendo uma das principais causa de grandes perdas econômicas, devido ao retardo da criação, do alto custo de produção e em casos extremos, da morte dos animais (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003; WALLER, 2006; KAMARAJ; RAHUMAN, 2011).

Dentre os parasitas que acometem os pequenos ruminantes (caprinos e ovinos), destaca-se o *Haemonchus contortus* (RIBAS et al., 2009; STUCHLÍKOVÁ et al., 2018). Este parasito interfere na capacidade do animal em ganhar de peso, na produtividade (carne, lã ou leite) e, em piores casos, pode até causar a morte dos animais jovens e susceptíveis, como exemplo deste último, as fêmeas em período de periparto (RIBAS et al., 2009; COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011; STUCHLÍKOVÁ et al., 2018). Ele consiste de um nematoide pertencente a Ordem *Strongylida* e da família *Trichostrongylidae*, como demonstrado na Tabela 6 (EL-ASHRAM et al., 2017).

O período pré-patente deste parasita varia de 14 a 28 dias em pequenos ruminantes. Seu ciclo de vida, ilustrado na Figura 12, é direto e pode ser separado em quatro etapas: *(1) estágio parasitário* - corresponde na etapa de interação do parasita com o hospedeiro; *(2)estágio de contaminação* - período de liberação dos ovos não blastomerizados nas fezes (cada fêmea pode

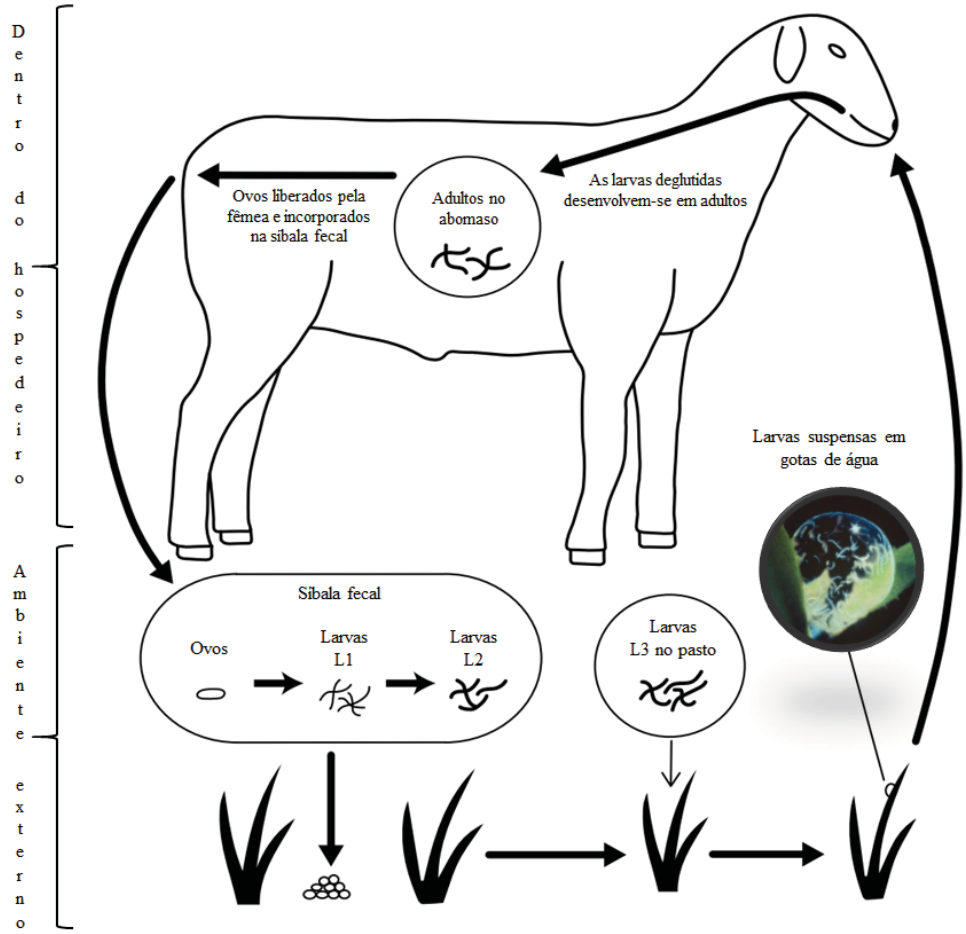
depositar de 5.000 a 15.000 ovos por dia; *(3) estágio de vida livre* - fase do desenvolvimento dos estágios larvais de vida livre (L1 a L3 embainhada); *(4) estágio de infecção* - consumo do pasto contaminado, com larvas L3, pelo hospedeiro causando a infecção ou reinfecção. Os parasitas adultos, vivem somente alguns meses e se reproduzem sexuadamente no hospedeiro (EMERY; HUNT; JAMBRE, 2016; EL-ASHRAM et al., 2017).

TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *Haemonchus contortus*

Filo:	**Nemathelminthes**
Classe:	Secernentea
Sublasse	Rhabditia
Ordem:	Strongylida
Superfamília:	Trichostrongyloidea
Família:	Trichostrongylidae
Gênero:	*Haemonchus*
Espécie:	*Haemonchus contortus*
(Rudolf, 1803)	

FONTE: EL-ASHRAM et al. (2017).

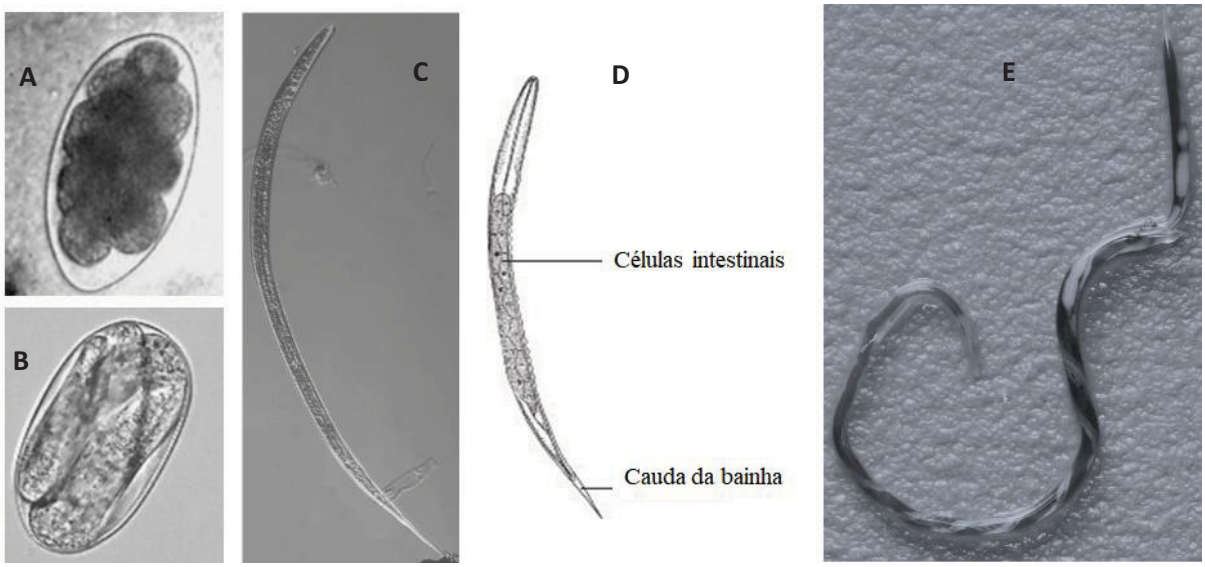
FIGURA 12 - CICLO DE VIDA DO *Haemonchus contortus*



FONTE: Adaptado de PRICHARD; GEARY (2008); MACHEN et al (2017).

Os ovos de *H. contortus* são grandes, regulares, elipsoidais e ligeiramente achatados nos polos, possuem uma cavidade parcialmente preenchida e se apresentam no estado de mórula, como visto na Figura 13 A (EL-ASHRAM et al., 2017). Em condições ideais: temperatura de 31 a 34 ºC e umidade relativa do ar superior a 85%, as larvas em estágio L1, eclodem dos ovos nas fezes e sofrem muda para o estágio L2. Neste estágio de vida livre, ainda nas fezes, as larvas se alimentam exclusivamente de bactérias. Cerca de cinco dias após a migração das fezes para o pasto, as larvas se encontram em estágio L3 (Figura 13 B e C), com preservação da bainha proteica da fase L2, que neste caso, atua como membrana protetora (EMERY; HUNT; JAMBRE, 2016; EL-ASHRAM et al., 2017). Em regiões com o clima quente e úmido, a infecção do hospedeiro pode ocorre o ano todo, pois as larvas L3 podem sobreviver no pasto, por até um ano sob estas condições. Entretanto em regiões mais frias e secas ou com estações bem definidas, as L3 permanecem viáveis somente por algumas semanas (EMERY; HUNT; JAMBRE, 2016; EL-ASHRAM et al., 2017).

FIGURA 13 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO OVO, DA LARVA E DA FÊMEA ADULTA DE *Haemonchus contortus*



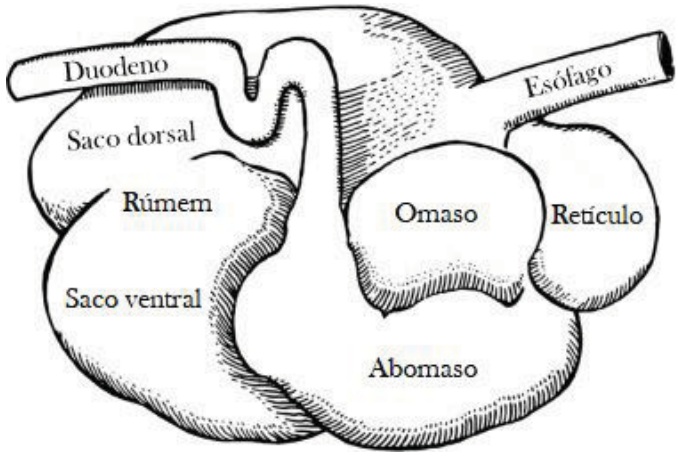
FONTE: Adaptado de GILLEARD (1999); HARON et al (2007); KUCHAI et al. (2012); VARGAS-MAGAÑA et al. (2014); RVC (2017); VK (2017); EL-ASHRAM et al. (2017).

NOTA: Ovos morulados (A): Possuem cerca de 78 a 81 µm x 44 a 46 µm de dimensão e se desenvolvem em larvas L1 (B); Larvas L3 (C): Possuem de 650 a 850 µm de comprimento, Desenho esquemático da L3 (D) mostrando as células intestinais, que geralmente são 16 e a cauda formando pela bainha proteína protetora; Na fêmea adulta (E) é bem visível que o trato reprodutivo, que é de coloração branca, está envolto ao intestino, de coloração vermelha, devido a ingestão de sangue do hospedeiro, gerando uma aparência retorcida, visível a olho nu. As fêmeas possuem de 20 a 30 mm, enquanto os machos de 10 a 20 mm.

Após a sua ingestão, juntamente com o pasto, as L3 passam pelo processo de desembainhamento, penetração na mucosa do abomaso (Figura 14), muda quarto estágio (L4)

para no fim, retornam à luz do abomaso (em pequenos ruminantes) ou no compartimento 3 (em pseudoruminantes, como camelídeos) para se desenvolvem em parasitos adultos hematófagos (Figura 13 D), após três semanas da ingestão de L3 infectantes (EL-ASHRAM et al., 2017). Em pequenos ruminantes, os parasitas adultos se alojam no lúmem do abomaso, ilustrado na Figura 14, onde se alimentam com cerca de 0,03 a 0,05 mL de sangue por dia/parasita, podendo causar anemia extrema e morte do hospedeiro, antes mesmo do período pré-patente (RODRIGUEZ et al., 2015; EMERY; HUNT; JAMBRE, 2016).

FIGURA 14 -DESENHO ESQUEMÁTICO DO ESTÔMAGO RUMINANTE



FONTE: Adaptado de DEPETER; GEORG (2014).

NOTA: O estômago é formando por quatro compartimentos: *retículo*, *rúmem* e *omaso*, que são revestidos por membranas mucosas não glandulares e o *abomaso*, que consiste no compartimento gástrico. O *H. contortus* adulto se aloja exclusivamente no quarto compartimento - abomaso.

2.4.1.2 Características naturais da resistência do hospedeiro: sistema imunológico

Em um rebanho de ovinos, pode-se observar uma grande diferença entre animais que apresentam baixa contagem de ovos nas fezes (OPG) ou que não possuem sinais clínicos de parasitismos, daqueles que se encontram anêmicos e altamente parasitados (SOTOMAIOR et al., 2007). A existência de animais *resistentes* (aqueles onde a parasitose não consegue se instalar), *resilientes* ou *tolerantes* (suportam a verminose, sem comprometimento na produtividade) e *susceptíveis* (apresentam grande dano com a parasitose) dentro de uma população, na verdade, é uma característica normal dentro de qualquer espécie (AMARANTE, 2004).

A resistência aos parasitos GI pode ser considerada como a habilidade do animal em impedir o estabelecimento ou o subsequente desenvolvimento da infecção parasitária

(ALBERS et al., 1990). Ela se baseia na capacidade imunológica de cada indivíduo, quando desafiado pelos parasitos, e é controlada, principalmente, por características genéticas (AMARANTE, 2004; SOTOMAIOR et al., 2007).

Entretanto, a idade e o estado nutricional dos animais exercem grande influência na resistência. Quanto mais jovens são os animais, maior será a sua susceptibilidade às infeções parasitárias. Esta característica ocorre, principalmente, devido à falta de uma resposta imunológica específica contra os parasitos. O estado nutricional dos animais, também influencia a resposta imunológica de várias formas, como por exemplo: (a) alimentação de boa qualidade e energética, aumentam as chances dos animais em enfrentar as consequências adversas do parasitismo; (b) dieta rica em proteínas, também auxiliam na resistência do animal, limitando o estabelecimento de larvas infectantes, o desenvolvimento e a fecundidade dos nematoides, auxiliando na eliminação dos parasitos já instalados no sistema GI; e (c) presença de nutracêuticos ou compostos bioativos antiparasitários que atuam diretamente sobre os helmintos e ou podem atuar na modulação do sistema imunológico (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011; AMARANTE, 2012; MOLENTO et al., 2013).

Após a primo-infecção parasitária, os helmintos ativam o reconhecimento imunológico através das vias do sistema complemento (SC). Este, por sua vez, contribui para a resposta inflamatória do hospedeiro, através do recrutamento de eosinófilos e de outras células imunológicas (células não T e B). Os parasitos imaturos (juvenis) são susceptíveis a lise, através da resposta citolítica, entretanto, muitos parasitos adultos apresentam resistência, através de mecanismos imunomoduladores, que inibem a sua morte via SC, tanto pela via clássica quanto pela alternativa (MULCAHY et al., 2004; MESQUITA-JUNIOR et al., 2010).

O SC é um importante efetor da resposta imunológica inata e adaptativa. Ele consiste de um grupo de proteínas séricas que forma um sistema de ativação altamente organizado, que através de proteólise sequencial, geralmente enzimas ativas com propriedades proteolíticas, que atuam como mediadores dos processos inflamatórios, de fagocitose, da citotoxidade e da ativação de moléculas do sistema imune adaptativo, como a ativação secundária dos linfócitos B (via receptor CR2 ou CD21). Em resumo, as moléculas ativas do SC medeiam à eliminação de agentes patogénicos diretamente através de lise celular ou indiretamente através de opsonização, auxílio da indução de inflamação e resposta imunológica padrão Th2 (com participação de mastócitos, eosinófilos, IgE e IgA) (MULCAHY et al., 2004; COELHO-CASTELO et al., 2009).

O hospedeiro possui uma complexa resposta de defesa molecular e celular contra os helmintos, entretanto, para evitar a expulsão do corpo do hospedeiro, estes parasitos

desenvolveram mecanismos altamente elaborados e complexos de supressão ou subversão da resposta imunológica do hospedeiro, incluindo a infra-regulação da resposta Th1, secreção de moléculas anti-efetoras, inibição de células efetoras, inibição de moléculas do complemento, indução de respostas proliferativas inespecíficas e inibição de respostas proliferativas, como por exemplo (MULCAHY et al., 2004; HEWITSON; GRAINGER; MAIZELS, 2009; MCNEILLY; NISBET, 2014). Para garantir vantagens sobre a coevolução hospedeiro-parasita, atualmente o controle parasitário é feito com administração de compostos químicos anti-helmínticos.

2.4.1.3 Anti-helmínticos comerciais: resistência parasitária

Nos últimos 40 anos, três classes de antiparasitários de amplo espectro e poder residual foram desenvolvidos. Os benzimidazóis, os imidazotiazóis e as lactonas macrocíclicas se tornaram uma ferramenta de fácil utilização aos diferentes sistemas de produção (NARI, 2003; MELO; BEVILAQUA, 2002).

Estão inclusos na classe dos benzimidazóis e pró-benzimidazóis, o tiabendazol, o oxfendazol, o oxibendazol, o febantel, o tiofanato, o netobimim e o albendazol, sendo este último ilustrado na Figura 15 A (MELO; BEVILAQUA, 2002). É uma classe de molécula de amplo espectro de ação, possuindo eficácia em parasitos nematoides, trematoides e cestoides (MELO; BEVILAQUA, 2002; ROBINSON et al., 2004; PRANZO et al., 2010). Estas moléculas interagem diretamente com as β-tubulinas dos nematoides, interferindo na dinâmica dos microtúbulos e, como consequência, causando inúmeras alterações ultraestruturais celulares, as quais podem levar à morte do parasito (MELO; BEVILAQUA, 2002; ROBINSON et al., 2004). Uma ação secundária, gerada por estas moléculas, corresponde a inibição da fumarato redutase, enzima essencial do metabolismo fermentativo em helmintos, diminuindo o transporte de glucose e, assim, alterando o metabolismo energético destes parasitas (PRICHARD, 1973; MELO; BEVILAQUA, 2002).

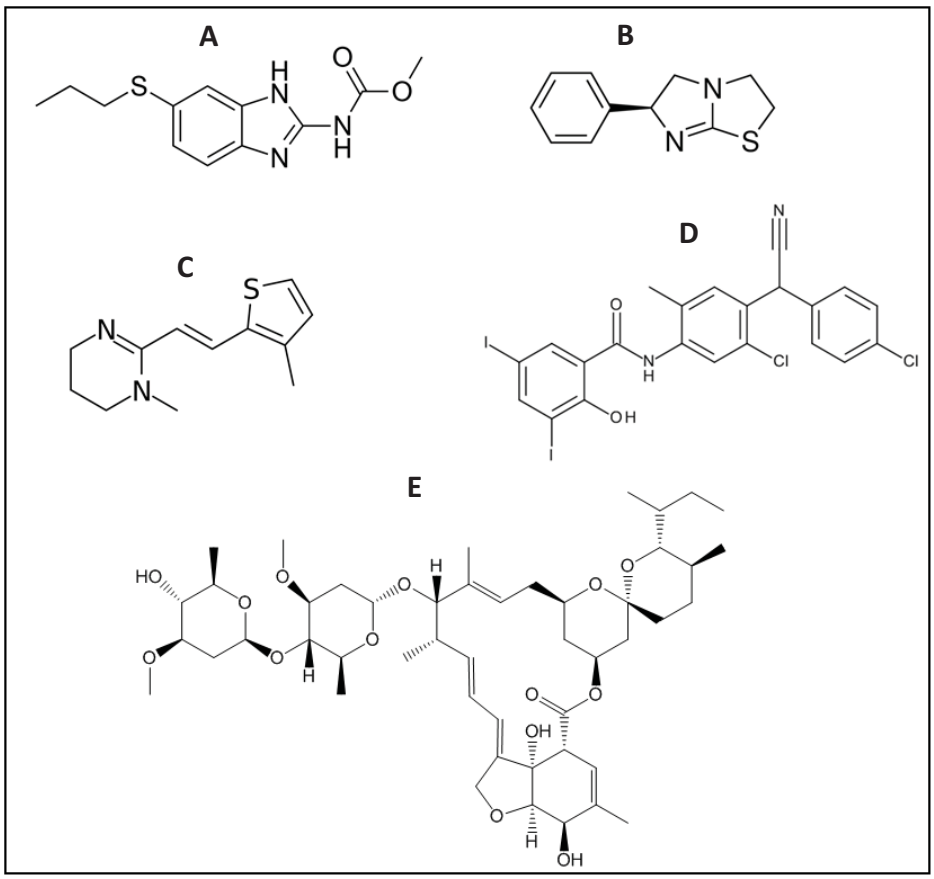
O levamisol (Figura 15 B) é o anti-helmítinco mais utilizado e pesquisado, dentre os derivados do imidazotiazol (SANGSTER; GILL, 1999; CHANDY et al., 2016). Ele atua na abertura dos canais receptores de acetilcolina (colinérgicos), presentes nas membranas musculares da parede corpórea dos nematoides, facilitando a entrada de íons cálcio (Ca^{2+}) e a despolarização do nervo nematoide. Como consequências, ocasiona uma contração muscular espástica, que acarretará na morte do parasito ou na sua expulsão do hospedeiro (SANGSTER;

GILL, 1999; BOULIN et al., 2011; CHANDY et al., 2016; ABONGWA, MARTIN, ROBERTSON; 2017).

As lactonas macrocíclias são moléculas que tem como alvo terapêutico os invertebrados, principalmente, endoparasitos nematoides e ectoparasitos artrópodes de interesse humano e veterinário (MELO; BEVILAQUA, 2002; GEARY; MORENO, 2012). Estas moléculas pertencem à família das avermectinas, as quais incluem a abamectina, dormamectina, nemadectina, moxidectina e ivermectina, sendo esta última demonstrada na Figura 15 E (MELO; BEVILAQUA, 2002). São moléculas antiparasitárias de amplo espectro, que atuam contra parasitos adultos, em estágio imaturo e larvas hipobióticas, através de vários mecanismos de ações. Dentre eles, pode-se citar a paralização deletéria por abertura dos canais de cloro controlados por glutamato (GluCl), presentes somente em invertebrados, ou ácido alfaaminobitírico (GABA) (MELO; BEVILAQUA, 2002; NOËL, 2008; COSTA et al., 2012; GEARY; MORENO, 2012). O bloqueio das transmissões interneurais de nervos excitatórios gerados, atua diretamente sobre a musculatura, causando paralisia, principalmente da faringe (GEARY et al., 1993; CHOSIDOW; GENDREL, 2016; ABONGWA, MARTIN, ROBERTSON; 2017).

Ainda existem outras classes de medicamentos anti-helmínticos: tetrahidropirimidinas, como pirantel e morantel (Figura 15 C) e as salicilanilidas, como oxantel, morantel e closantel (Figura 15 D). As tetrahidropirimidinas possuem ação similar aos compostos imidazotiazólicos, pois atuam como agonistas dos receptores nicotínicos dos nematoides, gerando a despolarização das membranas musculares (ROBERTSON et al*.,* 1994; RAYES et al., 2001; ABONGWA, MARTIN, ROBERTSON; 2017). As salicilanilidas possuem baixo espectro e atuam, principalmente, no controle de trematódeos, cestódeos e de alguns nematódeos hematófagos. As salicilanilidas, como o closantel, conseguem se ligar as proteínas plasmáticas, como a albumina, atingindo o parasito pelo sangue do hospedeiro. Dentro do parasito ele atua por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa, levando a morte do parasito (MELO; BEVILAQUA, 2002; LOPES et al., 2014), entretanto, existem relatos de intoxicação com danos irreversíveis, deste composto, em animais e humanos (SAKHAEE; DERAKHSHANFAR, 2010; LOPES et al., 2014; TABATABAEI et al., 2016; ABONGWA, MARTIN, ROBERTSON; 2017).

FIGURA 15 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS PRINCIPAIS ANTI-HELMÍNTICOS COMERCIAIS



FONTE: PRANZO et al. (2010); SEGURA-CABRERA (2011); LESPINE (2013); ABONGWA, MARTIN, ROBERTSON (2017).

NOTA: A - Albendazol (benzimidazol); B - Levamisol (imidotiazol); C - Morantel (tetrahidropirimidinas); D - Closantel (salicilanilida); E - Ivermectina (lactona macrocíclica).

Durante 25 anos, aproximadamente, nenhuma nova classe de molécula anti-helmínticas, para animais domésticos, foi lançada no mercado, até a identificação das substâncias derivadas da amino acetonitrila (AADS - *aminoacetonitrile derivatives*) e do espiroindol (SAGER et al., 2009; GEURDEN et al., 2012)

Os AADs, tem como maior representante o monepantel, e consiste de uma classe de compostos de baixa massa molecular, a qual, são facilmente obtidas por alquilação de fenóis com cloroacetona, reação de Strecker e acilação da amina com cloretos de aroila (KAMINSKY et al., 2008). Possuem alta ação contra larvas L4 de H. contortus, através da morte gerada pela paralisia ocasionada pela hipercontração dos músculos da parede do corpo e contração espasmódica da porção anterior da faringe (KAMINSKY et al., 2008; SAGER et al., 2009).

O principal representante dos derivados do espiroindal, é o derquantel (GEURDEN et al., 2012). Essa droga, antagonista competitivo de receptores nicotínicos de acetilcolina

musculares, possui a capacidade paralisar através do bloqueio da transmissão neuromuscular colinérgia que induz, rapidamente, a uma paralisia flácida. Porém, este, é disponível no mercado apenas em combinação com a abamectina (GEURDEN et al., 2012; BUXTON et al., 2014).

A facilidade ao acesso destas drogas estimulou uma grande negligência, por parte dos produtores, devido à ausência de aconselhamentos profissionais quanto à forma correta de utilização destes medicamentos. Como consequência, este fato se tornou uma das principais causas do decréscimo da atividade dos fármacos sintéticos, pois a utilização indiscriminada e/ou a utilização de produtos de má qualidade, resultaram em um problema mundial, pois ocorreu a seleção de parasitas resistentes às principais classes de medicamentos: benzimidazol, lactonas macrocíclicas, imidazotiazóis, tetrahidropirimidinas (morantel e pirantel) e salicilanilidas (NARI, 2003; MOLENTO et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2017).

A resistência consiste num fenômeno hereditário pré-adaptativo natural, ocasionado pela presença de gene ou genes que causam vantagens em certos indivíduos da população parasitária. Ou seja, o seu surgimento ocorre através de mutações genéticas em certos indivíduos, que os tornam aptos a sobreviver a droga, mesmo antes do primeiro contato (MELO; BEVILAQUA, 2002; SHALABY, 2013; ALBUQUERQUE et al., 2017).

Tratamentos inadequados, como por exemplo, aqueles realizados em curtos intervalos de tempos e com subdosagens, aceleram o processo natural da evolução, através da eliminação de todos os parasitos sensíveis ao medicamente. Como consequência, os sobreviventes consistem daqueles que apresentavam a carga genética da resistência, que por sua vez, geram um *pool* de novo ovos geneticamente resistentes (MELO; BEVILAQUA, 2002; ALBUQUERQUE et al., 2017).

Além do problema com a resistência, alguns destes medicamentos são custosos, poderem causar poluição ambiental, não estão disponíveis em muitos países e ainda podem deixar resíduos nos subprodutos (leite e carne) (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997; PESSOA et al., 2002; KAMARAJ; RAHUMAN, 2011; EDDOUKS et al., 2014).

2.4.1.4 Plantas medicinais e a atividade anti-helmíntica

Duas novas classes de medicamentos anti-helmínticos sintéticos e semissintéticos, o monepantel e o derquantel, foram lançados recentemente como forma de tratamento alternativo e combinativo, no meio do limitado campo de novas descobertas (KUMARASINGHA et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2017). O monepantel foi lançada no mercado em 2009, na Nova

Zelândia e em 2010 para o resto do mundo. Essa molécula atua de forma similar aos compostos imidazotiazólicos: interação com os receptores colinérgicos, hipercontração e consequente paralisia espástica do nematódeo (ALBUQUERQUE et al., 2017; BAGNALL, 2017). Em 2013, já foram relatadas duas espécies de nematoides (*Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*) resistentes a essa molécula na Nova Zelândia (SCOTT et al., 2013) e, nos anos seguintes, também foram encontrados *H. contortus* resistentes no Uruguai, na Holanda, na Austrália e Brasil (MEDEROS et al., 2014; VAN DEN BROM et al., 2015; SALES; LOVE, 2016; BAGNALL et al., 2017; LAMB et al., 2017; MARTINS et al., 2017). Desta forma, é de extrema importância a busca por novas estratégias alternativas para o controle de parasitas GI (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006).

Os compostos provenientes de plantas, proporcionam uma oportunidade única na busca por novos anti-helmínticos eficazes e seguros (KUMARASINGHA et al., 2016; ROMERO-BENAVIDES et al., 2017). A Tabela 7 exemplifica algumas espécies vegetais, cujos extratos apresentaram atividade anti-helmíntica, de alguma forma:

TABELA 7 - ESPÉCIES VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA

Espécie	Extração/solvente	Compostos	Ação	Ref.
Allium sativum[+*], *Artemisia absinthium*[+*], *Carum carvi*[*+], *Consolida regalis*[*], *Daucus carota*[+] *Inula helenium*[*], *Juglans regia*[*+], *Satureja hortensis*[*], *Valeriana officinalis*[*]	Maceração etanólica (80%)	-	[*] Sobre a embriogênese de ovos de *Ascaris suum* e [+]migração larval (L3) de *Trichostrongylus colubriformis in vitro*	**1**
Senna occidentalis (partes aéreas) *Leonotis ocymifolia,* (partes aéreas) *Leucas martinicensis,* (partes aéreas) *Rumex abyssinicus,* (partes aéreas) *Albizia schimperiana* (Cascas do caule)	Extração aquosa e hidroetanólica (percolação)	-	Sobre a eclodibilidade de ovos e migração larval (L3) de *H. contorts in vitro*	**2**
Iris kashmiriana (Planta como um todo)	Extração aquosa e metanólica	-	Sobre a viabilidade de H. contortus adultos *in vitro* e OPG *in vivo* (Ovelhas)	**3**

(Continua)

NOTA: Partes aéreas correspondem as folhas e o caules dos vegetais; OPG - Ovos por grama de fezes.

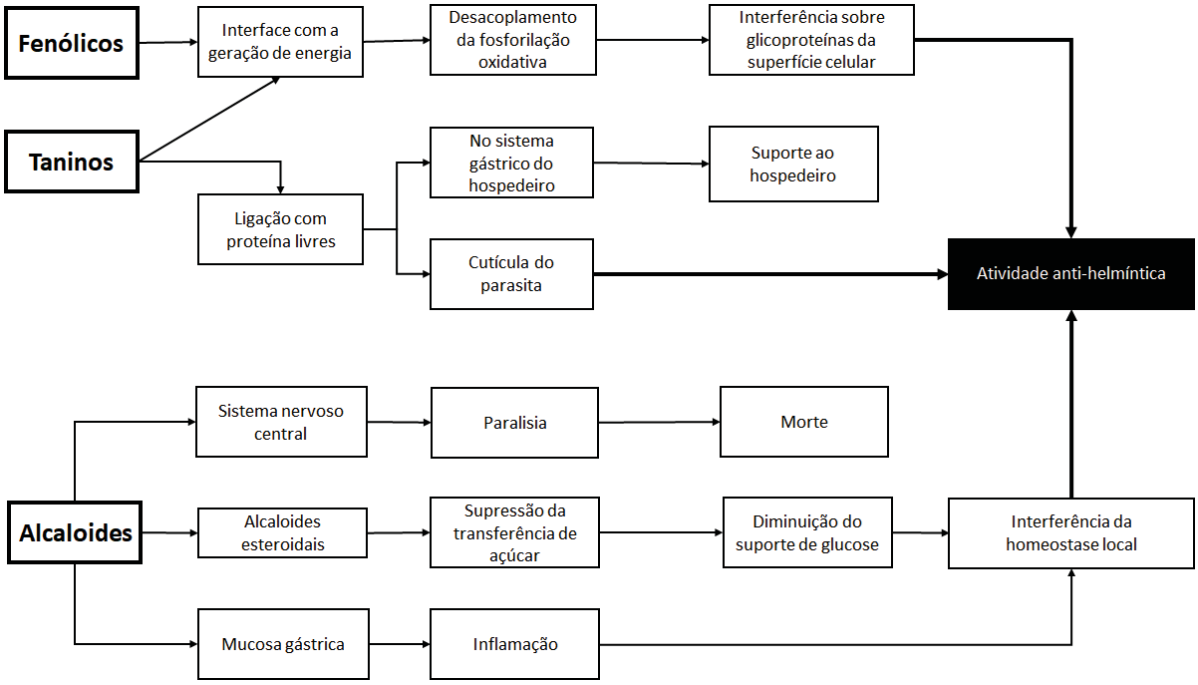
Picria fel-terrae (Folhas e planta inteira)	Extração Diclorometano etanólica (1:1)	-	Sobre a mobilidade e desenvolvimento de larvas (L3) de *H. contortus in vitro*	**4**
Murraya koenigii (Folhas)	Extração aquosa e metanólica	Taninos, saponinas, fenólicos, triterpenoides e flavonoides	Sobre a eclodibilidade de ovos *in vitro*, mobilidade de *H. contortus* adultos *in vitro* e *in vivo* (Ovelhas)	**5**
Artemisia dracunculus (Folhas) *Mentha pulegium* (Folhas) *Zataria multiflora* (Folhas)	Extração metanólica	-	Sobre a viabilidade larval de *Parascaris equorum in vitro*	**6**
Albizia adiantifolia (Folhas, cascas do caule e das raizes)	Hidrodestilação (clevenger)	Monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos (β-cariofileno)	Sobre a mobilidade e viabilidade de *Eudrilus eugeniae* adultos *in vitro*	**7**
Tetradenia riparia (Folhas)	Extração hexânica (sonicação)	8(14),15-sandaracopimaradianos -7α,18-diol	Sobre a mobilidade de *Caenorhabditis elegans* adultos *in vitro*	**8**
Larrea tridentate (Folhas)	Extração hidrometanólica	Sesamina, galocatequina, peonidina 3-O rutinosídeo, galagina metilada, epigalocatequina 7-O-glicuronídeo e epigalocatequina	Sobre a viabilidade de larvas desembainhadas (L3) de *H. contortus in vitro*	**9**
Persea americana (sementes)	Extração etanólica e fração hexânica (partição)	Taninos condensados, Ácidos fenólicos (ácido clorogênico) e flavonoides (quercetina e epicatequina)	Sobre a migração larval (L3) de *H. contortus in vitro*	**10**

FONTES: 1 - URBAN et al. (2008); 2 - EGUALE; TADESSE; GIDAYA (2011); 3 - KHAN et al (2016); 4 - KUMARASINGHA et al. (2016); 5 - MOLLA; BANDYOPADHYAY (2016); 6 - RAKHSHANDEHROO et al. (2017); 7 - AKANDE, ABOABA, FLAMINI (2018), 8 - ASSEFA et al. (2018). 9 - GARCÍA et al., 2018; 10 - SOLDERA-SILVA et al., (2018).

NOTA: Partes aéreas correspondem as folhas e o caules dos vegetais; OPG - Ovos por grama de fezes.

Os mecanismos de ações destas moléculas, ainda não estão bem compreendidos (Figura 16), porém, é provável que muitos dos compostos, presentes nos extratos vegetais, estejam atuando no parasita através de vias diferentes, daquelas utilizadas pelas drogas anti-helmínticas comerciais. Desta forma, podendo serem capazes de atuar em nematoides resistentes a um ou mais anti-helmínticos comerciais (KUMARASINGHA et al., 2016).

FIGURA 16 - POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DE DIFERENTES METABÓLITOS SECUNDÁRIOS



FONTE: BORBA et al. (2010); HAREKRISHN et al. (2010); SALHAN et al. (2011).

NOTA: Anti-helmínticos fenólicos sintéticos, como a niclosamida, interferem na geração de energia por desacoplamento da fosforilação oxidativa, desta forma, podendo ser este um dos possíveis mecanismos dos fenólicos vegetais. Esse desacoplamento também poderia ocorrer por ação dos taninos. Estas moléculas também poderiam estar interagindo em glicoproteínas da superfície celular dos parasitas, causando danos em diversos estágio ou ainda podem estar protegendo as proteínas de degradação ruminal e aumentando a sua disponibilidade no intestino delgado. Os alcaloides podem estar atuando no sistema nervoso central, podendo causar paralisia dos helmintos. Alcaloides esteroidais, em concentrações específicas, podem suprir a transferência da sacarose do estômago para o intestino delgado, diminuindo o suporte de glicose.

2.4.2 Atividade antioxidante

2.4.2.1 Espécies reativas, radicas livres e estresse oxidativo

É irônico associar que um elemento indispensável a vida, oxigênio (O_2), sob certas condições, possa gerar efeitos deletérios no organismo (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; SINGH; KAUR, 2013). Na verdade, o O_2 é um gás tóxico, porém, os humanos e outros organismos aeróbios o suportam, devido que ao mesmo tempo que as cadeias transportadoras de elétrons e sistemas enzimáticos para usá-lo estavam se desenvolvendo, as defesas antioxidantes contra seus efeitos tóxicos, estavam evoluindo paralelamente, por exemplo (ARUOMA, 1994).

As espécies reativas (ERs) consistem de átomos, moléculas ou íons altamente reativos, que podem ser derivados de três elementos fundamentais, sendo eles o: oxigênio, já

mencionado anteriormente, que gera as espécies reativa do oxigênio (EROs), o enxofre, que origina as espécies reativas do enxofre (EREs) e do nitrogênio, ao qual, gera as espécies reativas do nitrogênio (ERNs) (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; CAROCHO; FERREIRA, 2013). Didaticamente, as ERs ainda podem ser de dois tipos: radicais livres (RLs) e compostos não radicalares (nRLs) (AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Os RLs, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada de valência (órbita externa), são instáveis e altamente reativos a outras moléculas, para atingirem a sua estabilidade (LOBO et al., 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Estas moléculas podem doar ou aceitar elétrons de outras substâncias, portando-se como agentes oxidantes ou redutores (LOBO et al., 2010; MOHAMMED et al., 2015). O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), o íon peroxil ($HOH^{\bullet}$), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO), radical oxigênio ($O_2^{\bullet}$), radical peroxil ($ROO^{\bullet}$), entre outros, são exemplos de RLs (AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Os nRLs não possuem elétrons desemparelhados. Porém, na presença de RLs ou outros catalisadores, como ferro e cobre, estas moléculas reagem fortemente, formando intermediários ainda mais reativos, que por sua vez, podem interagir com as suas moléculas adjacentes, em organismos vivos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCL), ácido hipobromoso (HOBr), oxigênio singleto ($^1O_2$), ozônio (O_3), ácido nitroso (HNO_2), são exemplo desta tipo de ERs (AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

EROs e outros RL, são produzidos em processos metabólicos essenciais no organismo. As células produzem estas moléculas, continuamente, como efeitos de reações enzimáticas: como aquelas envolvidas na cadeia respiratória, na fagocitose, na síntese de prostaglandinas, na reação de oxidases, no sistema citocromo P-450 e outros, bem como, em reações químicas não enzimáticas, como aquelas do oxigênio com outros compostos orgânicos, iniciadas por radiação ionizante, ciclos redox de drogas e xenobióticos, como adriamicina. Os radicais O_2^- e NO são as espécies reativas mais comumente sintetizadas, principalmente pelas enzimas NADPH oxidase e NO sintase, respectivamente (KUMAR et al., 2012).

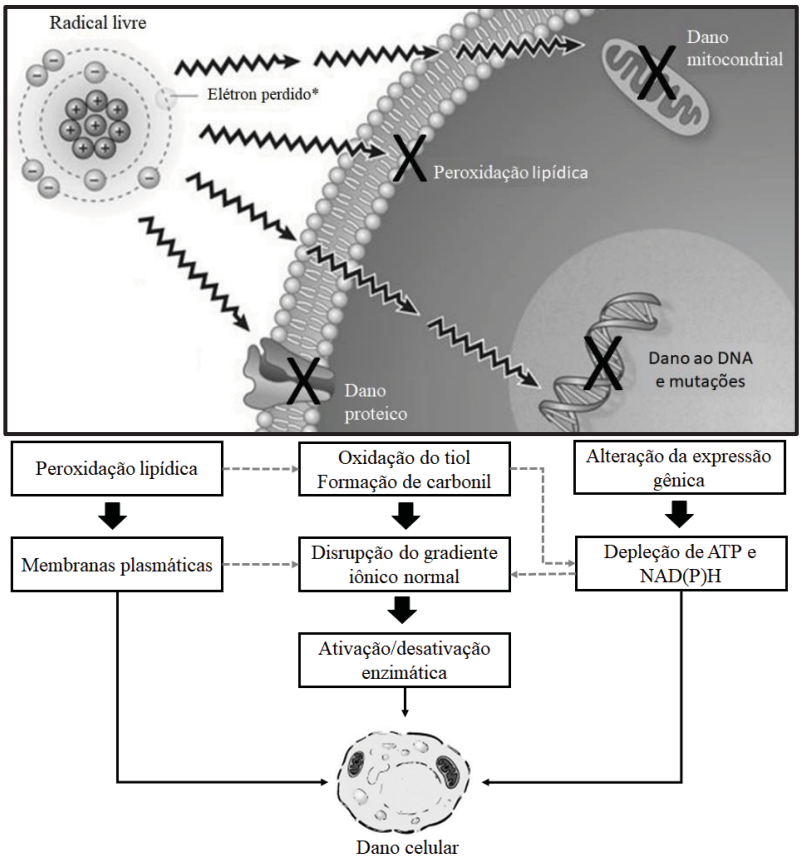
Os subprodutos derivados do metabolismo celular aeróbico, como EROs e ERNs, atualmente, são considerados produtos de grande importância, pois desempenham papel central na regulação celular (BÓKKON, 2012). Eles podem atuar como mensageiros secundários e controlar eventos como a expressão gênica, apoptose, crescimento celular, ciclo celular, adesão celular, quimiotaxia, interações proteína-proteína, funções enzimáticas além da homeostase

redox e de Ca^{2+}, por exemplo (BÓKKON, 2012). Desta forma, sua produção no organismo é extremamente regulada, bem como, célula específica (BÓKKON, 2012).

As ERs também podem ser originadas por fatores externos, como exposição a raios X, ozônio, cigarro, álcool, metais de transição (Cd, Hg, Pb, Fe, As), certas drogas (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina, bleomicina), produtos químicos industriais (solventes orgânicos) e poluentes atmosféricos (AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; LOBO et al., 2010).

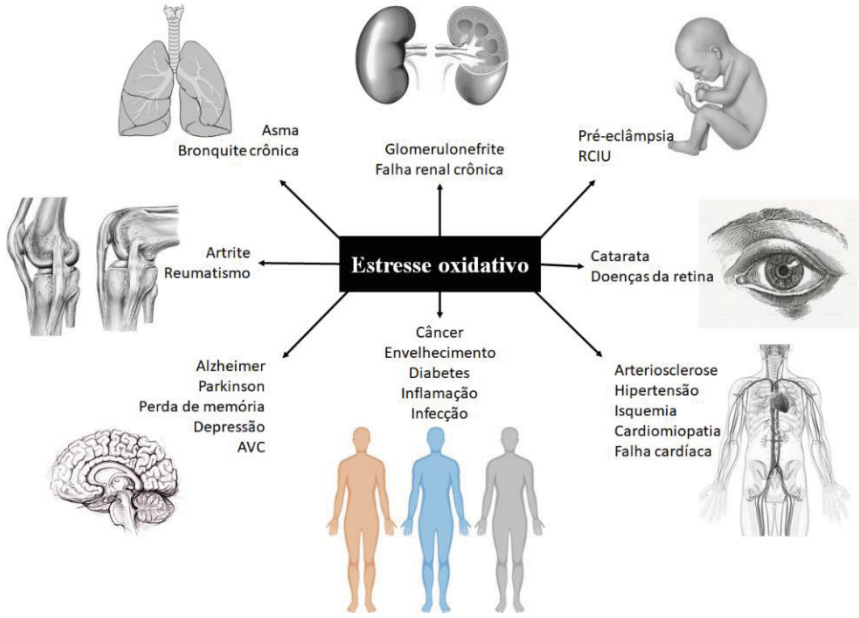
Os efeitos patogênicos ocorrem quando há superprodução de ERs, ou seja, quando ocorre o desequilíbrio da produção e neutralização destas moléculas, em um processo chamado de estresse oxidativo ou nitrosativo (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Quando acumuladas, as ERs, podem causar severos danos às membranas celulares, às proteínas, aos lipídeos, às lipoproteínas e, até mesmo, aos ácidos deoxirribonucleicos, presentes no DNA (Figura 17) (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015), podendo gerar uma variedade de doenças agudas, crônicas, degenerativas e inflamatórias, além do envelhecimento celular, como ilustrado na Figura 18).

FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA AÇÃO NOCIVA DOS RADICAIS LIVRES



FONTE: Adaptado de FEDARKO (2009); KUMAR et al. (2012).

FIGURA 18 - DOENÇAS RELACIONADAS COM O ESTRESSE OXIDATIVO EM HUMANOS



FONTE: Adaptado de PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY (2008); PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY (2015).

NOTA: AVC - Acidente vascular cerebral; RCIU - Restrição do crescimento intrauterino

2.4.2.2 Antioxidantes: endógenos e exógenos

As moléculas antioxidante atuam na neutralização do excesso de RLs, produzidos em resposta ao estresse oxidativo, protegendo as células dos seus efeitos nocivos. Elas são produzidas endogenamente, isto é, pelo próprio organismo, ou podem ser adquiridas de forma exógena, através da alimentação. Elas atuam de três forma principais: através de ação enzimática, como quebradores de cadeia e como quelantes de metais, demonstrados de forma simplificada na Figura 19 (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; MOHAMMED et al., 2015).

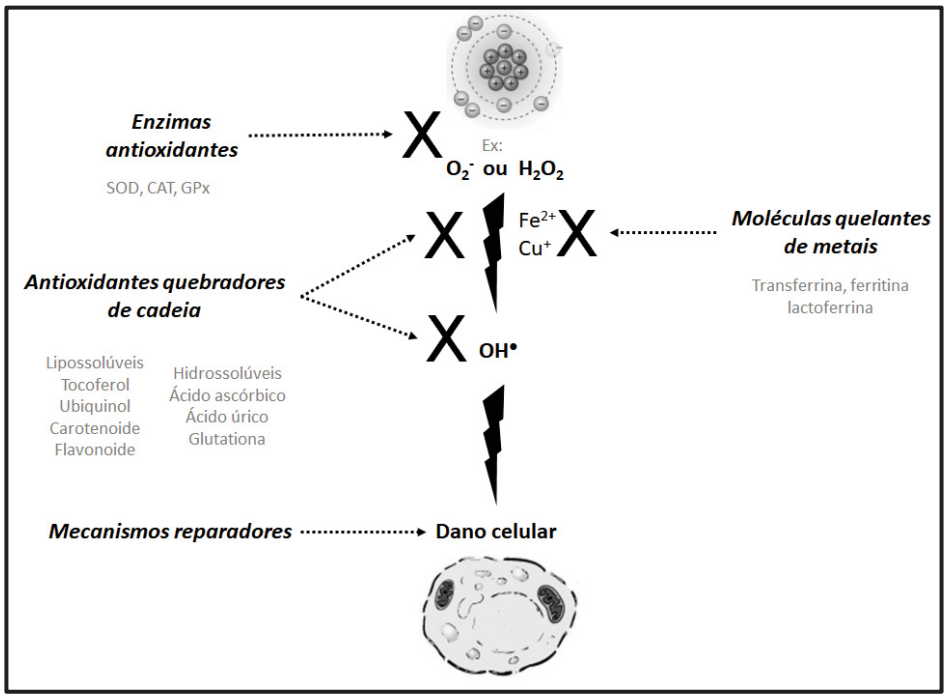
Os antioxidantes endógenos correspondem a moléculas com ação enzimática e não enzimática. As enzimas consistem na primeira linha de defesa na neutralização de EROs e ERNs. Esse sistema é composto, principalmente, pelas superóxido dismutases (SOD), catalases (CAT), glutationa peroxidases (GPx) e glutationa redutases (GRx), demonstradas na Figura 19. A SOD atua na primeira linha de defesa, catalisando a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e O_2 (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

O acúmulo de H_2O_2 pode ser tóxico para as células e para os tecidos, além que na presença de Fe^{2+}, este ER pode ser convertido no deletério $OH^{\bullet}$, através da reação de Fenton (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Desta forma, o H_2O_2 é transformado em H_2O e O_2 pela CAT, que é abundante nos peroxissomos, porém, ausente nas mitocôndrias (IGHODARO;

AKINLOYE, 2018). A redução do H_2O_2 mitocondrial para H_2O é realizada pela GPx (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Esta enzima também reduz peróxidos lipídicos e não lipídicos a seus álcoois correspondentes, oxidando a glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG). A GRx, atua na regeneração da GSH, a partir da GSSG, utilizando o NADPH com fonte redutora (ARUOMA, 1994; VAN HAAFTEN et al., 2003; AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; NIMSE; PAL, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Os antioxidantes não enzimáticos endógenos consistem da segunda linha defesa, atuando no sequestro (*scavenging*) dos RLs, ou na sua neutralização (Figura 19). O ácido lipóico, a glutationa, a L- argininina, a coenzima Q10, a melatonina, o ácido úrico e as proteínas quelantes de metais são exemplos de moléculas com esta ação (ARUOMA, 1994; AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; NIMSE; PAL, 2015).

FIGURA 19 - MODELO ESQUEMÁTICO DAS PRINCIPAIS LINHAS DE DEFESAS ANTIOXIDANTE



FONTE: Adaptado de YOUNG; WOODSIDE (2001).

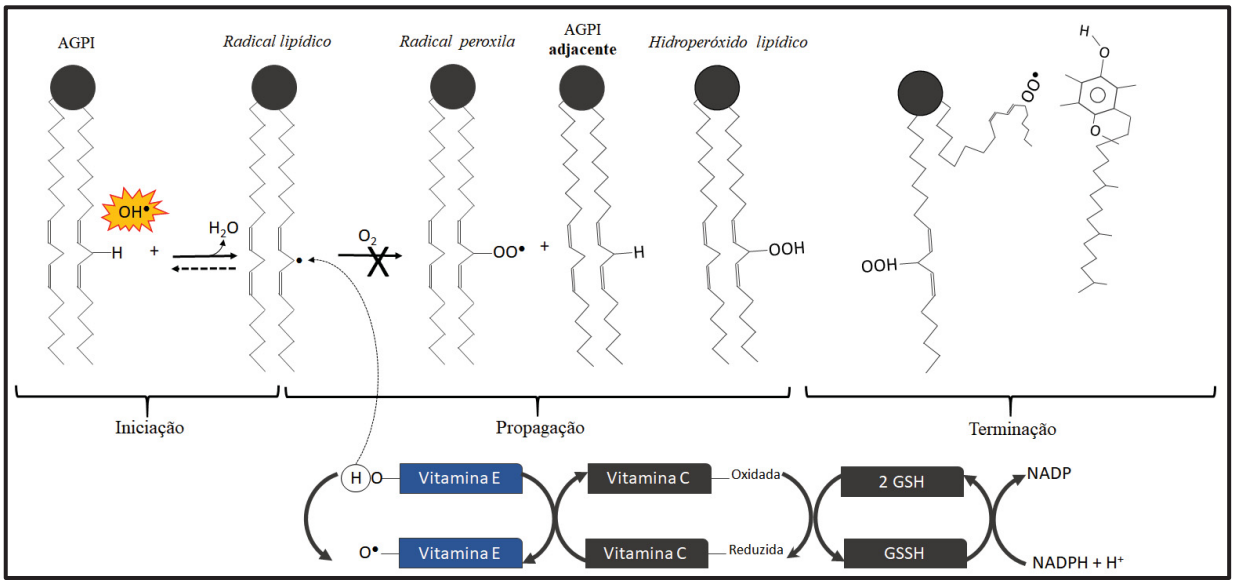
NOTA: As enzimas antioxidantes, geralmente, atuam no ambiente intracelular catalisam a decomposição de ERs; as moléculas quelantes de metais de transição (ferro e cobre), atuam impedindo a interação destes com ERs; os antioxidantes "quebradores de cadeia" são poderosos doadores de elétrons e reagem preferencialmente com os RLs, e consistem de moléculas que podem ser regeneradas ou consumadas na reação. SOD - Superóxido dismutase; CAT - Catalase; GPX - Glutationa peroxidase.

Já o retinol (vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenoides, alguns metais em pequenas quantidades, como selênio, manganês e zinco, bem como, os ácidos graxos poli-

insaturados (ômega-3 e 6) e os flavonoides são exemplos de antioxidantes exógenos. Estas moléculas possuem ação similar à apresentada pelos antioxidantes endógenos não enzimáticos, porém, são adquiridos através da alimentação e suplementação (ARUOMA, 1994; VAN HAAFTEN et al., 2003; AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; NIMSE; PAL, 2015).

As moléculas antioxidantes não enzimáticas, endógenas e exógenas, podem atuar de duas formas. A primeira, corresponde à ação de quebra de cadeia, ou do inglês *chain breaking*. A reação dos RLs com outras moléculas, geram RLs secundários, que por sua vez interagem com outras moléculas, formando RLs ainda mais reativos, esse tipo de reação em cadeia que ocorre na peroxidação lipídica, como visto Figura 20 (YOUNG; WOODSIDE, 2001; VAN HAAFTEN et al., 2003; LOBO et al., 2010). Esse processo propaga-se até que dois RLs regem entre si, formando um produto estável ou até que os RLs sejam neutralizados pelos antioxidantes, através da doação ou recebimento de elétrons (YOUNG; WOODSIDE, 2001; VAN HAAFTEN et al., 2003; LOBO et al., 2010).

FIGURA 20 - MODELO ESQUEMÁTICO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DO α-TOCOFEROL FRENTE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA



FONTE: Adaptado de FERREIRA; MATSUBARA (1997); LIMA; ABDALLA (2001); VAN HAAFTEN et al., (2003).

NOTA: Fase de iniciação - O ácido graxo poli-insaturado (AGPI) sofre ataque de ERs, como o radical hidroxila (OH•), que remove um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH_2 -), formando o radical lipídico e água; Fase de propagação: Em meio aeróbio, o radical lipídico se combina com o oxigênio (O_2) formando o radical peroxila, que por sua vez, pode remover um hidrogênio alílico de outro AGPI, o transformando em radical lipídico e se transformando em hidroperóxido lipídico; Fase de terminação: Os radicais formado anteriormente são capazes de produzir aldeídos por dismutação ou clivagem, de se unirem a resíduo de aminoácidos ou de formarem produtos secundários da peroxidação, por meio do rearranjo das suas ligações. O α-tocoferol (vitamina E) atua restaurando o AGPI através da doação de um hidrogênio, podendo ser restaurado através do sistema ácido ascórbico (vitamina C) e GSH

As moléculas com esta ação antioxidante geralmente são pequenas e hidrossolúveis (fase aquosa) ou lipossolúveis (fase lipídica). As de *fase aquosa*, atuam nos compartimentos celulares aquosos, como o citosol, as mitocôndrias e o núcleo, sendo o ácido ascórbico, o ácido úrico e o grupamento tiol da GSH, os mais importantes intracelularmente, enquanto que os grupamentos tiois presentes nas proteínas plasmáticas, como a albumina, importantes antioxidantes sanguíneos. As moléculas de *fase lipídicas* possuem grande importância na prevenção da peroxidação lipídica das membranas biológicas e lipoproteínas. A ubiquinol-10 (Q10 reduzida), o α-tocoferol (vitamina E, Figura 20), os carotenoides, como o β-caroteno, os flavonoides e outros compostos fenólicos, consistem de exemplares de antioxidantes de fase lipídica (YOUNG; WOODSIDE, 2001; VAN HAAFTEN et al., 2003; LOBO et al., 2010).

A segunda classe corresponde às moléculas ligadoras de metal de transição, como por exemplo as proteínas endógenas ferritina, transferrina, lactoferrina e ceruloplasmina, bem como substâncias exógenas farmacêuticas, como o ácido 2,3-dimercapto-l-propanosulfônico (DMPS, Dimaval®), ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA, Succimer®) e substância naturais, como os alginatos (polissacarídeos provenientes de algas) e os polifenóis vegetais. Estas moléculas atuam sequestrando íons metálicos do ferro e cobre, os tornando indisponíveis, para catalisarem a interação entre o H_2O_2 e O_2^-, nas reação de Haber-Weiss ou de Fenton, para formarem $^{\bullet}OH$ (YOUNG; WOODSIDE, 2001; VAN HAAFTEN et al., 2003; MICHALAK, 2006; LOBO et al., 2010; SEARS, 2013).

2.4.2.3 Plantas medicinais e a atividade antioxidante

Diversos produtos fenólicos sintéticos, como o butil-hidroxi-anisol (BHA) e o butil-hidroxi-tolueno (BHT), são empregados como antioxidantes nas formulações industriais, alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (MCCARTHY et al., 2001; RAMALHO; JORGE, 2006; LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009). O efeito do consumo destes compostos na saúde humano é ainda é bastante controverso (HETTIARACHCHY et al., 1996; MCCARTHY et al., 2001; LIU et al., 2015). Estudos demonstraram que estas moléculas, em altas concentrações, podem prejudicar a coagulação sanguínea, gerar danos ao DNA das células gastrintestinal, além, de poderem induzir tumores hepáticos e, devido a isso, em muitos países, o seu consumo é extremamente regulado (MCCARTHY et al., 2001; SASAKI et al., 2002; TAGHVAEI; JAFARI, 2015; LIU et al.,2015; MURAKAMI et al., 2015). Para minimizar e, futuramente,

evitar a utilização dos fenóis sintéticos, muitos estudos, relacionados aos produtos naturais, vem sendo realizados (MIGUEL, 2010; TAGHVAEI; JAFARI, 2015).

Os compostos fenólicos vegetais possuem diversos benefícios nutricionais (MIGUEL, 2010; BUBONJA-SONJE; GIACOMETTI; ABRAM, 2011; TAGHVAEI; JAFARI, 2015), além de terem demonstrado, em laboratório, potentes atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (KASOTE et al., 2015). A alta potencialidade é dada devido a estas moléculas atuarem como agentes doadores de hidrogênio ou elétrons (redutores), o seu complexo formado (radical/antioxidante) ser estável, o seu comportamento frente a outras moléculas antioxidantes e a sua alta atuação como quelantes de metais de transição (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; PEREIRA et al., 2009).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos vegetais é essencialmente determinada pelas suas características estruturais e pela sua composição que, geralmente, consiste de um ou mais anéis aromáticos contendo um ou mais grupamentos hidroxila. Estima-se, que a capacidade antioxidante dos fenólicos aumenta de acordo com o número de hidroxilas livres, como no caso dos ácido fenólicos, e das características das cadeias laterais, como aquelas compostas por mais anéis aromáticos (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; MIGUEL, 2010; MAQSOOD et al., 2014; KASOTE et al., 2015).

Os compostos fenólicos contendo duas hidroxilas adjacentes podem quelar íons de metais de transição, além de reagirem diretamente com os EROs (radicais hidroxila, peroxinitrito e ácido hipocloroso), através de redução, doação de hidrogênio ou quelação de $^1O_2$ (MICHALAK, 2006; MIGUEL, 2010; MAQSOOD et al., 2014). A presença de grupamentos hidroxilas nas posições 3′, 4′e 5′ no anel B em flavonoides (Figura 8), aumenta a atividade antioxidante, em relação aos compostos contendo somente uma hidroxila. Compostos fenólicos na forma de agliconas, ou seja, sem a porção glicídica, geralmente são antioxidantes mais eficazes do que os que estão na sua forma glicosídica correspondente. Por exemplo: luteolina e quercetina agliconas, são mais eficazes que seus correspondentes glicosilados (3-, 4- ou 7-o-glicosideos), em impedir a formação de hidroperóxidos na bicamada lipídica. Apesar do substancial poder antioxidante e quelante, certas conformações de múltiplas hidroxilas, podem atuar como pró-oxidantes, sendo este mais um fator importante para a caracterização e estudos dos compostos presentes nas plantas medicinais, bem como, naqueles vegetais consumidos diariamente (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; MICHALAK, 2006; MIGUEL, 2010).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os compostos fenólicos presentes nas inflorescências de *Musa paradisiaca* e nas partes aéreas de *Polygonum acre*, bem como avaliar as suas atividades antiparasitária e antioxidante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Artigo I: Ovicidal activity of polyphenol-rich extracts from inflorescences of *Musa paradisiaca* L.

- Obter os extratos vegetais através de extrações aquosas a quente e hidroetanólicas das inflorescências de *Musa paradisiaca*;
- Caracterizar quimicamente os extratos através de análises espectrocolorimétricas, cromatográficas (HPLC) e espectrométicas (MS);
- Analisar a atividade antiparasitária, *in vitro*, através do ensaio de eclodibilidade e de migração larval, utilizando ovos e larvas em estágio L3 de *H. contortus*, respectivamente.

3.2.2 Artigo II: Phytochemical characterization and antioxidant activities of extracts of *Polygonum acre* H. B. K.

- Obter os extratos vegetais através de extrações tradicionais, na forma de infusões, decocções e tinturas das partes aéreas de *Polygonum acre*;
- Obter extratos vegetais através de extrações laboratoriais aquosas a quente e hidroetanólicas das inflorescências de *Polygonum acre*;
- Caracterizar quimicamente os extratos através de análises espectrocolorimétricas, cromatográficas (HPLC) e espectrométicas (MS/MS);
- Analisar a atividade antioxidante *in vitro*, através dos ensaios de captação do radical ABTS, da redução do ferro (FRAP), e captação do ânion superóxido.

3.2.3 Short communication I: *In vitro* antioxidant activity of the phenolic compounds presents in the inflorescences of *Musa paradisiaca* L.

- Obter os extratos vegetais através de extrações aquosas a quente e hidroetanólicas das inflorescências de *Musa paradisiaca*;
- Caracterizar quimicamente os extratos através de análises espectrocolorimétricas, cromatográficas (HPLC) e espectrométicas (MS/MS);
- Analisar a atividade antioxidante *in vitro*, através dos ensaios de captação do radical ABTS, da redução do ferro (FRAP), e captação do ânion superóxido.

3.2.4 Short communication II: *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre* H. B. K.

- Obter os extratos vegetais através de extrações aquosas a quente e hidroetanólicas das partes aéreas de *Polygonum acre*;
- Caracterizar qualitativamente os extratos, através da marcha fitoquímica;
- Caracterizar quimicamente os extratos através de análises cromatográficas (HPLC);
- Analisar a atividade antiparasitária, *in vitro*, através do ensaio de eclodibilidade e de migração larval, utilizando ovos e larvas em estágio L3 de *H. contortus*, respectivamente.

ARTIGO I

Ovicidal Activity of Polyphenol-rich Extracts from Inflorescences of *Musa paradisiaca* L.

Submetido na revista *Veterinary Parasitology* (I.P. 2.422 - Qualis B2 - CBII) em maio de 2018.

Ovicidal Activity of Polyphenol-rich Extracts from Inflorescences of *Musa paradisiaca* L.

Melina Seyfried [a*], Vanessa Staldoni-Oliveira [a*], Andressa Soldera-Silva [a], Luciano Henrique Campestrini [a, b], Fernanda Bovo [c], Iara José Messias-Reason [c], Jonas Augusto Rizzato Paschoal [d], Selma Faria Zawadzki-Baggio [a], Marcelo Beltrão Molento [e], Juliana Bello Baron Maurer [a§]

[a] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, P.O. BOX 19046, 81531-900, Curitiba, PR, Brazil
[b] Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil (currently address)
[c] Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, 80060-900, Curitiba, PR, Brazil
[d] Department of Physics and Chemistry, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil
[e] Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, 80035-050, Curitiba, PR, Brazil
[*] These authors contributed equally to this work
[§] Corresponding author: Tel.: +55 41 33611576; Fax: +55 32662042.
E-mail address: jumaurer@ufpr.br
ORCID Identifier, 0000-0001-6235-331X

Abstract

Extracts from *Musa paradisiaca* inflorescences were chemically characterized and tested on ruminant parasite egg hatch (EHT) and larval migration (LMT) *in vitro* tests. The aqueous (EHW-I) and hydroalcoholic (EOH-I) extracts were analyzed by using colorimetric assays, high-performance liquid chromatography (HPLC), and electrospray tandem mass spectrometry (MS/MS). EHW-I and EOH-I had similar phenolic contents. However, EOH-I had increased flavonoid content compared to EHW-I. Both extracts presented low contents of condensed tannins. HPLC analysis showed that EHW-I contained phenolic acids (chlorogenic acid > coumaric acid > ferulic acid), other than rutin (glycosylated flavonoid). EOH-I contained rutin as the predominant compound. EHW-I and EOH-I showed an inhibitory effect on EHT, reaching almost 100% at a concentration of 1000 µg/mL. The concentrations that inhibited 50% (IC_{50}) of egg hatching were 62.58 and 137.79 µg/mL of EHW-I and ETOH-I, respectively. Based on the quantification data of phenolic and flavonoid compounds in the extracts, chlorogenic acid and rutin were selected for the EHT. Chlorogenic acid presented high ovicidal activity, with an IC_{50} of 17.55 µg/mL. Rutin, however, did not show any effect on egg hatching at the conditions tested. It can be inferred that chlorogenic acid may be a candidate with ovicidal activity. EHW-I and EOH-I did not affect the migration of third stage nematode larvae at the conditions tested, which may be related to the low tannin content. Results suggest that the inflorescences of *Musa paradisiaca* L. can be explored for the development of a plant-derived anthelmintic product for ruminants and other animals.

Keywords: Banana by-products, inflorescences, chlorogenic acid, rutin, *Haemonchus contortus*, egg hatch test.

1. Introduction

World production of ruminant is economically affected by gastrointestinal parasite infections (Kumarasingha et al., 2016). One of the most important gastrointestinal nematode parasites that affects livestock production is *Haemonchus contortus*. This hematophagous parasite can cause severe anemia, which contribute to the reduction in weight gain and in more severe infections can cause death of the animals (Kumarasingha et al., 2016). Currently, conventional parasite control depends almost exclusively on the regular use of large spectrum anthelmintic products. However, such treatments present major disadvantages, such as the development of resistant parasite populations, risk of environmental pollution, high costs, and reduction in livestock production, in addition to the non-availability of these medicines in some developing countries (Fortes and Molento, 2013).

The treatment of parasite infections in livestock and humans by using natural plant extracts has long been practiced. This therapeutic approach may offer possible alternatives that may both be sustainable and environmentally acceptable (Athanasiadou et al., 2007; Molento, 2009; Pavela and Benelli, 2016). Classes of secondary metabolites, such as terpenoids (essential oils) and polyphenols (phenolic acids, flavonoids, and condensed tannins) are sources of chemical components responsible for the broad therapeutic effects of several medicinal plants, including anthelmintic activity (Molan et al., 2002, Hoste et al., 2015). *In vitro* tests serve as a preliminary step for the validation of novel extracts, as they allow the characterization of active compounds present in plants and the evaluation of their biological properties (Pavela and Benelli, 2016).

Musa paradisiaca L., a plant from the Musaceae family, is a large shrub that grows in tropical countries, and its fruits are known as bananas (Padam et al., 2012). Parts of the plant, including peels, leaves, pseudostem, and inflorescence, have various applications. They serve as alternative sources of macronutrients and micronutrients; they are also used in nutraceuticals and livestock feed, as natural fibers, and as sources of natural bioactive compounds (Padam et al., 2012). In this present study, we selected the inflorescences of *Musa paradisiaca* L. as a source of bioactive compounds, taking into account our preliminary phytochemical screening data and its potential for commercial use as a crop residue (Bovo et al., 2013; Padam et al., 2012).

Many studies have identified and characterized metabolites in *M. paradisiaca* inflorescences, including phenolic compounds such as flavonoid-like quercetin, epicatechin, (Nisha and Mini, 2013), anthocyanins (Pazmiño-Duran et al., 2001), tannins (Mahmood et al.,

2011), terpenoids, such as tetracyclic triterpenoids (Dutta et al., 1983), saponins, steroids (Mahmood et al., 2011), alkaloids (Mahmood et al., 2011), and phenolic acids, such as gallic acid (Nisha and Mini, 2013). However, studies on the quantitative analysis and characterization of phytochemicals in the extracts of *M. paradisiaca* inflorescences are limited.

The majority of studies have evaluated the anthelmintic activity of the plant extracts based on qualitative data of various classes of metabolites using techniques such as phytochemical screening. Quantitative studies on the components are, however, lacking (Athanasiadou et al., 2007; Kumarasingha et al., 2016; Pavela and Benelli, 2016). For example, the aqueous extracts of the leaves, stems, and inflorescences of *Musa* sp showed high efficacy in the inhibition of egg hatching (IC_{50} =190 µg/ml) (Nogueira et al., 2012). The phytochemical qualitative tests showed that all the mentioned extracts had flavonoids, saponins, and condensed tannins, which are considered to be anti-parasitic compounds. However, the authors did not conclude which components could be responsible for the presented activity. Recently, Díaz et al. (2017) demonstrated that chlorogenic acid, present in the extracts of *T. filifolia*, is one of the phenolic compounds responsible for the ovicidal activity against important parasites that affect sheep.

The present study aimed to analyze the anthelmintic effect of chemically characterized polyphenol-rich extracts from *M. paradisiaca* inflorescences on *in vitro* egg hatch and larval migration tests. We have also tested the isolated compounds; chlorogenic acid and rutin with the same methodology.

2. Material and methods

2.1 Chemicals and reagents

Coumaric acid, chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, sinapic acid, syringic acid, epicatechin, quercetin, and rutin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol-grade HPLC was obtained from JT Baker (Xalostoc, Mexico). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified using an ultra-purifier MS 2000 model from Gehaka (Sao Paulo, SP, Brazil). Ivermectin (Ivomec 1% w/v, Merial Limited, Duluth, GA, USA) and Albendazole sulfoxide (Ricoben 13.6% w/v, Noxon Limited, Cravinho, SP, Brazil). Folin-Ciocalteu reagent was obtained from Chromate (Sao Paulo, SP, Brazil). All other reagents were of analytical grade.

2.2 Plant material and preparing of aqueous and hydroalcoholic extracts of the inflorescences

The *M. paradisiaca* L. inflorescences were collected in Maringa, (Parana State, Brazil). The plant was botanically identified, and a voucher specimen (number: 367379) were retained at the Municipal Botanical Museum of Curitiba.

Fresh inflorescences (40 g) were cut into small pieces (2 × 2 cm) and ground using a blender (Philips Walita Co, Varginha, MG, Brazil) in water (100 mL) for 10 min. The mixture was then placed in a water-bath for 60 min at 70 °C. The aqueous extract, designated EHW-I, was vacuum filtrated, concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C, freeze-dried, and stored at - 4 °C in the dark. For preparing the hydroalcoholic extract, fresh plant material (40 g) was mixed with aqueous ethanol 70% (v/v) (100 mL). After 10 min of grinding and stirring, the mixture was poured into glass beakers and stored at 25 °C, in the dark, for 10 days. The extract, designated EOH-I, was vacuum filtrated, concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C, freeze-dried, and stored at - 4 °C in the dark. Yields, calculated in relation to the plant fresh mass, were 1.8 and 2%, respectively for EHW-I and EOH-I.

2.3 Colorimetric methods

The total phenol contents were determined using a microassay and the Folin–Ciocalteu reagent, which was adapted from Singleton and Rossi Jr., (1965). The calibration curve was prepared using gallic acid (GA) as a standard. The flavonoid content was determined by the aluminum chloride method (Vennat et al., 1992), using rutin (RUT) as a standard. Condensed tannin (CT) content was determined by the sulfuric-vanillin method (Queiroz et al., 2002). The results are expressed as μg epicathecin equivalents (EPI) per mg dry extract.

2.4 High-performance liquid chromatography analysis

The phenolic analysis was conducted using an Agilent 1200 Series high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Co., St. Clara, CA, USA) equipped with a vacuum degasser (G1322A), quaternary pump (G1311A), manual injector (Rheodyne, 7725i), and a multi UV-VIS wavelength detector (G1365D) operating at a wavelength of 254 nm, using

an Agilent Eclipse XDB-C-18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size). The mobile phase used was water:trifluoroacetic acid (TFA; 0.1%) (A) and methanol:TFA (0.1%) (B) set with the following gradient: 0–10 min 40% B, 10–22 min 60% B, 22-28 min 30% B, 28-30 min 40% B at a flow rate of 1 mL/min (Pavei et al., 2010). The standards were prepared individually in methanol at a concentration of 100 μg/mL. Twenty microliters of the sample were injected through a manual injector. The samples were diluted in methanol:water (1:9 v/v) at a concentration of 5 mg/mL and filtered through a 0.22-μm membrane filter (JetBiofil, Guangzhou, China) prior to injection. The phenolic compounds were identified by comparing their retention times with standards. Sensitivity parameters of the analysis, limits of detection (LOD), and limits of quantification (LOQ) were calculated for rutin and chlorogenic acid based on the standard deviation of the areas in sextuplicate of the minimum detectable concentration. The EZChrom Elite program via Windows 7 was used for system control and data analysis.

2.5 Mass spectrometry analysis

The tandem mass spectrometry (MS/MS) system used for quantitative analysis was a Quattro LC triple-quadrupole (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-electrospray (ESI) interface operating in positive-ion modes. The temperatures of the source block and the desolvation gas were set at 100°C and 350°C, respectively. Nitrogen was used as both the desolvation (nearly 360 L/h) and the nebulizer (nearly 40 L/h) gas, whereas argon was used as the collision gas. The voltages used in the ESI source during the analysis were 20 V for the cone, 3 kV for the capillary, and 4 V for the extractor. Ion detection was carried out in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, using a collision energy range of 15–25 eV. The analytical data were processed by MassLynx software (Micromass, Manchester, UK). The target analytes were chlorogenic acid, ferulic acid, and rutin. Identification of these compounds was carried out based on mass spectra and by comparing the results with reference compounds from the literature (Jong et al., 2006, Horai et al., 2010).

2.6 In vitro anthelmintic activity

Prior authorization for the use of laboratory animals was obtained from the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Parana (n° 065/2015).

2.6.1 Egg Hatch Test

The egg hatch test (EHT) was performed using the methodology described by Coles et al. (1992) adapted by Bizimenyera et al. (2006). Eggs were recovered from the feces of sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. Fecal culture analysis showed *H. contortus* as the predominant nematode (95%) species. The feces were homogenized in water at 30 ºC and were filtered successively through decreasing sieve sizes of 1 mm, 150, 75, 56, and 25 µm. The eggs that were retained in the final filter were collected and centrifuged for 2 min at 140 x g. The supernatant was removed, and sucrose solution (0.9 M, d = 0.375 g/mL, 25 °C) was added. In this condition, the eggs floated and any unwanted waste precipitated in the tube, allowing their easy collection through the use of a Pasteur pipette. The eggs obtained from this process were transferred to a plastic 12-mL tube and were, again, washed with distilled in warm water, to remove the sucrose, and re-suspended in distilled water. The material was then centrifuged (1 ×) for 2 min at 140 x g. Supernatants (eggs) were put together and subsequently washed with distilled water (2 ×) and centrifuged at the same conditions, as described before, to collect the clean eggs. The egg concentration was counted via an optical microscope (SM-LUX model, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Germany). The egg suspension was distributed into 24-well plates (100 eggs/well) and then mixed with the plant extract prepared in distilled water at final concentrations of 25, 50, 100, 500, 1000, 1500, and 2000 µg/mL, in a total volume of 1 mL. Test samples for the negative control (distilled H_2O) and a positive control (Albendazole sulfoxide, 10 to 1000 µg/mL final concentrations) were obtained in parallel. Following this, the plates were maintained in a BOD-type incubator (Biological Oxygen Demand, Eletrolab, Sao Paulo, Brazil) at 25 °C for 24 h. Egg hatch was blocked by the addition of Lugol's iodine solution, which also facilitated the readings using an inverted microscope (INV 100 model, Bel Engineering, Monza, Italy). The number of eggs and first stage larvae per well was determined. Three experiments with three replicates for each concentration and control were performed. The results are expressed as percentages of inhibition of egg hatch, determined by the formula: (number of eggs / (number of eggs + number of L1) × 100, considering (L1) = L1 larvae; (eggs) = eggs not hatched.

Photos of eggs and larvae were taken using an inverted microscope Axiovert 40 CLF microscopy (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.6.2 Larval migration test (LMT)

The effect of the plant extractions on the migration of third stage larvae (L3) of helminths was determined using the method described by Molento and Prichard, (2001) modified by Demeler et al., (2010). For this experiment, larvae L3 of *H. contortus* (95%, until 30-day old) were incubated with a solution of 0.3% (v/v) of sodium hypochlorite for 1 h at 25 °C, in order to remove the cuticle. After that, they were washing (3 x) with distilled water and were quantified and distributed into 24-well plates (200 larvae/well). The plant extracts with a final concentration of 25, 50, 100, 500, 1000, 1500, and 2000 µg/mL, were prepared as previously described, and added into the plates and incubated in a BOD at 25 ºC for 6 h. Tests using a negative control (distilled water) and a positive control (Ivermectin at 100 µg/mL final concentration) were performed in parallel. After the first incubation, the material was transferred to plates with apparatus containing a mesh size 22 µm nylon membrane, and incubated at the same conditions, but with a source of light (150 Watts) situated bellow to the plates to stimulate L3 migration. After 18 h, the apparatus was removed, and the L3 that migrated were counted using an inverted microscope. The L3 that did not migrate were also counted. Three experiments with three replicates for each concentration and control were performed. The average number of L3 that migrated, for each tested concentration, was transformed into the percentage of migration.

2.7 Statistical Analysis

The results of the phytochemical quantitative measurements were subjected to One-Way analysis of variance (ANOVA), followed by post-hoc Fisher's LSD multiple comparison tests for comparison of the mean. Results are expressed as mean ± standard deviation (± SD) of at least three experiments. The values were considered statistically significant if the level of significance was $p \leq 0.05$.

The results of the EHT and LMT tests were analyzed by t test or One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test by using the program GraphPad Prism 5. The differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. The concentrations of the extract that inhibited 20, 50, and 90% of egg hatching, expressed as IC_{20}, IC_{50}, and IC_{90}, were calculated using linear equations ($R^2 \geq 0.95$) obtained by linearizing the activity curves by using the program GraphPad Prism 5.

3. Results and discussion

3.1 Chemical characterization of M. paradisiaca inflorescence extracts

Table 1 shows the results for the quantitative analysis of phenolics, flavonoids, and CT of the EHW-I and EOH-I. The phenolic contents of the *M. paradisiaca* inflorescence extracts (35 and 26 mg GA equivalent/g dry sample for EHW-I and EOH-I, respectively) were higher than those reported for the extracts of the other parts of the species, such as the fruit aqueous extract (0.94 mg GA equivalent/g dry extract) (Shodehinde and Oboh, 2013) and the pseudostem methanolic extract (12 mg GA equivalent/g dry extract) (Loganayaki et al., 2010).

Table 1. Chemical data of the aqueous (EHW-I) and hydroalcoholic (EOH-I) extracts obtained from the inflorescences of *Musa paradisiaca*.

	EHW-I	EOH-I
Yield (%) [1]	1.9	1.8
Phenolic (mg GA/g dry extract) [2]	35 ± 6.9^{a}	26 ± 5.4^{a}
Flavonoid (mg RUT/g dry extract) [3]	3 ± 0.9^{b}	25 ± 0.3^{c}
Condensed tannins (mg EPI per g dry extract) [4]	0.8 ± 0.005^{c}	2 ± 0.004^{e}

[1] Calculated as dried weight in relation to the original material. [2] Determined according to Singleton and Rossi Jr. (1966); expressed as gallic acid equivalents (GA). [3] Determined according to Vennat et al. (1992); expressed as rutin acid equivalents (RUT). [4] Determined according to Queiroz et al. (2002); expressed as epicatechin equivalents (EPI). Values are expressed as mean ± SD of three assays. Different letters in each column represent significant difference between the samples by Fisher LSD test ($p \leq 0.05$).

The content of flavonoids in EOH-I (25 mg RUT equivalent/g dry sample) was significantly higher than that in EHW-I (3 mg RUT equivalent/g dry sample), as expected, since the mixture of ethanol and water is more efficient in extracting flavonoids. The content of flavonoids as described in the literature for *Musa* sp, varies according to the type of extraction and the type of plant material used. For example, the flavonoid contents were 0.73 mg quercetin equivalent / g dry extract and 75 mg of RUT equivalent/g dry extract, for aqueous and methanolic extracts from the pulp and peel of the fruit, respectively (Shodehinde and Oboh, 2013; Singhal and Ratra, 2013). The content of CT was 0.8 and 2 mg EPI equivalent/g dry extract for EOH-I and EHW-I, respectively. There are no reports regarding the quantification of CT in the inflorescence extracts, but by comparing the values described for other parts of the plant (*Musa* sp), such as the fruit (3.7 to 25.9%) and leaves (2.54%), it can be inferred that EHW-I (0.08%) and EOH-I (0.2%) had a low content of CT (Bennett et al., 2010; Marie-Magdeleine et al., 2014).

Figure 1 shows the HPLC profile of the phenolics in *M. paradisiaca* inflorescence extracts. Comparison between the retention times of the standard peaks with the retention times of the peaks of the extracts led to the identification of phenolic acids: chlorogenic acid (present in EHW-I), coumaric acid (present in EHW-I), ferulic acid (present in EHW-I), and sinapic acid (present in EOH-I), and flavonoids: rutin (present in both extracts). The identification of other unnamed peaks was not possible because their retention points did not match any of the standards used. LOD and LOQ values were 0.55 and 1.67 μg/mL for rutin and 0.61 and 1.85 μg/mL for chlorogenic acid. The concentration of the phenolic and flavonoid compounds in the extracts was calculated using the equation obtained from the standard curves for rutin and chlorogenic acid (Table 2). The identification of phenolic acids and flavonoids was based on ESI-MS/MS analysis, using data such as the molecular ion (MI) and the fragmented ions (FI) observed in MS/MS spectra described in the literature (Jong et al., 2006, Horai et al., 2010). The presence of chlorogenic acid ($[M + H]^+ = 355$, for MI), rutin ($[M + H]^+ = 611$ and 303, for MI and FI, respectively), and ferulic acid ($[M + H]^+ = 195$ and 177, for MI and FI respectively) was also suggested by ESI-MS/MS analysis.

The phenolic compounds identified in the *M. paradisiaca* inflorescences, such as rutin, chlorogenic acid, ferulic acid, coumaric acid, and sinapic acid (Fig. 2), are commonly found in fruits, vegetables, and cereals, and have numerous beneficial health effects (Yang et al., 2008; Tajik et al., 2017). These beneficial health effects are associated with their antioxidant properties (Crozier, 2010). The consumption of plant-based foods rich in nutrients and active compounds has been associated with a lower incidence of chronic disease in humans (Crozier, 2010). In the case of livestock nutrition, it has been proposed that the consumption of plant-based food or the addition of bioactive compounds to animal diet can be an alternative approach for the improvement of animal health and for anti-parasitic activity within the gastrointestinal system (Hoste et al., 2015). In addition, it has been speculated that the anthelmintic activity of plant extracts against nematodes may be attributable to the presence of phenolic compounds, especially CT (Molan et al., 2002; Athanasiadou et al., 2007). The overall action of the extracts is considered to be a sum of the activities of their constituents (Adedapo et al., 2005). Recently, Díaz et al. (2017) have demonstrated that chlorogenic acid, present in the extracts of *T. filifolia*, is one of the phenolic compounds responsible of the ovicidal activity against *H. contortus*.

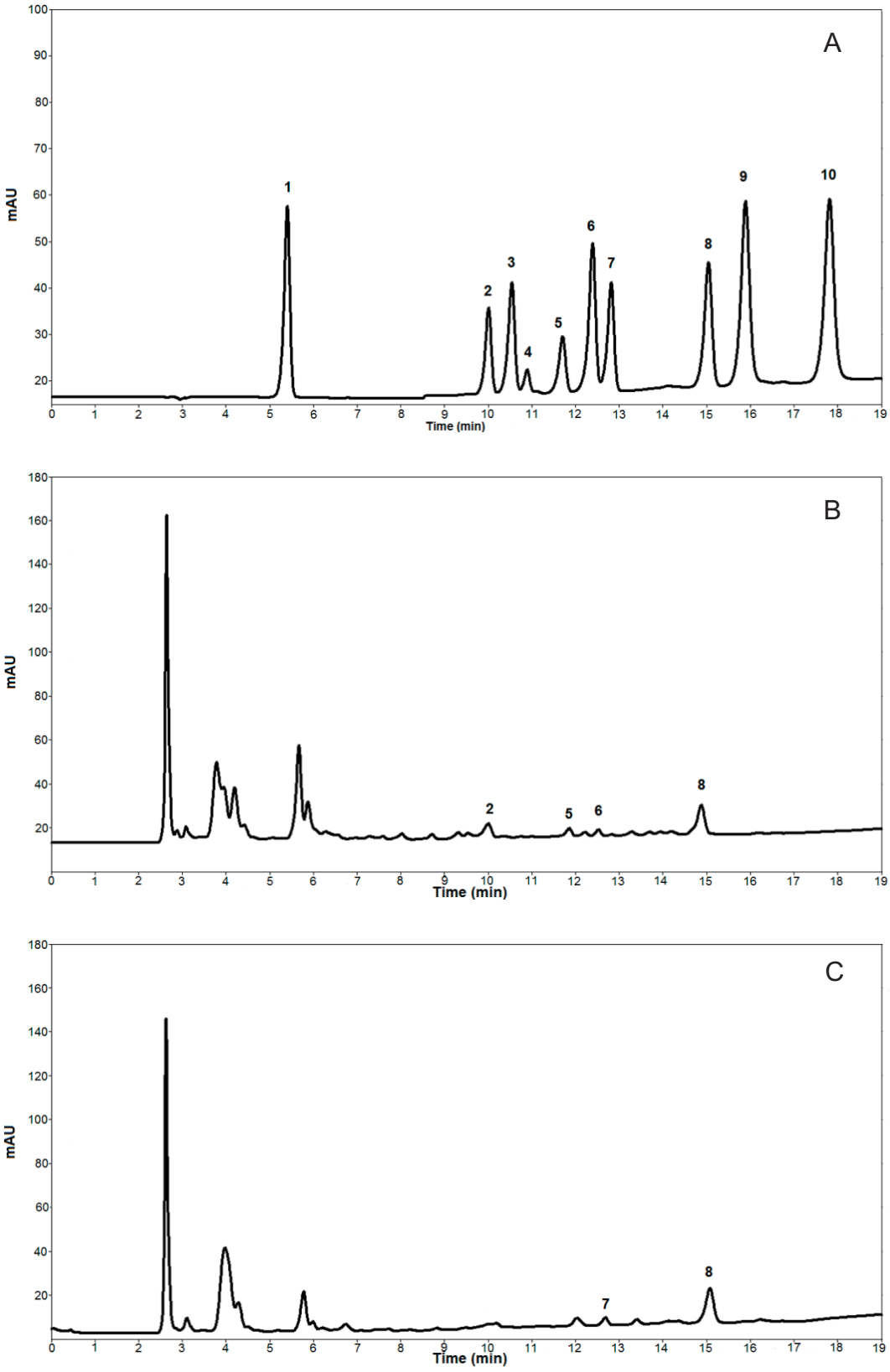


Fig. 1. HPLC profile at 254 nm of phenolic standards (A), of the aqueous (EHW-I) (B) and hydroalcoholic (EOH-I) (C) extracts obtained from the inflorescences of *Musa paradisiaca*.
Phenolic standards: (1) gallic acid; (2) chlorogenic acid; (3) syringic acid; (4) epicatechin; (5) coumaric acid, (6) ferulic acid, (7) sinapic acid, (8) rutin, (9) myricetin, (10) quercetin.

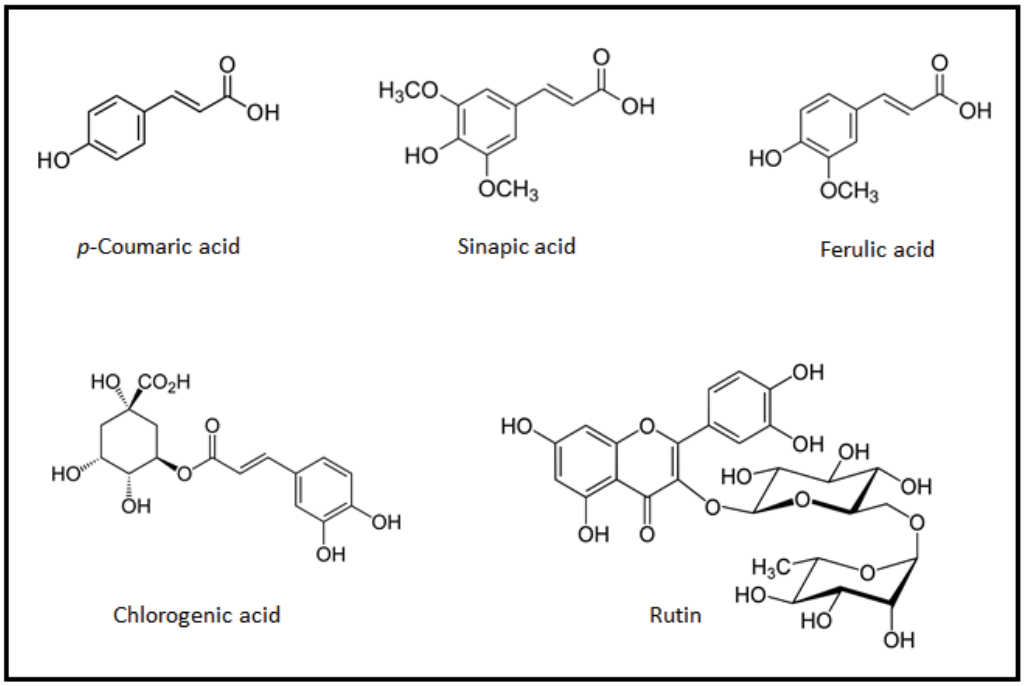


Fig. 2 Structures of phenolic compounds identified by HPLC of *Musa paradisiaca* inflorescences. *p*-Coumaric acid, sinapic acid, ferulic acid and chlorogenic acid are phenolics acids. Rutin is a flavonoid.

Table 2. Quantification of phenolic and flavonoid compounds in the aqueous (EHW-I) and hydroalcoholic (EOH-I) extracts obtained from the inflorescences of *Musa paradisiaca*.

Phenolic acids or flavonoids (µg/mg dry extract)	EHW-I	EOH-I
Chlorogenic acid	0.8 ± 0.04	-
Coumaric acid	0.17 ± 0.63	-
Ferulic acid	0.16 ± 0.58	-
Sinapic acid	-	0.21 ±0.14
Rutin	1.00 ± 0.067[a]	2.35 ± 0.08[a]

Data are presented as mean ± SD of three analyses. Different letters in each column represent statistically significant differences between samples by Fisher LSD test ($p \leq 0.05$). (-) = not detected. The quantification of chlorogenic acid, coumaric acid, ferulic acid and synaptic acid were calculated in relation to the standard curve of chlorogenic acid; and the concentration of rutin was calculated in relation to the curve of rutin.

3.2 Egg hatch activity

EHW-I and EOH-I extracts showed a dose-dependent inhibitory action (Fig. 3A, a and 3B, b). Egg hatch inhibition increased to close to 100% at the highest concentrations tested (1000 to 2000 µg/mL). The control groups, negative (H_2O) (7.4%) and positive control (albendazole sulfoxide, 10 to 1000 µg/mL) presented different results with respect to egg hatch inhibition. In the case of the group treated with a commercial anti-anthelmintic, which was used

as the positive control, all the concentrations tested the egg hatch inhibition was higher than 95% (Fig. 3D).

The concentrations of EHW-1 that could inhibit the hatching of eggs of *H. contortus* by 20, 50, and 90% (IC_{20}, IC_{50}, and IC_{90}) were 7.99, 62.58, and 972.98 µg/mL, respectively (Fig. 3a and 3b). ETOH-I presented an IC_{20}, IC_{50}, and IC_{90} of 34.89, 137.79, and 860.26 µg/mL, respectively. Figure 4 shows the general aspects of the eggs and/or larvae. It can be observed that, with the increase of the concentrations of the vegetal extracts tested, there was an increase in the number of eggs that did not hatch in 24 hours of incubation (Figure 4 A-D), being that in the two highest concentrations tested (Figure 4C and 4D), the eggs remained in the morphed stage. This profile is different from that presented by the positive control (Figure 4 E and 4 F), which most eggs that did not hatch in 24 h incubation remained in the larval stage. The literature data concerning the effect of *Musa* sp extracts on egg hatch inhibition are contradictory. Some authors reported no significant activity (Marie-Magdeleine et al., 2014), which is different from the results reported by others who described a high efficacy for the aqueous extracts in egg hatch inhibition, with an IC_{50} = 190 µg/mL and IC_{90} = 840 µg/mL (Nogueira et al., 2012). In addition, the quantitative information concerning the bioactive compounds was also insufficient to identify the compound(s) that were attributable to the tested activity.

Several reports suggest that the anthelmintic activity of plant extracts, such as quebracho (*Schinopsis* sp.) and various forage species (*Lotus pedunculatus*, *Lotus corniculatus*, *Onobrychus viciifolia*, *Rumex obtusifolius*), is related to their content of CT (Molan et al., 2002; Athanasiadou et al., 2007). In the present study, the tested extracts, EHW-I and EOH-I, presented 0.08 and 2% of CT, respectively, which was considerably less in comparison to the results reported for the aqueous extracts of quebracho bark, which contained 73% of CT (Athanasiadou et al., 2007), suggesting that other chemical constituents were responsible for the ovicidal activity of *M. paradisiaca*.

Considering the data for phenolic and flavonoid compounds in EHW-I and EOH-I, chlorogenic acid and rutin were selected to be tested in the *in vitro* anthelmintic tests (Fig. 2C). Figure 2C shows the efficacy of chlorogenic acid against egg hatch inhibition, with IC_{20} = 3.55 µg/mL, IC_{50} = 17.55 µg/mL, and IC_{90} = 147.52 µg/mL. In contrast, rutin (glycosylated flavonoid) did not show any effect in the EHT, at the conditions tested.

Chlorogenic acid, a polyphenol compound, is a bio-active component that is usually present in plant extracts with a high egg hatch inhibitory activity, according to Díaz et al. (2017). In the cited study, the methanolic extract of the aerial parts of *T. filifolia* showed a dose-dependent activity against the eggs of *H. contortus*, reaching 99% at its highest concentration

(10 mg/mL after 48 h of incubation). The analysis of this extract demonstrated the presence of quercetagitrin - a glycosylated flavonoid, methyl clorogenate, chlorogenic acid, and an analog of the unidentified chlorogenic acid. Among the tested compounds, only chlorogenic acid presented significant activity, showing 100% egg hatch inhibition (500 µg/mL after 48 h of incubation; IC_{50} = 248 µg/mL). Similar to quercetagitrin (Díaz et al., 2017), another glycosylated flavonoid, rutin, had no considerable activity against egg hatch inhibition.

The nematocidal activity of chlorogenic acid has been described against *Pratylenchus scribneri* (grass nematode) and *Caenorhabditis elegans* (free-living nematode). However, the mechanism of the nematocidal or ovicidal activities needs to be elucidated. Some possibilities could be speculated through consideration of its properties described in other biological tests, for example, as an inhibitor of enzymes (Tajik et al., 2017). Thus, the mechanism could involve the inhibition of the so-called "hatching enzymes" which include proteases, lipases, glycosidases, and leucine aminopeptidases, and cyclic AMP-dependent protein kinase (Rogers and Brooks, 1977).

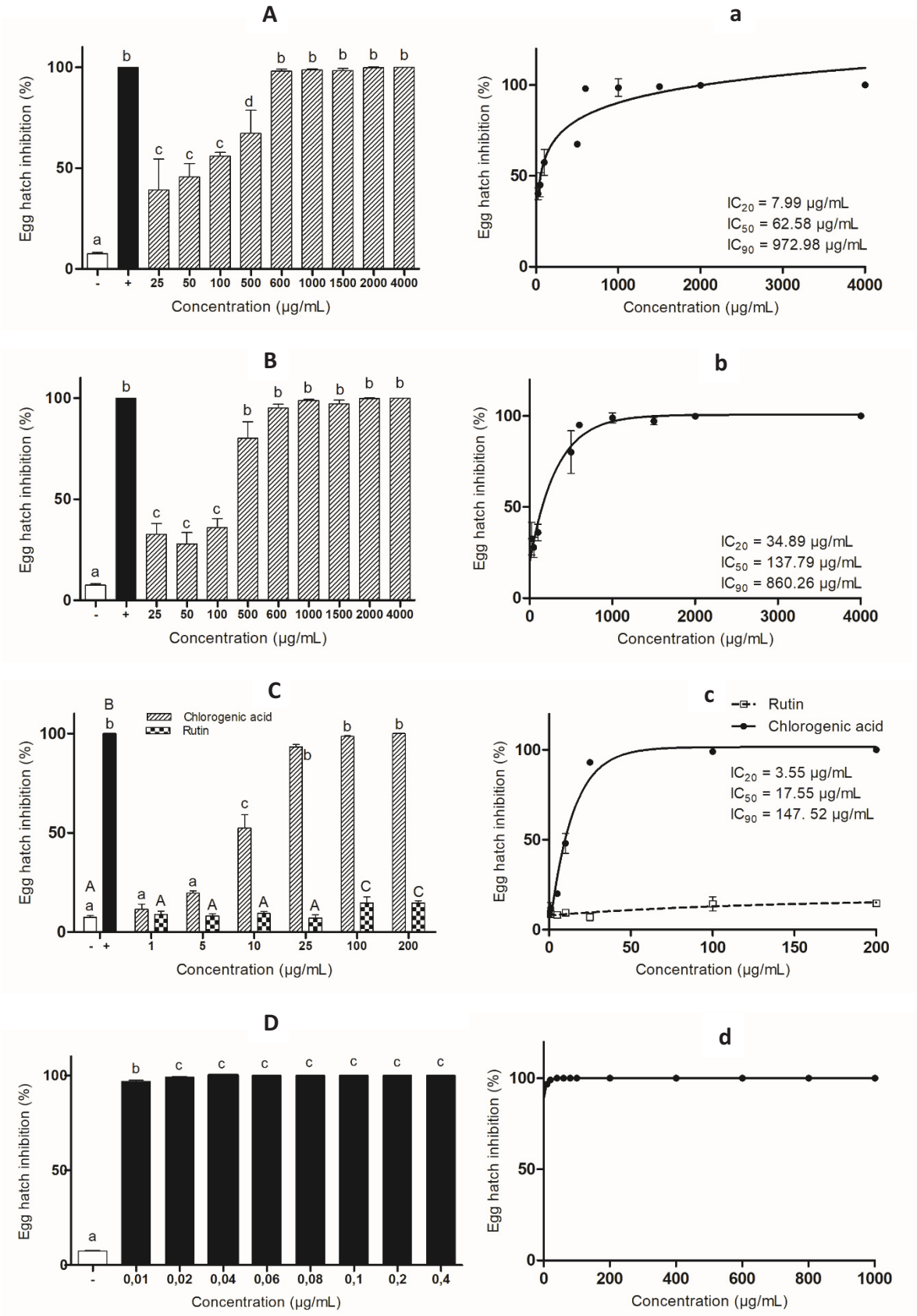


Fig. 3. Egg hatch inhibition and IC determination of the aqueous (EHW-I) (A, a), hydroalcoholic (EOH-I) (B, b) extracts obtained from the inflorescences of *Musa paradisiaca*, phenolic commercial standards (chlorogenic acid and rutin) (C, c) and albendazole sulfoxide (D, d) using the Egg Hatch Test.

(-) H_2O; (+) Albendazole (60 µg/mL). Different letters in each column represent significant difference compared to negative control (H_2O) determined using Tukey's and t test ($p \leq 0.05$).

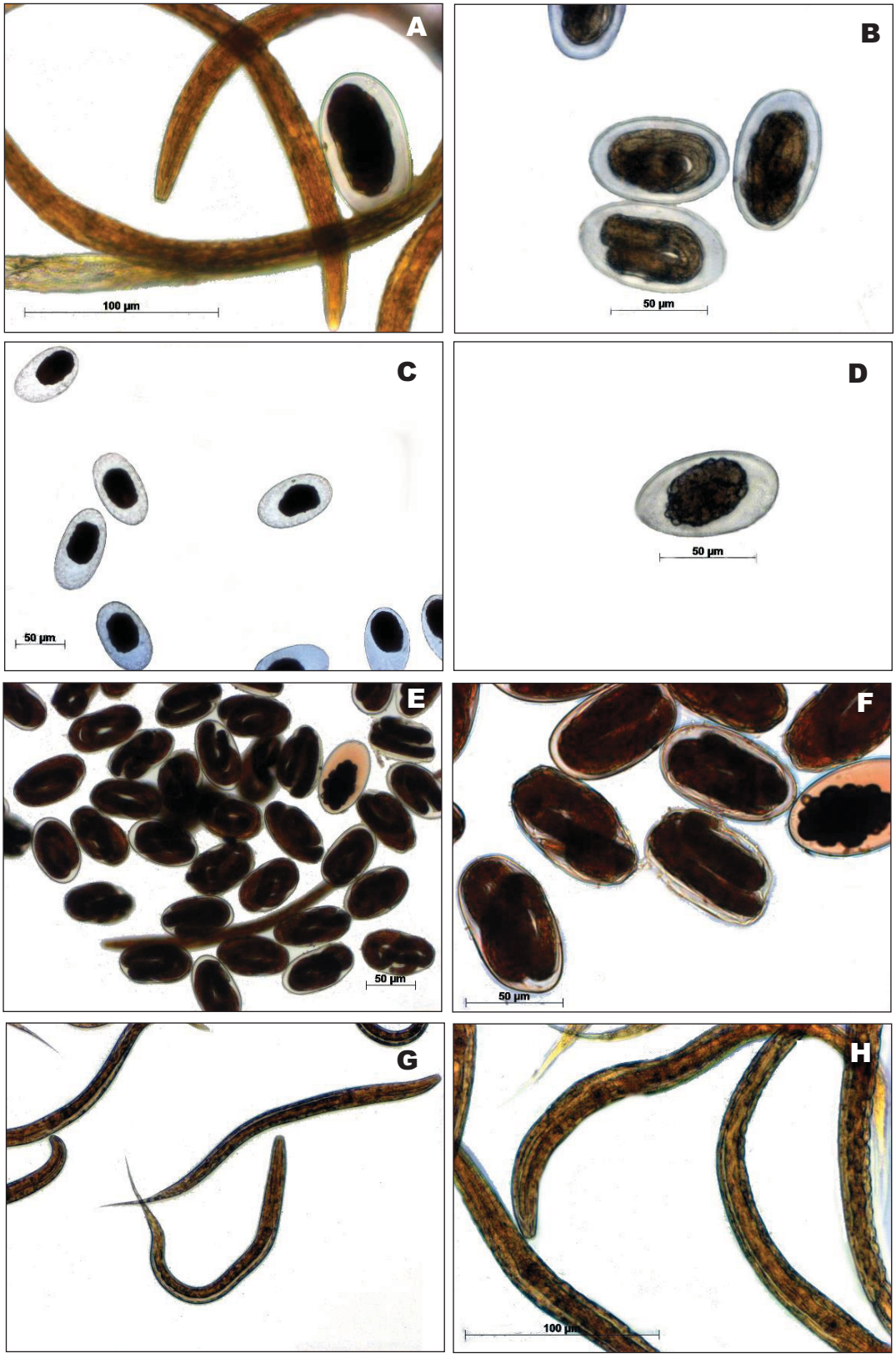


Fig. 4. General aspects of eggs and larvae on the Egg Hatch Test.
A - EHW-I (100 µg/mL, 40x magnification); B - EHW-I (600 µg/mL, 40x magnification); C - EHW-I (1000 µg/mL, 40x magnification); D - ETOH-I (1000 µg/mL, 20x magnification); E - Albendazole (60 µg/mL) (20x magnification); F - Albendazole (60 µg/mL) (40x magnification); G - Negative control (H_2O) (20x magnification); H- - negative control (H_2O) (40x magnification).

3.3 Larval migration test

EHW-I and EOH-I did not affect L3 motility at the concentrations tested (Fig. 5). The percentages of L3 migration calculated for the tested extracts were similar to those calculated for the negative control (H_2O). As expected, in the negative control, 92.27% of the larvae migrated (Fig. 5). For the positive control group (Ivermectin, 100 µg/mL), where the migration inhibition approximately was 82% of the larvae occurred.

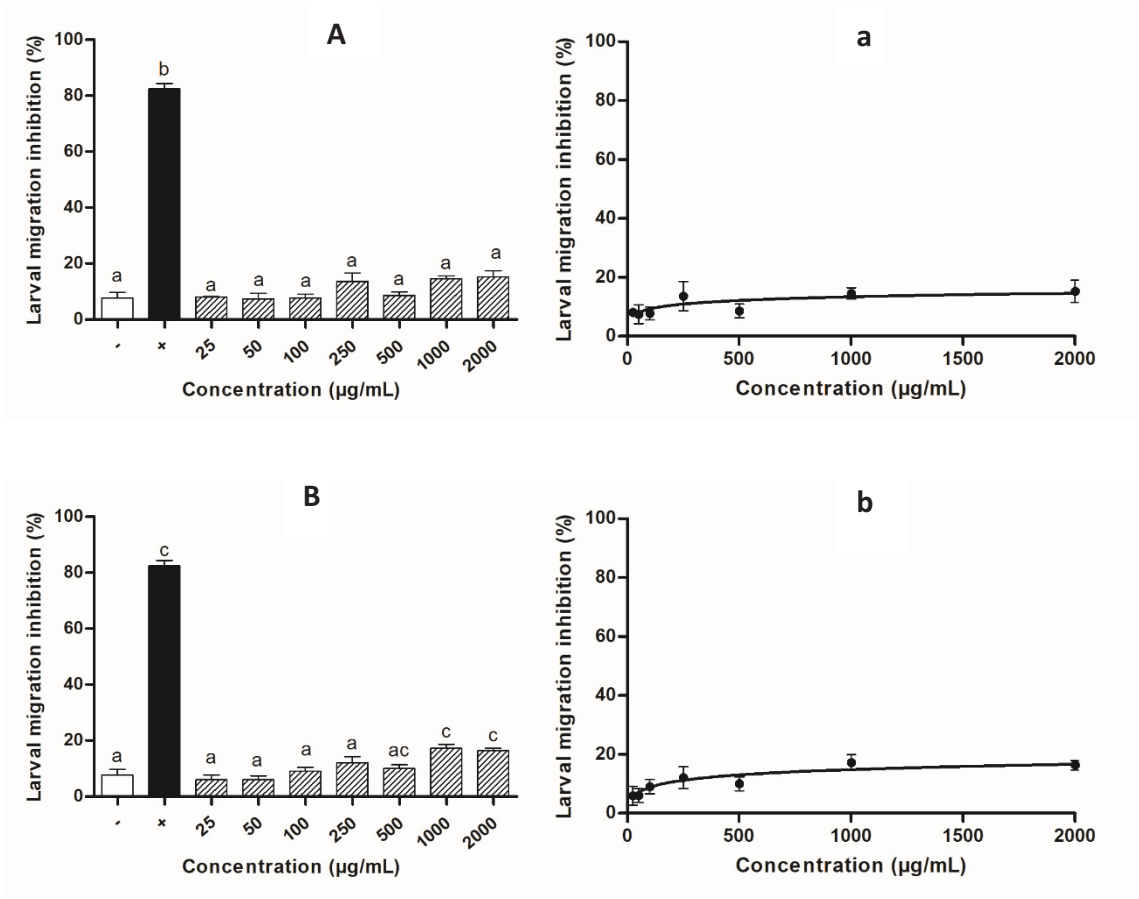


Fig. 5. Larval migration inhibition and IC determination of the aqueous (EHW-I) (A, a) and hydroalcoholic (EOH-I) (B, b) extracts obtained from the inflorescences of *Musa paradisiaca* on the Larval Migration Test. (-) H_2O; (+) Ivermectin (100 µg/mL). Different letters in each column represent significant difference compared to negative control (H_2O) determined using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

The extracts of the leaves and stems of *M. paradisiaca*, with low-tannin content, also showed no significant effects against the migration of L3 from *H. contortus*, presenting a similar activity as the negative control. However, these extractions could suppress the development of L3 of *H. contortus* from L1 to L3, in a dose-dependent manner (300 and 2400 µg/mL) (Marie-Magdeleine et al., 2014).

The use of characterized extracts that show correlation of their activity with isolated plant compounds is a relevant approach that contribute to the development of well designated

products with therapeutic potential. The inflorescences of *M. paradisiaca* L. can be explored as a banana by-product for the development of plant-derived anthelmintic products.

4. Conclusions

We have demonstrated that the ovicidal activity of extracts with a low content of CT is related to the presence of phenolic acids, which is different from that reported for the larvicidal activity, in which the tannin content appears to be relevant. In addition, the glycosylated flavonoids did not affect the egg hatch, although it is interesting to note that the use of different models of anthelmintic activity; such as migration and development of L3 and adult larvae, may be applied for a better understanding of the effect of isolated plant compounds.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

The authors wish to thank the Brazilian Agencies for the fellowships granted to V. Staldoni-Oliveira (CNPq), M. Seyfried (CAPES) and A. Soldera-Silva (CAPES). We also wish to acknowledge Fundação Araucária/CAPES and Fundação Araucária for the fellowships granted to F. Bovo and L. H. Campestrini, respectively. This work did not receive any specific grant from funding agencies in the public or private sectors.

References

Adedapo, A.A., Shabi, O.O., Adedokun, A.O. 2005. Anthelmintic efficacy of the aqueous crude extract of *Euphorbia hirta* Linn in Nigerian dogs. Vet. Archiv. 75(1), 39-47.

Athanasiadou, S., Githiori, J., Kyriazakis, I. 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. Animal 1(9), 1392-1400.

Bennett, R.N., Shiga, T.M., Hassimotto, N.M.A., Rosa, E.A.S., Lajolo, F.M., Cordenunsi, B.R. 2010. Phenolics and antioxidant properties of fruit pulp and cell wall fractions of postharvest banana (*Musa acuminate Juss*.) cultivars. J. Agric. Food Chem. 58(13), 7991-8003.

Bizimenyera, E.S., Githiori, J.B., Eloff, J.N., Swan, G.E. 2006. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. Vet. Parasitol. 142, 336-343.

Bovo, F., Messias-Reason, I.J., Maurer, J.B.B., Zawadzki-Baggio, S.F., Perez, E., Andreazza, I.F. 2013. Extracts or fractions of inflorescences or products of *Musa paradisiaca* L., the use of the extracts or fractions of inflorescences or products of *Musa paradisiaca* L. and formulations with extracts and fractions of inflorescences or products of *Musa paradisiaca* L. Patent registered in Núcleo de Inovação Tecnológica do Paraná (Nitpar) by Federal University of Parana, process number: BR1020130305871, deposit date: 11/28/2013, Parana, Brazil.

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) - methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet. Parasitol. 44, 35-44.

Crozier, A., Rio, D.D., Clifford, M.N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. Mol. Asp. Med. 31, 446–467.

Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J., von Samson-Himmelstjerna, G. 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. Vet. Parasitol. 174, 58-64.

Díaz, G.J., Herrnandez, G.T., Zamilpa, A., Perez, C.M.B., Bribiesca, E.R., Mendo, O.H., Arroyo, H.S., Cortazar, M.G., Gives, P.M. 2017. *In vitro* assessment of *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* and *Tagetes filifolia* against *Haemonchus contortus* nematode eggs and infective (L_3) larvae. Microb. Pathogen. 109, 162-168.

Dutta, P.K., Das, A.K., Banerji, N.A. 1983. Tetracyclic triterpenoid from *Musa paradisiaca*. Phytochem. 22, 2563-2564.

Fortes, F.S., Molento, M.B. 2013. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants: advances and limitations for diagnosis. Pesq. Vet. Bras. 33(12), 1391-1402.

Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai. M.Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, K., Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K., Nishioka, T. 2010. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. J. Mass Spectr. 45, 703-714.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. Vet. Parasitol. 212, 5-17.

Jong, T-T., Lee, M-R., Chiang, Y-C., Chiang, S-T. 2006. Using LC/MS/MS to determine matrine, oxymatrine, ferulic acid, mangiferin, and glycyrrhizin in the Chinese medicinal preparations. J. of Pharm. Biomed. Anal., 40, 472–477.

Kumarasingha, R., Preston, S., Yeo, T-C., Lim, D.S.L., Tu, C-L., Palombo, E.A., Shaw, J.M., Gasser, R.B., Boag, P.R. 2016. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus.* Parasites Vectors 9, 187.

Loganayaki, N., Rajendrakumaran, D., Manian, S. 2010. Antioxidant capacity and phenolic content of different solvent extracts from banana (*Musa paradisiaca*) and mustai (*Rivea hypocrateriformis*). Food Sci. Biotechnol. 19, 1251-1258.

Mahmood, A., Ngah, N., Omar, M.N. 2011. Phytochemicals constituent and antioxidant activities in *Musa x paradisiaca* flower. Eur. J. Sci. Res. 66(2), 311-318.

Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H. 2014. *In vitro* effects of *Musa x paradisiaca* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci. 96, 127-132.

Molan, A.L., Waghorn, G.C., McNabb, W.C. 2002. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. Vet. Record 150, 65-69.

Molento, M.B., Prichard, R.K. 2001. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. Pesq. Vet. Brasil. 21(3), 117-121.

Molento, M.B. 2009. Parasite control in the age of drug resistance. Vet. Parasitol. 163, 229-234.

Nisha, P., Mini, S. 2013. Flavanoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescences down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats. J. Func. Foods 5, 1838-1847.

Nogueira, F.A., Oliveira, L.N., Silva, R.B., Nery, P.S., Virgínio, Jr G.F., Geraseev, L.C., Duarte, E.R. 2012. Anthelminthic efficacy of banana crop residues on gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* tests. 111(1), 317-323.

Padam, B.S., Tin, H.S., Chye, F.Y., Abdullah, M.I. 2012. Antibacterial and antioxidative activities of the various solvent extracts of banana (*Musa paradisiaca* cv. Mysore) inflorescences. J. Biol. Sci. 12(2), 62-73.

Pavei, C., Kaiser, S., Borré, G.L., Ortega, G.G. 2010. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 33, 1551-1561.

Pavela, R., Benelli, G. 2016. Essential oils as eco-friendly biopesticides? Challenges and constraints. Tr. Plant Sci. 21(12), 1000-1007.

Pazmiño-Durán, E.A., Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., Glória, M.B.A. 2001. Anthocyanins from banana bracts (*Musa x paradisiaca*) as potential food colorants. Food Chem. 73: 327-332.

Queiroz, C.R.A.A., Morais, S.A.L., Nascimento, E.A. 2002. Caracterização dos taninos da aroeira-preta. Soc. Inv. Flor. 26(4), 485-492.

Rogers, W.P., Brooks, F. 1977. The mechanism oh hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol. 7, 61-65.

Shodehinde, S.A., Oboh, G. 2013. Antioxidant properties of aqueous extracts of unripe *Musa paradisiaca* on sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rat pancreas *in vitro*. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3(6), 449-457.

Singhal, M., Ratra, P. 2013. Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic content of *Musa* acuminate peel extracts. Global J. Pharmacol. 7(2),118-122.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16(3), 144-158.

Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., Enck, P. 2017. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. Eur. J. Nutr. 56(7), 2215-2244.

Vennat, B., Gross, D., Pourrat, A., Pourrat, H. 1992. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. Pharmac. Acta Helv. 67(1), 11-14.

Yang, J., Guo, J., Yuan, J. 2008. *In vitro* antioxidant properties of rutin. LWT – Food Sci.Technol. 41, 1060-1066.

ARTIGO II

Phytochemical characterization and antioxidant activities of extracts of *Polygonum acre* H.B.K

Submetido na revista *Phytochemical Analysis* (I.P. 2.337 - Qualis B1 - CBII) em setembro de 2018.

Phytochemical characterization and antioxidant activities of extracts of *Polygonum acre* H.B.K

SHORT TITLE

Phytochemical and antioxidant activities of *Polygonum acre* H.B.K

MELINA SEYFRIED[a], LUCIANO HENRIQUE CAMPESTRINI[a], DIOGO ALEXANDRE SIEBERT[b], LUCIANO VITALI[b], GUSTAVO AMADEU MICKE[b], SELMA FARIA ZAWADZKI-BAGGIO[a], MARCELO BELTRÃO MOLENTO[c], JULIANA BELLO BARON MAURER[a*]

[a] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, P.O. BOX 19046, 81531-900, Curitiba, PR, Brazil
[b] Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil
[c] Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, 80035-050, Curitiba, PR, Brazil
[§] Corresponding author: Tel.: +55 41 33611576; Fax: +55 32662042.
E-mail address: jumaurer@ufpr.br
ORCID Identifier, 0000-0001-6235-331X

SHORT ABSTRACT

Polygonum acre H.B.K is used in medical preparations as infusion, decoction, or tincture. These medicinal benefits are attributed to phenolic compounds and their antioxidant properties. Results revealed the presence of rosmarinic acid, quercetin, eridictyol, taxifolin, isoquercitrin, rutin, and myricitrin. Based on antioxidant activities, ABTS radical scavenging test**,** ferric reducing antioxidant power (FRAP) test, and the superoxide anion radical scavenging test (calculated as EC_{50} μg/mL), a strong correlation between the phenolic content and antioxidant activity was recorded.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FINANCIAL INFORMATON

The authors wish to thank CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*) for the doctoral fellowship granted to M. Seyfried. We are also grateful to PROEX-CAPES (*Programa de Excelência Acadêmica*) for its partial financial support. This work did not receive any specific grant.

ABSTRACT

Introduction*: Polygonum acre* H.B.K known as water-pepper (Polygonaceae), is used in medical preparations as infusion, decoction, or tincture for different purposes, such as inflammatory problems. These medicinal benefits are attributed to phenolic compounds and their antioxidant properties. However, detailed information on the phytochemical profile of *P. acre* is scarce.
Objectives The main objective of this work was to characterize and compare the antioxidative potential of chemically different extracts obtained from the aerial parts of *P. acre*.
Materials and methods: Different extracts of *P. acre* were obtained from conventional methodologies, i.e., by infusion, decoction, tincture, water extraction, and hydroethanolic extraction.
Results: Results indicate flavonoids to be the major phenolic constituents of these extracts. The analysis of water and ethanol extracts by high performance liquid chromatography - electron spray ionization/mass spectrometry (in a comparison with 46 commercial standards of phenolic compounds) revealed the presence of phenolic acids, such as rosmarinic acid; aglycone flavonoids, including quercetin, eridictyol, and taxifolin; and glycosylated flavonoids, including isoquercitrin, rutin, and myricitrin, in varying amounts and concentrations. On the basis of antioxidant activities, ABTS radical scavenging test**,** ferric reducing antioxidant power (FRAP) test, and the superoxide anion radical scavenging test (calculated as EC_{50} μg/mL), a strong correlation between the total phenolic content and antioxidant activity was recorded.
Conclusions: Results demonstrate that traditional methods can efficiently extract compounds from the aerial parts of *P. acre*, so that their great therapeutic potential can be exploited. The products may contribute towards the enhancement of scientific knowledge associated with the medicinal use of this species.

KEYWORDS: Dotted Smartweed, water-pepper*,* HPLC-ESI-MS/MS, *quercetin,* antioxidant, ABTS, FRAP.

INTRODUCTION

The genus *Polygonum* has about 300 species that are widely distributed throughout the world. Studies have shown that species of this genus have different biological properties, including antioxidant and anti-inflammatory ones [1,2,3]. Medicinal preparations (i.e. infusions, decoctions, and tinctures) containing chemical components from the aerial parts of these species were used to treat gastrointestinal and inflammatory problems [3,4,5].

Polygonum acre H.B.K (syn. *P. punctatum* Ell and *Persicaria puctata* Ell.), belongs to the Polygonaceae family and is popularly known as water-pepper or *dotted smartweed* [4]. This species is traditionally used for treating sore throats and colds [3]. Studies on its different extracts have revealed them to have anti-inflammatory,

antipyretic, antidiarrheal [6], antihemorrhagic [7], and antimicrobial activities [6], as well as a reductive effect on histamine-induced vascular permeability [4]. Although there are scientific reports available on *P. acre*, detailed information on the phytochemical profile of this plant species and its extracts is still scarce.

Previous studies have suggested that the biological activities of the different species of this genus, including *P. aviculare, P. multiflorum, P. cuspidatum, P. hydropiper, P. cognatum* [8,9,10,11,12], may be related to the content of phenolic compounds, especially flavonoids and tannins [4,6,7]. However, phenolic compounds are of considerable interest, mainly due to their antioxidant properties [13]. While there is much literature on phenolic compounds and the antioxidant activities of several species of *Polygonum,* little is known about *P. acre*.

Therefore, the main objective of this study was to characterize the phenolic profile of the different extracts obtained during traditional medicinal usage of *P. acre* (infusion, decoction, and tincture), other than the ones obtained through water and ethanol extraction, followed by a comparative evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of the extracts obtained.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Phenolic standards, D-galactose, bovine serum albumin, TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nitroblue tetrazolium (NBT), and 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) were obtained from Amresco (Dallas, TX, USA). Methanol-grade HPLC was obtained from JT Baker (Xalostoc, Mexico). Water was purified using an ultra-purifier MS 2000 model from Gehaka (Sao Paulo, SP, Brazil). Folin-Ciocalteu reagent was prepared from Chromate (Sao Paulo, SP, Brazil). All other reagents were of analytical grade.

Collection of plant samples from the aerial parts of *P. acre*

Traditional extractions

Traditional extractions were carried out from commercially obtained dry aerial parts of *P. acre* (Chá & Cia - Ervas Medicinais, São José dos Campos, BR), using following standardization: 1 tablespoon corresponding to 2 g of dry material and 1 teacup corresponding to 240 mL. For infusions, we conducted five procedures with different concentrations: 0.4, 0.6, 0.83, 1.0, and 3.0% (w/v), respectively identified by the letters, A (Chá e Cia, São Paulo, BR), B [14], C [15], D [16], and E [17], as illustrated in Figure 1. The infusions were prepared by pouring boiling distilled water (1 L) onto the plant material [18], followed by brewing it for 10 minutes in an enamel teapot. The filtered material (vacuum system) was then concentrated (rotary evaporator), frozen, and freeze-dried. The decoctions were prepared by heating distilled water (1 L) to boiling point, followed by addition of the plant material and further heating for 5 minutes on a low flame [18]. After this period, we turned off the flame, and the contents were allowed to rest for 10 minutes. The contents were then filtered under a vacuum system, concentrated using a rotary evaporator, froze, and lyophilized, creating the extracts illustrated in Figure 1. The same concentrations described for the infusion were used for the decoction, as well. The tinctures were similarly prepared by methods available in the literature [18]. In summary, was conducted a hydroalcoholic maceration (70% v/v, 1L) at room temperature for 15 days, followed by filtration (vacuum system), concentration (rotary evaporator), freezing, and freeze-drying. Two concentrations were used (w/v): A at 10% [15,16] and B at 13.64% [14] (Figure 1). All yields were calculated with respect to the plant initial dry mass and are given in Table 1.

Laboratory extractions

The laboratory extractions were performed by following the protocols adapted from ITF [15] and Oliveira [19], in order to compare their yields and extracts phytochemical profiles with those obtained from traditional methods. We carried out a water extraction (6.7% m/v, 1.5 L) in a water-bath (70 ºC) to mimic the infusions and the decoctions. The extraction was carried out for 1 h with constant mechanical stirring. The

second laboratory extraction was a hydroalcoholic maceration (70% v/v) performed at room temperature (25 ºC) for 10 days. The flask was kept protected from light. Finally, we conducted solid phase extractions (SPE) to separate the dry lab extracts (30 mg) using C18 cartridges *(*Agilent Technologies, Inc., Cary, NC, USA*)*. This was done to remove sugars, according to the method described by Infante et al. [20]. All extractions *were* vacuum filtered, concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40°C, freeze-dried, stored at -4°C in the dark, and designated as EHW-PA, ETOH-PA, EHW-PA-C, and ETOH-PA-C, respectively, where the label, C, meant clean (Figure 1).

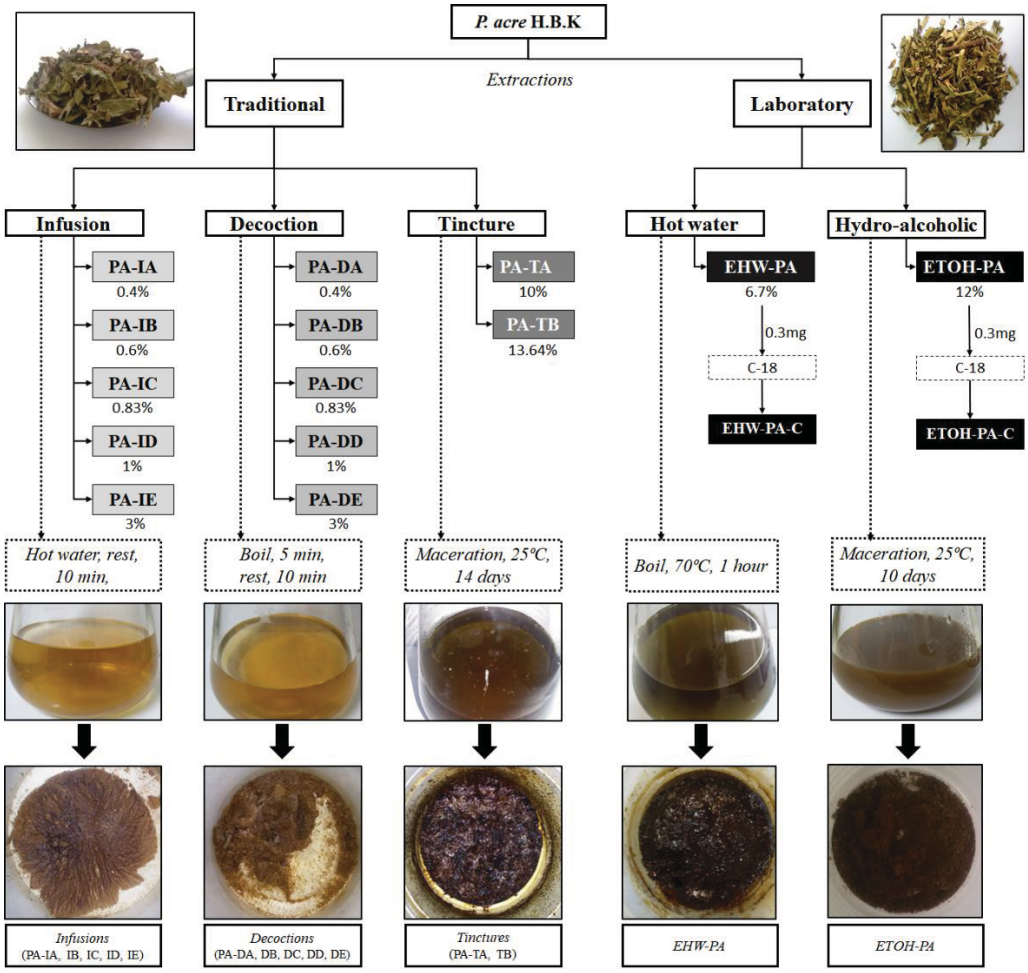


Fig. 1. Flow charts for traditional and laboratory extraction methods.

Chemical characterization

Colorimetric determination of total carbohydrates, proteins, phenolic, flavonoid, condensed, and hydrolyzed tannin contents

The total carbohydrate content was determined by the phenol-sulfuric acid microassay adapted from the method of Fox and Robyt [21], using a calibration curve of

D-galactose (R^2 = 0.9934). Total protein content was measured by a microassay adapted from Bradford [22], using a calibration curve of bovine serum albumin concentrations (R^2 = 0.9932). We determined the total phenolic compounds content by the *Folin-Ciocalteu* reagent microassay that was adapted from the method of Singleton and Rossi Jr [23], utilizing gallic acid as standard (R^2 = 0.9948). The amount of total flavonoids was measured by aluminum chloride complexation described by Woisky and Salatino [24], and the results were compared with a rutin standard curve (R^2 = 0.9981). The condensed tannins (or proanthocyanidins) were measured using an adaptation of the vanillin method described by Queiroz et al. [25] using a standard curve of epicatechin (R^2 - 0.9967). Hydrolysable tannins were analyzed with potassium iodate in a microassay adapted from Willis and Allen [26], utilizing a tannic acid calibration curve (R^2 = 0.9901). All tested samples were read on a microplate reader (EPOCH model, BioTek, Winooski - USA) using 96-well flat bottom microplates (Techno Plastic products, TPP AG, Trasadingen - CH).

Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)

Experiments by HPLC-ESI-MS/MS were performed at LabEC/INCT-Catalise at Federal University of Santa Catarina (UFSC). The analyses were conducted in an Agilent 1200 chromatograph (Agilent Co., St. Clara, CA, USA), with a Phenomenex Synergi Polar-RP 80Å column (150 mm × 2 mm ID, particle size: 4 μm) at a temperature of 30 ºC. The eluent was formed by mixing solvents A (MeOH/H_2O in ratio of 95:5, v/v) and B (H_2O/formic acid 0.1%, v/v) as follows: 1st stage - 10% solvent A and 90% B (isocratic mode) for 5 min; 2nd stage - linear gradient of solvents A and B (from 10 to 90% of A) for 2 min; 3rd stage - 90% solvent A and 10% B (isocratic mode) for 3 min; 4th stage - linear gradient of solvents A and B (from 90 to 10% of A) for 7 min with a mobile phase flow rate of 250 μL/min. In all analyses, the injected volume was 5 uL.

The liquid chromatography system was coupled to a mass spectrometry system consisting of a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer Qtrap 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, USA) with TurboIonSpray as ionization source. The following source parameters were used: negative ionization mode; ion spray interface temperature, 400°C; ion spray voltage, 4500 V; curtain gas, 10 psi; nebulizer gas, 45 psi;

auxiliary gas, 45 psi; collision gas, medium. The Analyst software (version 1.5.1) was used to record and process the data. Pairs of ions were monitored in MRM (Multiple Reaction Monitoring) modes.

For the identification and quantification of the compounds, 46 standard phenolic compounds (4-aminobenzoic acid, 4-hydroxymethylbenzoic acid, apigenin, aromadendrin, caffeic acid, carnosol, catechin, chlorogenic acid, chrysin, cinnamic acid, coniferaldehyde, ellagic acid, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, eriodictyol, ferulic acid, fustin, galangin, gallic acid, hispudulin, isoquercetin, kaempferol, mandelic acid, methoxyphenylacetic acid, myricetrin, naringerin, naringin, *p*-anisic acid, *p*-coumaric acid, pinocembrin, protocatechuic acid, quercetin, resveratrol, rosmarinic acid, rutin, salicylic acid, scopoletin, sinapaldehyde, sinapic acid, syringaldehyde, syringic acid, taxifolin, umbelliferone, vanillic acid, and vanillin) dissolved in methanol (0.02 to 6 mg/L) were analyzed under the same conditions described above.

In vitro **antioxidant assays**

The extracts obtained from traditional extractions and the crude and clean laboratory extracts were investigated to determine their radical scavenging and antioxidant activities. This was done by utilizing their serial dilutions from 3.81 to 500 µg/mL, in triplicates, excluding the blank sample.

ABTS radical scavenging assay

The antioxidant assay, using the ABTS radical ($ABTS^{\bullet+}$), can be done both with lipophilic and hydrophilic molecules. The solution is bleached to reduce the radical with the antioxidant molecules. For this analysis, we used a microassay adapted from the method previously described by Re et al. [27]. Initially, we prepared a **s**tock solution of partially oxidized ABTS cations by adding 88 µL of potassium persulfate solution (2.45 mM, distilled water) to 5 mL of an ABTS solution (7 mM, distilled water), which was then left to react for 16 hours at room temperature (protected from light). For the test, we diluted 1 mL of the $ABTS^{\bullet+}$ radical stock solution in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4,

q.s.p 100 mL) and corrected the absorbance with distilled water or with the radical solution to reach 0.7 ± 0.02 at 734 nm.

In a 96-well plate, we pipetted 20 µL of the samples, standard (TROLOX, 12.5 to 200 µM) or phosphate buffer (control) solutions, and 220 µL of the $ABTS^{\bullet+}$ radical solution (diluted and adjusted). The plate remained at rest for 6 minutes, while being kept protected from the light; the reaction with $ABTS^{\bullet+}$ was recorded at 734 nm. We used linear regression (R^2 = 0.9947) to express the antioxidant activity in equivalence to TROLOX, and the percentage of radical scavenging was calculated and expressed as mean ± standard deviation (SD) by the following formula: Antioxidant activity (%) = [(Ac - A)/ Ac] × 100, where Ac and A are the control and samples average absorbance, respectively.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The iron reduction power of the extracts was investigated using the FRAP method [28]. At low pH, TPTZ forms a complex of a yellow rust color with reduced iron $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$. On the addition of an antioxidant, the Fe(III) to Fe(II) reduction occurs, changing the color of the reaction medium to a dark blue. The assay was adapted from the Müller et al. method [29] and consisted of adding 20 µL of the sample (3.9 - 500 µg/mL)**,** standard (ferrous sulfate, 10 to 700 µM) or distilled water (blank), 30 µL of distilled water, and 200 µL of FRAP reagent. The plate was incubated at 37**°C** for 8 minutes and then read for absorbance at 595 nm. The FRAP solution consisted of 10 parts of potassium acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 1 part of ferric chloride (20 mM), and 1 part of the TPTZ solution (10 mM in HCl, 40 mM). The FRAP values were calculated by applying linear regression on the standard curve ($FeSO_4.7H_2O$, 50 to 700 µM) and estimating concentrations in µM equivalents of Fe^{2+} per mg of dry extract (R^2 = 0.9963).

Superoxide anion radical scavenging activities

The scavenging capacity of the superoxide radical (O^{2-}) was determined with a microassay adapted from Nishikimi et al. [30] and Gomes et al. [31]. This method tested the molecule's capacity to decrease the extent of NBT (nitro blue tetrazolium) reduction

after scavenging the superoxide anion radical (O^{2-}), generated by the nicotinamide adenine dinucleotide and phenazine methosulfate system (NADH-PMS) in the reaction medium. Therefore, the lower the NBT reduction, the lower will be the absorbance at 560 nm. The average percentages and the SD of the remaining anion radicals $O_2^{\bullet -}$ were obtained from the equation: $O_2^{\bullet -}$ radical scavenge (%) = [(Ac – A)/Ac)] × 100, where Ac and A stand for the mean absorbance of the control and the samples solution respectively.

Briefly, we added 100 µL of the sample (3.9 to 500 µg/mL), 50 µL of NBT (645 µM in phosphate buffer 19 mM, pH 7.4), and 50 µL of PMS (16.2 µM in phosphate buffer 19mM, pH 7.4). After mild stirring, we added 100 µL of NADH (498 µM in phosphate buffer 19 mM, pH 7.4) and the plate was incubated, while being kept protected from the light, at room temperature for 5 minutes, followed by reading absorbance at 560 nm. As control, we used a phosphate buffer solution (19 mM, pH 7.4), while rutin and gallic acid (3.9 to 500 µg/mL) were used as standards.

Statistical Analysis

Results were calculated as mean ± SD (n = 3). The results of the tests were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison tests, using the GraphPad Prism 5 software. The differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. The half maximal effective concentration (EC_{50}) corresponded to the concentration of the extract that was able to capture 50% of the free radicals; it was calculated using linear equations ($r^2 \geq 0.95$) obtained by linearizing the activity curves. Pearson's correlation was used to analyze the relationship of the total phenolic or flavonoid content with the antioxidant activity. For the analysis of correlation coefficient values (r, Pearson's correlation coefficient), we considered the following values for correlation categorization: from 0.7 to 1 as high; 0.5 to 0.7 as moderate; 0.3 to 0.5 as low; and ≥ 0.3 as insignificant [32].

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical characterization of extractions obtained by traditional and laboratory extractions from *P. acre*

Colorimetric dosages

Table 1 shows the yield and chemical characterization results for carbohydrates, proteins, phenolic compounds, flavonoids, proanthocyanidin, and condensed tannins of *P. acre*.

Regarding carbohydrate content, the infusions (PA-IA, PA-IB, PA-IC, PA-ID, PA-E) and the decoctions (PA-DA, PA-DB, PA-DC, PA-DD, PA-DE) displayed similar mean values (mg equivalent of D-Gal/g dry extract) of 139.85 and 135.56, respectively (p = 0.0310). Although twice the concentration was used in the hot aqueous laboratory extraction (EHW-PA, 6.7%, m/v), its carbohydrate content (171.26 ± 2.18 mg equivalent of D-Gal/g dry extract) was similar (p = 0.4530) to the content recorded for the traditional aqueous extract in higher concentrations (1 and 3% m/v). The carbohydrate content in hydroethanolic extractions (PA-TA; PA-TB; ETOH-PA) was recorded to be 629.72 ± 1.08, 195.02 ± 2.64, 239.76 ± 5.89 mg (equivalent of D-Gal/g of dry extract), respectively, above the ones recorded in the aqueous extractions (infusions, decoctions, and aqueous extract). The protein content in all traditionally obtained extracts was similar (with an average value of 86.26 mg (BSA equivalent/g of dry extract). The EHW-PA and ETOH-PA extracts presented higher contents of protein than the mentioned ones with the mean content being 130.82 mg (BSA equivalent/g of dry extract) (Table 1).

The tinctures (PA-TA, PA-TB) also contained a higher content of phenolic compounds, 266.72 mg (gallic acid equivalent/g dry extract) on average, as compared to the infusions (PA-IA, PA-IB, PA-IC, PA-ID, PA-E) and decoctions (PA-DA, PA-DB, PA-DC, PA-DD, PA-DE) that displayed average values equal to 115.21 and 197.78, respectively (Table 1). The content of phenolic compounds was statistically different between the different extracts obtained by infusion or decoction as compared to between the extracts obtained by the same method (Table 1). Despite having the highest extracted phenolic content, which could eventually generate a greater biological activity, the tinctures are usually administered as droplets with 10 to 20 droplets being prescribed for use up to twice a day [15,16]. Therefore, the content consumed daily through tinctures would be smaller than that consumed through infusions or decoctions (240 mL per teacup). ETOH-PA showed the highest quantity of phenolic compounds (294.77 ± 2.48 mg of gallic acid equivalent/g dry extract), while the content in EHW-PA (208.43 ± 11.92 mg of gallic acid equivalent/g dry extract) was near the average values in the decoctions (197.78) (Table 1). These results are higher than the ones reported by Lima et al. [33]

(1.57%, crude material of leaves) for the aerial parts of *P. acre* H.B.K var. *aquatile Meisn*. The hydromethanolic extracts (80% v/v) of aerial parts of *Polygonum. capitatum*, *Polygonum chinensis*, *Polygonum cuspidatum*, and *Polygonum multiflorum* presented a total phenolic content that was lower than the that recorded for *P. acre*, and was 86.9, 441.5, 63.3, and 12.7 mg (equivalent of gallic acid/g dry extract), respectively [34]. The hydroethanolic extraction (50% v/v) from the whole *Polygonum aviculare* plant was around 677 mg (equivalent of gallic acid/g dry extract) [10]. The hydroethanolic extraction (80% v/v) from the aerial parts of *Polygonum minus* showed a statistically higher content with the values, being higher than the observed content in aqueous extracts of the same plant [35]; this finding is similar to our observation for *P. acre.*

The EHW-PA-C extract had an increase of about 70% in the content of phenolic compounds, when compared with the crude laboratory extract (EHW-PA), demonstrating that this procedure was statistically efficient ($p < 0.0001$) in removing the interfering compounds of the samples [20]. However, this procedure was not efficient for the laboratory hydroethanolic extraction, since there was no statistically significant ($p = 0.2667$) change in phenolic compounds content between the extracts ETOH-PA and ETOH-PA-C (Table 1).

Table 1. Fractional phytochemical data for the aerial parts of *Polygonum acre*

Extracts	[1] *Yield*	[2] *Carbohydrates*	[3] *Proteins*	[1] *Phenolics*	[5] *Flavonoids*	[6] *Proanthocyanidins*	[7] *Hydrolysable tannins*
PA-IA	13.98	109.36 ± 3.62 ^{a}	66.06 ± 1.27 ^{a}	106.58 ± 1.95 ^{a}	34.54 ± 4.35 ^{a}	28.76 ± 1.23 ^{ab}	15.74 ± 0.92 ^{a}
PA-IB	12.94	128.74 ± 0.83 ^{ab}	61.80 ± 0.58 ^{a}	57.46 ± 1.55 ^{b}	18.98 ± 2.52 ^{b}	28.50 ± 8.88 ^{ab}	4.31 ± 0.81 ^{b}
PA-IC	12.93	141.78 ± 0.91 ^{ab}	80.37 ± 1.21 ^{a}	89.52 ± 6.50 ^{c}	17.60 ± 1.15 ^{c}	40.82 ± 1.70 ^{c}	0.74 ± 1.01 ^{b}
PA-ID	14.67	145.18 ± 1.63 ^{ab}	71.84 ± 1.69 ^{a}	155.95 ± 4.03 ^{d}	58.03 ± 4.51^{d}	31.80 ± 1.79 ^{abc}	3.36 ± 2.02 ^{b}
PA-IE	12.48	174.21 ± 1.46 ^{b}	97.94 ± 1.22 ^{a}	166.55 ± 5.28 ^{d}	59.86 ± 8.74 ^{d}	39.92 ± 0.42 ^{ac}	15.74 ± 1.61 ^{a}
PA-DA	16.03	93.06 ± 2.32 ^{a}	96.69 ± 0.71 ^{a}	174.31 ± 6.60 ^{a}	66.58 ± 0.70 ^{a}	36.82 ± 1.39 ^{ade}	50.50 ± 2.34 ^{a}
PA-DB	14.65	101.23 ± 2.01 ^{ac}	120.28 ± 0.48 ^{a}	180.25 ± 9.05 ^{ab}	73.90 ± 4.85 ^{a}	41.03 ± 1.16 ^{b}	5.98 ± 3.72 ^{b}
PA-DC	15.67	141.60 ± 1.66 ^{a}	68.07 ± 1.33 ^{a}	178.70 ± 18.19 ^{ab}	72.37 ± 9.87 ^{a}	28.10 ± 0.22 c	19.07 ± 1.21 ^{c}
PA-DD	6.49	185.82 ± 0.51 ^{c}	98.82 ± 0.69 ^{a}	249.79 ± 10.49 ^{c}	80.76 ± 11.0 ^{b}	37.34 ± 1.10 ^{ad}	31.69 ± 2.56 ^{d}
PA-DE	5.20	156.07 ± 1.59 ^{bc}	100.70 ± 1.36 ^{a}	205.84 ± 10.00 ^{b}	81.07 ± 1.61^{b}	34.17 ± 1.86 ^{ae}	19.31 ± 5.71 ^{c}
PA-TA	7.42	629.72 ± 1.08 ^{a}	137.85 ± 0.56 ^{a}	260.39 ± 21.36 ^{a}	155.36 ± 9.60 ^{a}	55.79 ± 1.47 ^{a}	22.64 ± 9.78 ^{a}
PA-TB	5.96	195.02 ± 2.64 ^{b}	123.80 ± 0.72 ^{a}	274.09 ± 2.69 ^{a}	185.11 ± 8.95 ^{b}	46.76 ± 1.36 ^{b}	49.07 ± 3.02 ^{b}
EHW-PA	10.57	171.26 ± 2.18 ^{a}	43.85 ± 1.12 ^{a}	208.43 ± 11.92 $^{a\bullet}$	57.57 ± 4.13 $^{a\bullet}$	22.29 ± 0.87 ^{a}	10.74 ± 1.72 ^{a}
EOTH-PA	7.18	239.76 ± 5.86 ^{b}	97.44 ± 0.74 ^{b}	294.77 ± 12.48 ^{b*}	87.32 ± 3.99 ^{a*}	45.63 ± 1.34 ^{b}	49.07 ± 2.02 ^{b}
EHW-PA-C	6.86	nd	nd	356.03 ± 8.21 $^{a\circ}$	207.84 ± 11.23 $^{a\circ}$	nd	nd
ETOH-PA-C	24.57	nd	nd	286.23 ± 2.19 $^{a+}$	53.0 ± 12.20 $^{b+}$	nd	nd

[1]Calculated as dry weight in relation to the original material; expressed as a percentage. [2] Determined according to the method of Fox and Robyt [21]; expressed as D-Gal mg equivalent. [3]Determined according to the method of Bradford [22]; expressed as BSA mg equivalent; [4] Determined according to the method of Singleton and Rossi Jr [23]; expressed as mg equivalent of gallic acid per gram of dry extract. [5] Determined according to the method of Woiski and Salatino [24]; expressed as mg equivalent of rutin. [6] Determined according to the method of Queiroz et al. [25]; expressed as mg equivalent of epicatechin. [7] Determined according to the method of Willis and Allen [26]; expressed as mg equivalent of tannic acid. nd = not determined. Different letters in each column represent significant differences between the samples obtained by the same method (infusions, decoctions, tinctures, crude testing, and SPE) by the Tukey test ($p \leq 0.05$). Symbols represent statistical differences between laboratory extractions of the same type (crude *vs* SPE).

The phenolic compounds occurring in all extracts are mostly flavonoids (Table 1). The tinctures (PA-TA, PA-TB) and EHW-PA-C extract displayed the highest contents of these molecules, which were equal to 155.36 (± 9.60), 185.11 (± 8.95), and 207.84 mg (± 11.23) (equivalent of rutin/g dry extract), respectively. With the exception of extracts PA-IB and PA-IC, the mean content recorded in other extract was 65.91 mg (equivalent of rutin/g dry extract). The flavonoid content (mg equivalent of rutin/g dry extract) reported for hydromethanolic extracts from aerial parts of other *Polygonum* species are 23.35 (*P. multiflorum*), 48.32 (*P. chinensis*), 78.47 (*P. capitatum*), and 121.78 (*P. cuspidatum*) [34]. The hydroethanolic extracts (50% v/v) of *P. aviculare* contained lower flavonoid content that its hydroethanolic extracts (PA-TA, PA-TB, and EOTH-PA), given that approximately 16.64% of the phenolic compounds corresponded to flavonoids [10].

All tested extracts presented proanthocyanidin content in ranges from 22.29 ± 0.87 to 55.79 ± 1.47 mg (equivalent of epicatechin/g dry extract) (Table 1). For hydrolysable tannins, the values varied between 0.74 ± 1.01 and 50.50 ± 2.34 mg (equivalent of tannic acid/g dry extract) (Table 1). A study by Lima et al. [33] did not report the presence of hydrolysable tannins (by the rhodamine test) in the aerial parts of *P. acre*.

Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)

Due to the high content of phenolic compounds present in the clean laboratory extracts (EHW-PA-C and ETOH-PA-C), they were evaluated qualitatively and quantitatively by HPLC-ESI-MS/MS. Out of the 46 standards of phenolic acids and flavonoids tested here, 13 were qualitatively identified in these extracts as shown in Figure 2 and Table 2.

The *p*-coumaric acid, ferulic acid, and rosmarinic acid were present in the two extracts, while synapic acid was detected only in the aqueous extraction (Table 2). Ferulic acid was a major component in the aqueous extraction (0.152 ± 0.070 mg/g dry extract), but it was not quantifiable in ETOH-PA-C. In this extract, rosmarinic acid was predominant, though in a low concentration (0.024 ± 0.008 mg/g dry extract), as shown in Table 2. Other phenolic acids were found, mainly in aqueous extracts, but in lower proportions. The hydromethanolic extracts of other *Polygonum* species are reported to exhibit different profiles of phenolic acids. In *P. hydropiper*, *P. aviculare*, *P. mite*, *P.*

convolvulus, *P. lapathifolium* spp *tomentosa,* and *P. amphibium* species, the major compound similar with this study is *p*-coumaric acid. For *P. bistoria,* it is ferulic acid; for *P. lapa,* it is protocatechuic acid; and for *P. persicaria*, it is sinapic acid [36].

Table 2. Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds present in EHW-PA-C and ETOH-PA-C in HPLC-ESI-MS/MS

Standard phenolic compounds	EHW-PA-C		ETOH-PA-C	
	Qualitative	*Quantifying*	Qualitative	*Quantifying*
p-coumaric acid	✓	< LQ	✓	< LQ
Ferulic acid	✓	0.152 ± 0.070	✓	-
Sinapic Acid	✓	0.039 ± 0.022	-	-
Rosmarinic acid	✓	0.055 ± 0.008	✓	0.024 ± 0.008
Galangin	-	-	✓	< LQ
Eriodictyol	✓	< LQ	✓	0.053 ± 0.008
Epicatechin	✓	0.792 ± 0.043	-	-
Quercetin	✓	2.160 ± 1.566	✓	1.948 ± 0.217
Taxifolin	✓	0.044 ± 0.011	✓	0.021 ± 0.012
Myricitrin	✓	0.142 ± 0.050	✓	0.162 ± 0.019
Epicatechin gallate	-	-	✓	0.486 ± 0.211
Isoquercitrin	✓	0.941 ± 0.419	✓	2.183 ± 0.647
Rutin	✓	0.314 ± 0.114	✓	0.583 ± 0.179

[1] Results expressed as mg per g of dry extract. ✓ = detected; LQ = below the quantification limit.

As expected, due to the high content of phenolic compounds in this study, most of the identified compounds were flavonoids, as well. In both samples, was found eriodictyol, quercetin, taxifolin, myricitrin, isoquercitrin, and rutin as demonstrated in Table 2. Additionally, epicatechin was identified in EHW-PA only, while galangin and epicatechin gallate appeared only in ETOH-PA-C.

Smolarz [37] isolated 11 flavonoids with chromatographic fraction techniques from the aerial parts of *Polygonum lapathifolium* ssp. *Tomentosum*. Three of them were flavonoids in the forms of aglycone (*trans*-taxifolin, quercetin, and kaempferol), monoglycosides of kaempferol (astragalin), monoglycosides of quercetin (isoquercitrin, hyperin, quercetrin), diglucoside of quercetin (rutin), acetylated glycosides of quercetin (3-O-β-D-(6”-O-galloyl)-glucopyranoside and quercetin-3-O-β-D-(6”-O-galloyl)-galactopyranoside), and glucuronides of quercetin (quercetin-3-O-β-D-glucuronide). From among these, four were found in the aerial parts of *P. acre* as well.

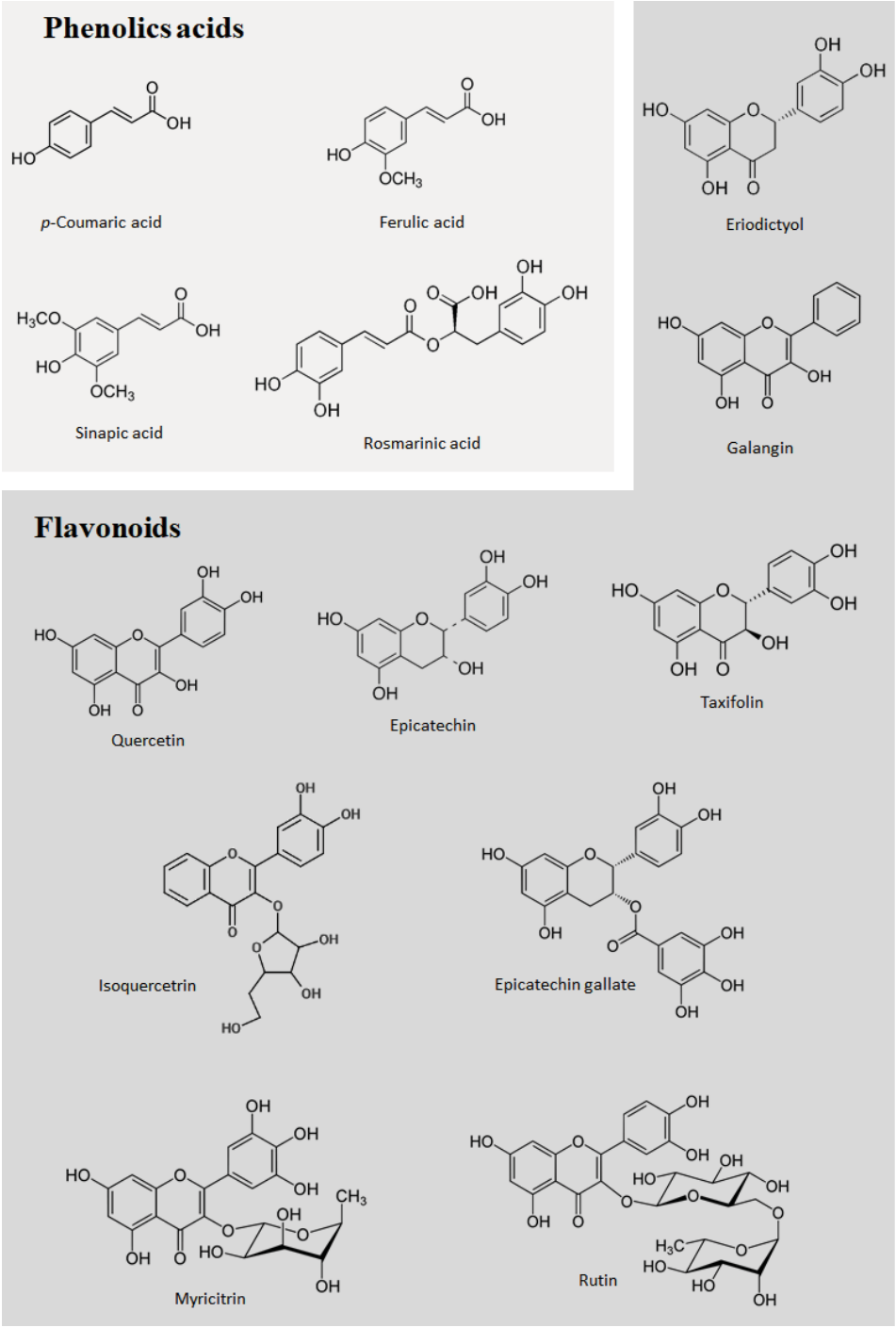


Fig. 2. Structures of phenolic compounds identified by HPLC-ESI-MS/MS

Among the analyzed compounds, quercetin was the major flavonoid in EHW-PA-C (2.160 ± 1.566 mg/g dry extract), followed by isoquercitrin (0.941 ± 0.419 mg/g dry extract) and rutin (0.314 ± 0.114 mg/g dry extract). This pattern was different from that found in the hydroethanolic extracts, where isoquercitrin was the prevailing flavonoid (2.183 ± 0.647), followed by quercetin (1.948 ± 0.217) and rutin (0.583 ± 0.179), as shown in Table 2.

***In vitro* antioxidant activity**

Antioxidants analyzed in the analytical tests can act against free radicals (FR) in two main ways: by the transfer of hydrogen atoms or by the transfer of simple electrons from the antioxidant compounds to the oxidant species. Both mechanisms have the same purpose, which is to inactivate the FR [38,39]. The quantification of total phenolic compounds is an antioxidant assay since the *Folin-Ciocalteu* method is an electron transfer assay that is expressed as phenolic compounds content instead of being expressed as reducing power [38].

ABTS assay has been the most widely employed method for estimation of antioxidant activity and is based on electron transfer [40,41]. In Figure 3, can see the response curves as a percentage against the tested concentrations (3.9 to 500 μg /mL) of the standards and the plant extracts. It is possible to observe that all tested extracts and standards showed a dose-dependent activity of $ABTS^{\bullet+}$ radical capture assay, which remained around 90% of the activity at the highest concentration tested (Figure 3).

The traditional extractions displayed the following sequence of activity: PA-TB = PA-DD > PA-IE, where the tincture and the decoction presented very similar results as indicated in Table 3. The crude laboratory samples showed activity above the traditional ones with the ETOH-PA extract exhibiting the best results (Figure 3 and Table 3). After the C18 stage, the antioxidant activity increased for EHW-PA-C but decreased for ETOH-PA-C. A strong correlation (Pearson's Coefficient, r = 0.9183, p = 0.0035, Fig. S1A) was observed between the content of phenolic compounds and the antioxidant activity by the ABTS assay, in contrast to the correlation between the flavonoid content *versus* antioxidant activity, which was low (r = 0.3617, p = 0.4254, Fig. S1a).

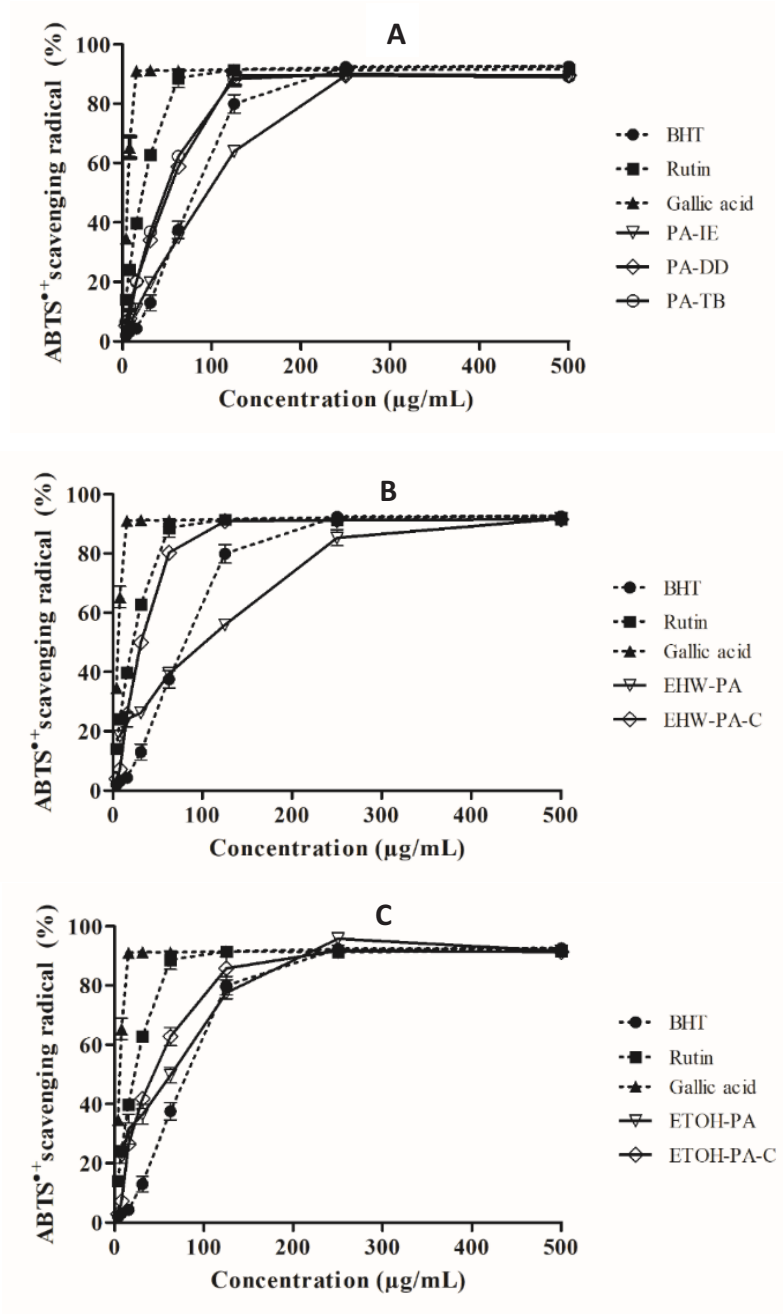


Fig. 3 Profile of the activity curves of ABTS$^{\bullet+}$ scavenging of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre*

Determined in accordance with Re et al. [27]; expressed as percentage of ABTS$^{\bullet+}$ scavenging. Standards: BHT, rutin and chlorogenic acid; A - Traditional extractions: PA-IE (infusion), PA-DD (decoction) and, PA-TB (tincture); B - Hot water laboratorial extractions: EHW-PA (hot water) and EHW-PA-C (hot water extract after the C18); C- Hydroethanolic laboratorial extractions: ETOH-PA (hydroethanolic) and ETOH-PA-C (hydroethanolic extract after the C18).

Table 3. Antioxidant activity of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre*

	[1]ABTS$^{\bullet+}$	[2] FRAP	[3]$O_2^{\bullet-}$
PA-IE	1.70 ± 0.10 [a]	1.15 ± 0.143 [a]	90.90 ± 0.08 [a]
PA-DD	3.30 ± 0.25 [b]	2.28 ± 0.113 [ab]	37.11 ± 2.15 [b]
PA-TB	3.66 ± 0.19 [b]	2.49 ± 0.301 [b]	77.07 ± 1.56 [a]
EHW-PA	2.66 ± 0.08 [a•]	1.32 ± 0.132 [a•]	235.49 ± 4.27 [a•]
ETOH-PA	6.43 ± 1.04 [b*]	2.26 ± 0.113 [a*]	216.46 ± 6.29 [a*]
EHW-PA-C	5.21 ± 0.09 [a○]	4.99 ± 0.054 [a○]	15.93 ± 0.54 [a○]
ETOH-PA-C	5.37 ± 0.16 [a*]	2.92 ± 0.199 [b+]	1012.43 ± 93.77 [b +]
BHT	1.92 ± 0.15 [a]	0.26 ± 0.015 [a]	-
Rutin	9.77 ± 0.09 [b]	10.78 ± 0.29 [b]	26.46 ±1.02 [a]
Gallic acid	28.25 ± 0.91 [c]	19.97 ± 0.57 [c]	33.82 ± 1.03 [a]

[1] Determined in accordance with Re et al. [27]; expressed as mM equivalent of TROLOX per g dry extract. [2] Determined in accordance with Müller et al. [29]; expressed as mM equivalent of Fe^{2+} per g dry extract. [3] Determined in accordance with Nishikimi et al. [30] and Gomes et al. [31]; expressed as EC_{50} (µg/mL). – (not determined). Different letters in each column represent significant differences between samples obtained by the same method (infusion, decoction, tincture, crude laboratory and SPE) by the Tukey test ($p \leq 0,05$). Symbols represent the statistical difference between laboratory extractions of the same type (crude and SPE).

The total antioxidant activity by the FRAP assay was confirmed by analyzing the reduction of the tripyridyltriazine ferric complex (Fe^{3+}-TPTZ) to ferrous tripridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) in the samples [41]. The rutin and gallic acid standards showed the highest activities of 10.78 and 19.97 mM Fe^{2+} per gram of dry extract, respectively. This test also showed a strong correlation of antioxidant activity with the content of phenolic compounds ($r = 0.9173$, $p = 0.0036$, Fig. S1B) and only a moderate relation with the flavonoid content ($r = 0.7326$, $p = 0.0611$, Fig, S1b). Among all samples tested, the EHW-PA-C extract showed the highest iron-reducing activity (Table 3).

In other studies, an extract obtained from ethyl acetate maceration of *Polygonum minus* leaves with 227 mg GAE /g of dry extract showed antioxidant activity via the reducing power assay to be 2.435 mM Fe^{2+} /mg of dry extract [42]. This result is quite consistent with that obtained for ETOH-PA-C, which presented about 286.23 mg GAE /g of dry extract and a reducing power of 2.92 mM Fe^{2+} /mg of dry extract. Shahraki [43] found a similar value for the reducing power with the FRAP assay (2.11 mM Fe^{2+} /mg of dry extract) on a methanolic extract obtained from the aerial parts of *Polygonum patutum*; however, the phenolic content of this sample was higher, being 415 mg GAE / g of dry extract.

The superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) is produced as defense strategy, in addition to cell signaling; however, its overproduction is associated with diseases due to oxidative stress,

such as hypertension, aging, inflammation, and cancer [44]. The samples, along with the standards (rutin and gallic acid), were analyzed in terms of capture capacity of the radical $O_2^{\bullet -}$. The standards presented dose-dependent activity as shown in the curves of radical capture (Figure 4). The last tested concentration had 95.00% (± 1.74) action for rutin and 92.19% (± 0.48) for gallic acid with no statistical difference between them. For this same concentration, only the decoction extract (PA-DD) had a similar result (92.31% ± 1.82). Other traditional and laboratory extracts showed the results to be statistically lower, being 86.11% (± 1.66), 87.38% (± 0.48), 79.35% (± 2.73), 83.47% (± 2.222), 87.19% (± 1.48) and 44.12% (± 2.05) for PA-IE, PA-TB, EHW-PA, ETOH-PA, EHW-PA-C, and ETOH-PA-C, respectively. Despite the relevant antioxidant activity, we did not notice a correlation between the phenolic compounds content (r = 0.09147, p = 0.8454, Fig. S1C) or flavonoid content (r = -0.4723, p = 0.2845, Fig. S1c) with the antioxidant activity.

Other species of the *Polygonum* genus are known to have high superoxide anion scavenging power. The aqueous extract obtained from *P. multiflorum* leaves (100 mg/kg) presented antioxidant activity higher than 80% for the superoxide radical capture [45], and the antioxidant activity was related to presence of emodin (anthraquinone) and quercetin. On the other hand, the methanolic extract of *P. glabrum* presented EC_{50} around 36.98 µg/mL with the activity being related to the presence of a wide range of secondary metabolites, including phenolic compounds (3-hydroxy-5-methoxystilbene) and flavonoids, such as pinocembrim and pinocembrim-5-methylether [46]. The hydroethanolic extract of *P. aviculare* displayed an EC_{50} of 0.8 µg/mL, which is a low value as compared to the standard used (catechin, EC_{50} 40 µg/mL) [10].

Robak, Ryszard, Gryglewski [48], demonstrated that quercetin, myricitrin, and rutin are powerful $O_2^{\bullet -}$ inhibitors. According to the aforementioned authors, the compounds in their studies were tested in isolated form and not as a mixture of compounds [47] as typically found in plant extracts. Therefore, is may be inferred that the activity of extracts is attributable to the sum of the effect of their constituents. Wilms et al [48] describes that quercetin is better at inhibiting the formation of the hydroxyl radical than scavenger of superoxide anions in *in vitro* assays with leukocytes and, Furuno [49] describes that the structure of pyrogallol, gallic acid and its ester, are more efficient than catechol in $O_2^{\bullet -}$ scavenging.

Therefore, according to the results obtained by this work, it is suggested that the absence of a correlation between the phenolic compounds or flavonoids content and the

antioxidant activity from the superoxide assay is due to the occurrence of antioxidative compounds that could not be identified.

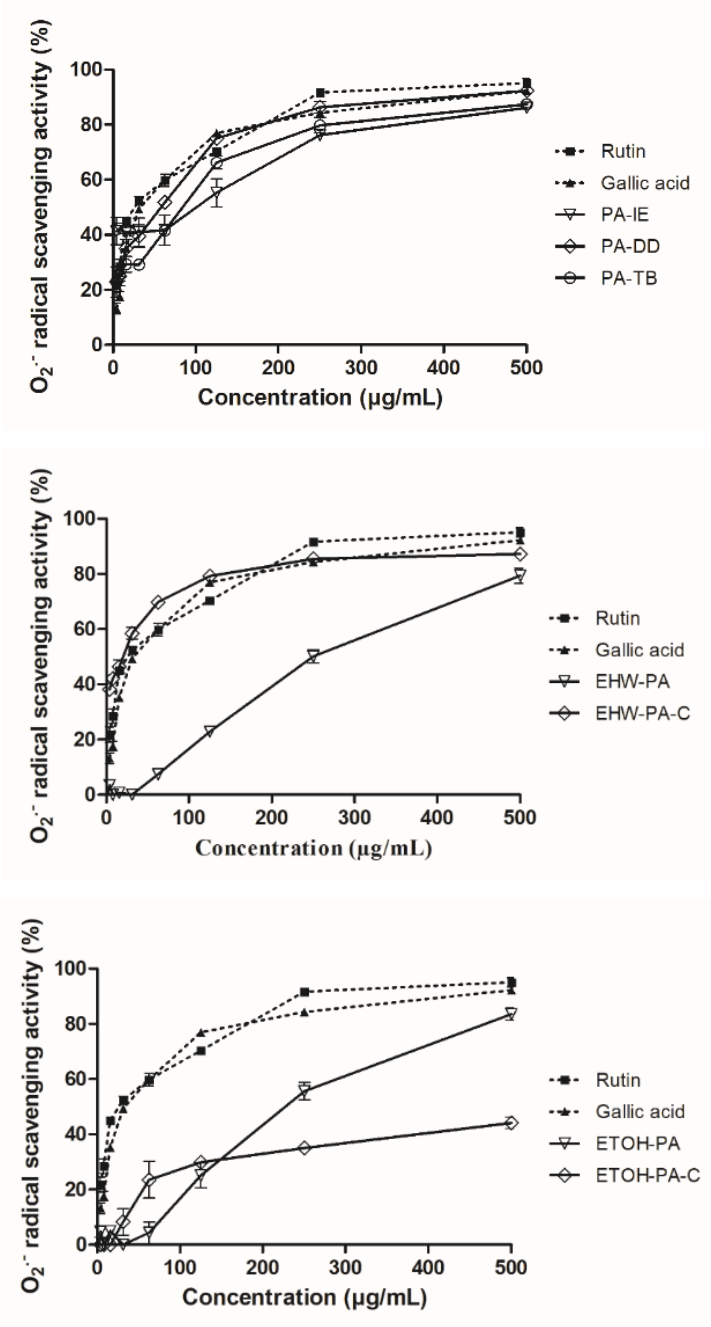


Fig. 4 Profile of the activity curves of $O_2^{\bullet-}$ radical scavenging of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre*

Determined in accordance with Nishikimi et al. [30] and Gomes et al. [31]; expressed as percentage of $O_2^{\bullet-}$ radical scavenging. Standards: BHT, rutin and chlorogenic acid; **A** - Traditional extractions: PA-IE (infusion), PA-DD (decoction) and, PA-TB (tincture); **B** - Hot water laboratorial extractions: EHW-PA (hot water) and EHW-PA-C (hot water extract after the C18); **C**- Hydroethanolic laboratorial extractions: ETOH-PA (hydroethanolic) and ETOH-PA-C (hydroethanolic extract after the C18).

Several authors have reported that flavonoids can efficiently inactivate free radicals. Flavonoids have three chemical structures, which appear to be related to antioxidant activities: (*a*) the double bond between C2 'and C3' of B ring, in catechol form with their hydroxyls at the 3' and 4' positions, confer a high scavenging ability, because they stabilize the radicals formed and also can act as chelation site of transition metals [50, 51]; (*b*) the presence of a double bond between C2 and C3 on C ring, appears to be involved in increasing scavenger activity, because it generates stability of the phenoxy radicals produced [50, 51]. This double bond (C2-C3) together with a carbonyl in position 4, further increase scavenger activity, because they facilitate the delocalizing electrons from the B ring, which stabilize by resonance, the radicals formed [50, 51]; (*c*) 3, 5 and 7 hydroxyl groups on A and C rings, together with carbonyl in C4, also increase the antioxidant activity of flavonoid [50, 51]. The carbonyl (C4), as well as, hydroxyls in C3 and C5, can also act as chelation points [50, 51]. Quercetin, one of the main molecules identified in the extracts obtained from the aerial parts of *P. acre*, has all the characteristics described for a flavonoid with a potent antioxidant capacity (Fig, 2). Isoquercetrin, eriodictyol, epicatechin, myricitrin and epicatechin gallate exhibit at least one of the structural characteristics that confer the antioxidant action of flavonoids. Despite the low correlation between the antioxidant activity and the flavonoid content, the antioxidant action of the extracts could be related mainly to the characteristics of the identified flavonoids, as well as of other molecules that were not characterized.

This study demonstrated that both the traditional and laboratory methods are efficient in extracting compounds from aerial parts of *P. acre*. The investigated extracts exhibited a presence of phenolic acids, such as rosmarinic acid; aglycone flavonoids, including quercetin, eridictyol, and taxifolin; and glycosylated flavonoids, such as isoquercitrin, rutin, and myricitrin, and therefore, have potential application in the pharmaceutical and food industries. A strong correlation between the content of total phenolic compounds and the antioxidant activity (ABTS and FRAP assays) was identified. Furthermore, we observed a low to moderate correlation between the flavonoid content and antioxidant activity. Additional studies that evaluate the biological properties, such as the anti-inflammatory activity, of these extracts will be a valuable contribution to the scientific knowledge associated with the medicinal use of this species.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Mazid MA, Datta BK, Bachar SC, Bashar SAMK, Nahar L, Sarker S. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Polygonum stagninum* (Polygonaceae). *Pharma Biol* 2010;48:770-774.

2. Dong X, Fu J, Yin X, Li X, Wang B, Cao S, Zhang J, Zhang H, Zhao Y, No J. Pharmacological and other Bioactivities of the Genus *Polygonum* - A Review. *Tropical J Pharma Res* 2014;13:1749-1759.

3. Martínez M, Benítez B, Alvarez S, Prieto R, Rolón M, Silva GVJ, Bravo JA, Vila JL. Determination of an active principle of *Polygonum punctatum* Elliot.: Full NMR spectra of stigmast-5-en-3β-ol (500/125 MHz). *Revista Boliviana de Química* 2017;34:14-27.

4. Lima SS, Moreira DL, Affonso VR, Henriques AB, Sato A, Esquibel MA, Leitão GG, Lage CL. Micropropagation of *Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* (Mart.) Meisn, and seasonal variation of tannins in acclimatized plants. *Journal Medicinal Plants Res* 2010;4: 573-578.

5. Choudhary RK, Oh S, Lee L. An ethnomedicinal inventory of knotweeds of Indian Himalaya. *J Medicinal Plant Res* 2011;5:2095-2103.

6. Almeida CE, Karnikowski MGO, Foleto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista Saúde Pública* 1995; 29:428-433.

7. Teixeira AH, Dalosto C, Bolassel C, Chagas AM, Bortoluzzi MAP, Juchem WRC. Efeito protetor do *Polygonum acre* H. B. K. sobre as hemorragias artificiais em camundongos. *Saúde* 1989;15:105-116.

8. Peng ZF, Strack D, Baumert A, Subramaniam R, Goh NK, Chia TF, Tan SN, Chia LS. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry* 2003;62:219-228.

9. Hsu CY. Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biol Res* 2006;39:281-288.

10. Hsu CY, Chan YP, Chang J. Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol Res* 2007;40:13-21.

11. Nikolaeva GC, Lavrent´eva MV, Nikolaeva IG. Phenolic compounds from several *Polygonum* species. *Chem Natural Comp* 2009;45;735-736.

12. Zhu W, Xue X, Zhang Z. Structural, physicochemical, antioxidant and antitumor property of an acidic polysaccharide from *Polygonum multiflorum*. *Int J Biol Macromolecules* 2017; 96:494-500.

13. Balasundram N, Sundran K, Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006;99:191-203.

14. Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. *Plantas Medicinais*. Viçosa: Editora UFV. 2003. 117-118.

15. ITF - Índice Terapêutico Fitoterápico. 1º Edição. Petrópolis: Editora EPub, 2008. ITF.

16. Ribeiro PGF, Diniz RC. *Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização* 2008. Londrina: Editora IAPAR.

17. Coimbra R. *Manual de Fitoterapia*. 2ª Edição. Belém: Editora Cejup;1994. 119-120.

18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Formulário de fitoterápicos: Farmacopeia Brasileira, 1º edição. Brasília, 2011. 126p.

19. Oliveira VS. Caracterização química e atividade antioxidante das inflorescências de *Musa paradisiaca* L. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

20. Infante J, Rosalen PL, Lazarini JG, Franchin M, Alencar SM. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. *PLoS One* 2016;11:1-13.

21. Fox JD, Robyt JF. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal Biochem* 1991;195:93-96.

22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

23. Singleton VL, Rossi Junior RJA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticulture* 1965;16:144-158.

24. Woiski RG, Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicultural Res* 1998;37:99-105.

25. Queiroz CRAA, Morais SAL, Nascimento EA. Caracterização dos taninos da aroeira-preta. *Sociedade de Investigações Florestais* 2002;26:485-492.

26. Willis RB, Allen PR. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst* 1998;123:435-439.

27. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999;26:1231-1237.

28. Al-Duais M, Müller L, Böhm V, Jetschke G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *Eur Food Res Technol* 2009;228:8313-821.

29. Müller L, Gnoyke S, Popken AMB, Ohm V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Sci Technol* 2010;43:992-999.

30. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemic Biophysic Res* 1972;46:849-855.

31. Gomes A, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto CGA, Cavaleiro JAS, Lima LFC. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorganic Med Chem* 2007;15:6027-6036.

32. Mukaka MM, Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 2012; 24:69-71.

33. Lima SS, Tavares ES, Moreira DL, Leitão GG, Esquibel MA. Anatomia de folha e caule e quantificação espectrofotométrica de fenóis totais e taninos da erva-de-bicho (*Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* Meisn.). *Braz J Botany* 2009;32:339-348.

34. Huang WY, Cai YZ, Corke H, Sun M. Comparative analysis of bioactivities of four *Polygonum* species. *Planta Medica* 2007;74:43-48.

35. Othman A, Mukhtar NJ, Ismail NS, Chang SK. Phenolics, flavonoids content and antioxidant activities of 4 Malaysian herbal plants. *Int Food Res J* 2014:759-766.

36. Smolarz HD. Chromatographical analysis of phenolic acids in some species of *Polygonum* L. genus - Part 2: Quantitative determination of the major components by high performance liquid chromatography (HPLC). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2000;69:21-23.

37. Smolarz HD. Flavonoids from *Polygonum lapathifolium* ssp. *Tomentosum*. *Pharm Biol* 2002;40:390-394.

38. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agri Food Chem* 2005;53:4290-4302.

39. Magalhães LM, Barreiros L, Maia MA, Reis S, Segundo MA. Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach. *Talanta* 2012;97:473-483.

40. Dawidowicz A, Olszowy M. Antioxidant properties of BHT estimated by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration. *Eur Food Res Technol* 2011*;*232:837-342.

41. Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, Hideg E. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules* 2016;21:208.

42. Ghazali MAM, Al-Naqeb G, Selvarajan KK, Hasan MH, Adam A. Apoptosis induction by *Polygonum minus* is related to antioxidant capacity, alterations in expression of apoptotic-related genes, and S-phase cell cycle arrest in HepG2 cell line. *BioMed Res Int* 2014;2014:1-13.

43. Shahraki E. Antioxidant activity of *Polygonum Patulum* M. Bieb. *Phytoscience* 2012;1:1-5.

44. Kamo T, Sato K, Sem K, Shibata H, Hirota M. Geranylgeraniol-type diterpenoids, boletinins A-J, from *Boletinus cavipes* as inhibitors of superoxide anion generation in macrophage Cells. *J Natural Products* 2004;67:958-963.

45. Lin HT, Nah SL, Huang YY, Wu SC. Potential antioxidant components and characteristics of fresh *Polygonum multiflorum*. *J Food Drug Anal* 2010;18:120-127.

46. Raja S, Ramya I. *In vitro* antioxidant activity of *Polygonum glabrum*. *Int J Phytomed* 2017;9:351-363.

47. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988;37:837-441.

48. Wilms LC, Kleinjans JCS, Moonen EJC, Briede JJ. Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes *in vitro. Toxicology in Vitro* 2008;22:301-307.

49. Furuno K, Akasako T, Sugihara N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids**.** *Biol Pharm Bulletin* 2002;23:19-23.

50. Bubolsa GB, Vianna DR, Medina-Remónd A, Poser G, Lamuela-Raventos RM, Eifler-Lima VL, Garcia SC. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2013;13:318-334.

51. Ozgen S, Kilinc OK, Selamoglu Z. Antioxidant activity of quercetin: A mechanistic review. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 2016;4(12):1134-1138.

Supplementary material

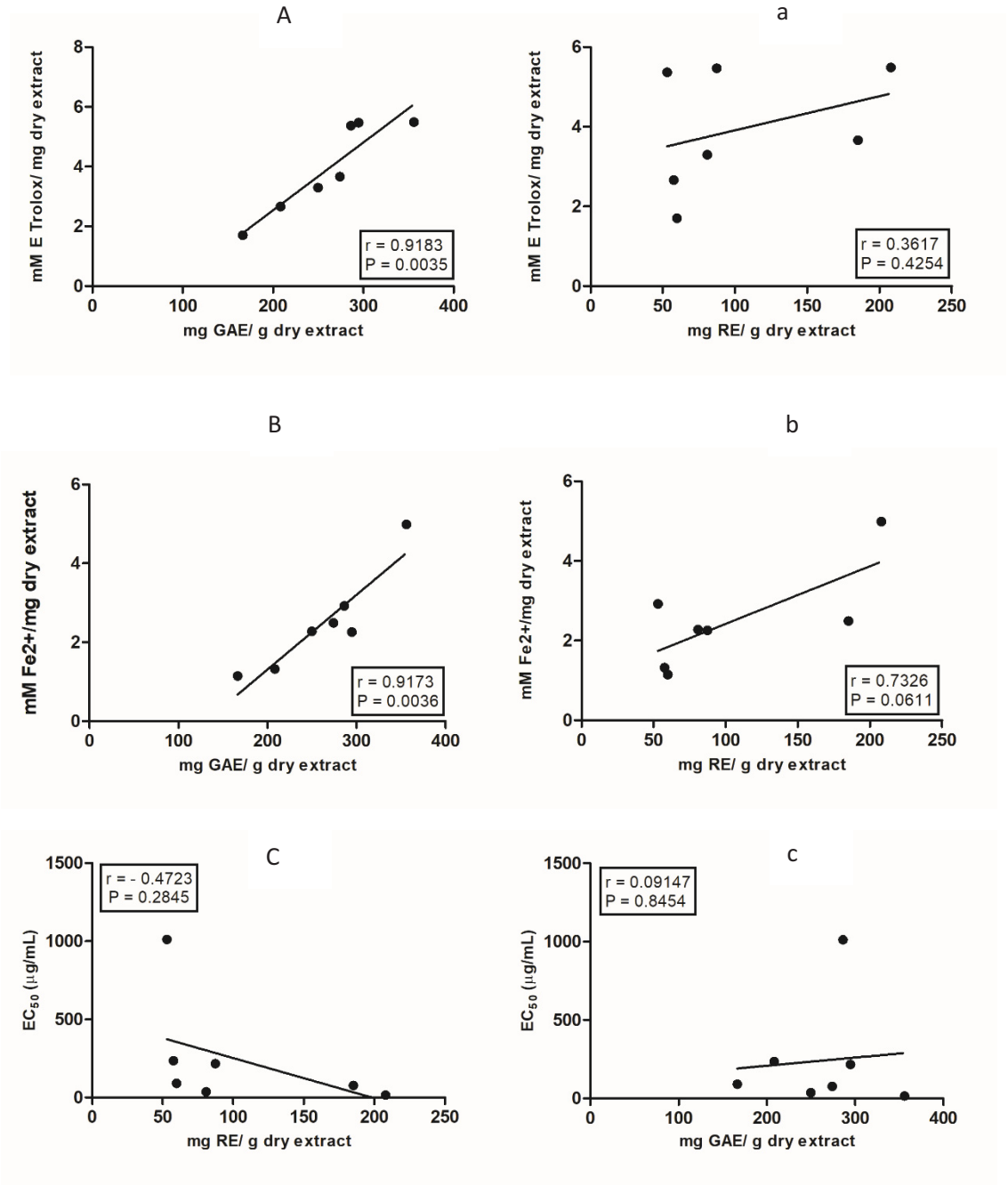


Fig. S1 Graphic illustration of Pearson's correlation between ABTS radical scavenging (A, a), ferric reducing antioxidant power (B, b), superoxide anion radical scavenging (C, c) and total phenolic (mg GAE/ g dry extract) or flavonoid (mg RE/ g dry extract) content of *Polygonum acre* extracts. The variables were found significantly correlated at $p \leq 0.05$ (Two-tailed).

SHORT COMMUNICATION I

***In vitro* antioxidant activity of the phenolic compounds presents in the inflorescences of *Musa paradisiaca* L.**

Formatado para a revista *International Journal of Secondary Metabolite* (ICDS - Miar 3.6)

Short communication: In vitro antioxidant activity of the phenolic compounds presents in the inflorescences of *Musa paradisiaca* L.

Melina Seyfried [1], Vanessa Staldoni-Oliveira [1], Luciano Henrique Campestrini [1, 2], Fernanda Bovo [3], Iara José Messias-Reason [3], Diogo Alexandre Siebert [2], Luciano Vitali [2], Gustavo Amadeu Micke [2], Selma Faria Zawadzki-Baggio [a], Juliana Bello Baron Maurer [1§]

[1] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, P.O. BOX 19046, 81531-900, Curitiba, PR, Brazil
[2] Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil
[3] Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, 80060-900, Curitiba, PR, Brazil
§ Corresponding author: Tel.: +55 41 33611576; Fax: +55 32662042.
E-mail address: jumaurer@ufpr.br ORCID Identifier, 0000-0001-6235-331X

Abstract: The purpose of this study was to elucidate the main phenolic compounds present in the aqueous and hydroethanolic extracts obtained from inflorescences of *Musa paradisiaca* and analyze the *in vitro* antioxidant activity. Hot aqueous extractions (1 hour, 60 ºC) and hydroalcoholic extraction (70%, v / v, 25 ºC, 10 days) were performed with the fresh inflorescences of *M. paradisica*. The extracts were analyzed chemically for their total content of phenolic compounds and flavonoids. The chemical characterization showed that EHW-I and EOH-I consist of extracts s rich in phenolic compounds. After SPE, phenolic compound content increased, and HPLC-ESI-MS/MS analyzes show that these extracts are abundant in rutin (5.247 ± 1.59 and 2.089 ± 0.299 m/g, respectively for EHW-I-C and ETOH-I-C). All samples were tested, *in vitro*, for the $ABTS^{\bullet-}$ scavenging capacity, iron reduction (FRAP) and $O_2^{\bullet-}$ sequestration. The EHW-I and EOH-I extracts showed antioxidant activity, but the SPE aqueous extract (EHW-I-C) was the most effective in all assays. The EOH-I-C extract showed low antioxidant activity in $O_2^{\bullet-}$ sequestration assay, and still showed a pro-oxidative character in the highest concentrations. In conclusion, both aqueous extracts of the inflorescences of *Musa paradisiaca* presented antioxidant activity in all assays carried out. The rutin and ferulic acid, can be contributors to activity for this extract.

ARTICLE HISTORY

Received: XXX
Revised: XXX
Accepted: XXX

KEYWORDS

Banana, Rutin, HPLC-ESI-MS/MS ABTS, FRAP.

1. INTRODUCTION

Low-to-moderate concentration, reactive oxygen species (ROS) act on physiological processes and are produced as a result of normal cellular metabolism. To keep ROS at appropriate physiological levels, living organisms have molecules and antioxidant enzymes that act to neutralize these reactive molecules. Changes in the balance of oxidants and antioxidants, due to endogenous and exogenous factors, lead to an increase in the concentration of ROS, which, in turn, can interact with cellular components such as proteins, lipids and DNA. This process, called oxidative stress, is associated with several pathologies such as cancer, neurological disorders, atherosclerosis, hypertension, ischemia, diabetes and respiratory diseases, such as asthma, for example [1]. Thus, exogenous antioxidants play a key role in living systems, to maintain the endogenous levels of ROS [2].

Phenolic compounds consist of the secondary class of metabolites most abundant in plants. They are widely distributed in the plant kingdom and have attracted the attention of researchers due to their potent antioxidant properties [3].

Musa paradisiaca L., consists of an herbaceous plant, belonging to the family Musaceae and originating in the southwest of the Pacific. It is currently widely distributed in tropical and subtropical regions and is used in traditional medicine for the treatment of dysentery, menorrhagia and diabetes [4].

Studies have shown that inflorescences of this plant species are a good source of phenolic antioxidant compounds [3]. Therefore, the objective of the work was to characterize the main phenolic compounds present in this structure, as well as its antioxidant activity.

2. METHOD

2.1 Chemical

Phenolic standards, TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nitroblue tetrazolium (NBT) and 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) were obtained from Amresco (Dallas, TX, USA). Methanol-grade HPLC was obtained from JT Baker (Xalostoc, Mexico). Water was purified using an ultra-purifier MS 2000 model from Gehaka (Sao Paulo, SP, Brazil). Folin-Ciocalteu reagent was obtained from Chromate (Sao Paulo, SP, Brazil). All other reagents were of analytical grade. The absorbances were read in a *BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer* (Winooski, USA) in a 6-well flat bottom microplates (Techno Plastic products, TPP AG®, Trasadingen, CH).

2.2. Plant material and extracts of the inflorescences

The inflorescences of *M. paradisiaca* were collected in Maringá (Paraná State, Brazil). The identification was carried out at the Municipal Botanical Museum of Curitiba (Parana State, Brazil), where an exsiccate is deposited on the MBM register: 367379.

Fresh inflorescences (40 g) were cut (2 × 2 cm) and homogenized with water (100 mL) for 10 min in a blender (Philips Walita Co, Varginha, MG, Brazil). The mixture was then placed in a water-bath for 60 min at 70 °C. The hot aqueous extract, was vacuum filtrated, concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C, freeze-dried, stored at - 4 °C in the dark, and designated EHW-I. The hydroalcoholic extract was prepared with of grinding and stirring of the fresh plant material (40 g) with aqueous ethanol 70% (v/v, 100 mL) for 10 min. After, the mixture was poured into glass beakers and stored at 25 °C, in the dark, for 10 days. The extract was vacuum filtrated, concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C, freeze-dried, stored at - 4 °C in the dark, and designated EOH-I.

The solid phase extraction (SPE) was performed for the removal of sugars in both samples (EHW-I and ETOH-I), according to the method described by Infante et al. (2016), using C18 SPE cartridges (Agilent Technologies, Inc., Cary, NC, USA). The new extracts were designated EHW-I-C and EOH-I-C.

Yields of the extract EHW-I and EOH-I were calculated in relation to the plant fresh mass, and the yields of the EHW-I-C and EOH-I-C were calculated in relation of the dry mass of EHW-I and EOH-I.

2.3 Contents of phenolic compounds and flavonoids

The content of total phenolic compounds was obtained through the microassay using the Folin-Ciocalteu reagent, adapted from Sigleton e Rossi (1965) in relation to an analytical curve of gallic acid (R^2 - 0.9948) and expressed as mg gallic acid equivalents per gram of dry extract (GAE mg/g). The dosage of total flavonoids was performed by the aluminum chloride-containing method described by Woisky e Salatino (1998), comparing the results with a standard curve of rutin. (R^2 - 0.9981) and expressed as mg rutin equivalents per gram of dry extract (RE mg/g).

2.4. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)

Analysis were conducted in an Agilent® 1200 chromatograph (Agilent Co.,

St. Clara, CA, USA), with a Phenomenex® Synergi™ Polar-RP 80A column (150 mm x 2 mm ID, particle size of 4 µm) at the temperature of 30 ºC. The eluent was formed by mixing solvents A (MeOH/H_2O in ratio of 95:5, v/v) and B (H_2O/formic acid 0.1%) as follows: 1st stage - 10% solvent A and 90% B (isocratic mode) for 5 min; 2nd stage - linear gradient of solvents A and B (from 10 to 90% of A) for 2 min; 3rd stage - 90% solvent A and 10% B (isocratic mode) for 3 min; 4th stage - linear gradient of solvents A and B (from 90 to 10% of A) for 7 min with a flow rate of 250 µL/min of mobile phase. In all analysis, the injected volume was 5 uL.

The liquid chromatograph was coupled to a mass spectrometry system consisting of a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer Qtrap® 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, USA) with TurboIonSpray® as ionization source, in negative ionization mode, with the following source parameters: ion spray interface at 400°C; ion spray voltage of 4500 V; curtain gas, 10 psi; nebulizer gas, 45 psi; auxiliary gas, 45 psi; collision gas, medium. The Analyst® software (version 1.5.1) was used for recording and processing the data. Pairs of ions were monitored in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode.

2.5. Antioxidant assays *in vitro*

2.5.1 *ABTS radical* capture *assays*

The antioxidant assay using the ABTS radical ($ABTS^{\bullet+}$) was performed according to the microassay adapted to that described by Re et al. (1999). Briefly, in a 96-well plate were pipetted 20 µl of sample (3.9 to 500 µg/mL), standard (Trolox, 12.5 to 200 µM) or phosphate buffer (method control) and 200 µL of the diluted and adjusted (absorbance of 0.7 ± 0.02) $ABTS^{\bullet+}$ radical solution. The plate remained at rest for 6 min in the dark and, an $ABTS^{\bullet+}$ radical capture was obtained at 734 nm. A linear regression (R^2 = 0.9947) was used to express the antioxidant activity in Trolox equivalents and the percentage of radical sequestration was calculated and expressed as mean ± SD, by the formula: antioxidant capacity (radical capture, %) = [(Ac– A)/ Ac] x 100**,** where Ac was the absorbance of the control, and A was the absorbance in the presence of the extracts or standards.

2.5.2 *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)*

The FRAP was determined by the method adapted from Müller et al. (2010) and consisted of adding 20 µL of the sample (3.9 to 500 µg/ml), standard (ferrous sulphate*,* 10 to 700 µM) or distilled water (method control), 30 µL of distilled water and 200 µL the FRAP reagent with further incubation at 37 ° C for 8 min. The absorbance readings at 595 nm. The FRAP solution consists of 10 parts of potassium acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 1 part of ferric chloride (20mM) and 1 part of the TPTZ solution (10mM in HCL 40mM). The FRAP values were calculated by linear regression on the standard curve ($FeSO_4.7H_2O$, 50 to 700 µM) and estimating concentrations in µM equivalents of Fe^{2+} per mg of dry extract (R^2 = 0.9963).

2.5.3 *Superoxide anion radical scavenging*

The superoxide radical ($O2^{\bullet-}$) scavenging was determined by a microassay adapted from Gomes et al. (2007). Briefly, in a 96-well plate were added 100µL of sample (3.9 to 500 µg/mL), 50 µL of NBT (645 µM in phosphate buffer, 19 mM, pH 7.4), and 50 µL of PMS (16.2 µM in phosphate buffer, 19 mM, pH 7.4). After gentle shaking, was added 100 µL of NADH (498 µM in phosphate buffer, 19 mM, pH 7.4) and the plate was incubated protected from light and room temperature for 5 minutes, then the reading was performed at 560 nm. As control of the method, phosphate buffer was used (19 mM, pH 7.4) and as an analytical standard, rutin and gallic acid were used in the concentration of 3.9 to 500 µg/mL The average percentages and the ± SD of anion $O2^{\bullet-}$ remaining were obtained from the equation: Scavenging activities (%) = [(Ac – A)/Ac)] x 100, where Ac was the absorbance of the control, and A was the absorbance in the presence of the

extracts or standards.

2.6 Statistical Analysis

The results were calculated as mean ± standard deviation (SD, $n = 3$). The results of tests were analyzed by One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test by using the program GraphPad Prism 5. The differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. The half maximal effective concentration (EC_{50}), corresponding to the concentration able to capture 50% of free radicals, was calculated using linear equations ($r^2 \geq 0.95$) obtained by linearizing the activity curves. Pearson's correlation was used to analyze the effects of the total phenolic or flavonoid content with the antioxidant activity. For the Pearson's correlation coefficient (r, Pearson's correlation coefficient) was considered the following values: r = 0.7 to 1 is high correlation; 0.5 to 0.7 is moderate correlation, 0.3 to 0.5 is low correlation and ≥ 0.3 is insignificant correlation [11].

3. FINDINGS

3.1. Yields and spectrophotometric chemical analysis

Table 1 shows the results for the yields and total contents of phenolic compounds and flavonoids presents in the samples obtained from the inflorescences of *M. paradisiaca*. As for yield, there was no difference in relation to extracts.

The content of phenolic compounds was higher in aqueous extraction (70.39 ± 1.24 GAE mg/g) than in hydroalcoholic (31.50 ± 2.56 GAE mg/g). After the SPE procedure, the phenolic content was 288.64 ± 6.37 and 60.21 ± 1.38 GAE mg/g, for the EHW-I-C and EOH-I-C, respectively. These results demonstrate that this method was efficient in the removal of outliers from samples, where there was an increase of about 310% and 91% of the content of phenolic compounds, respectively, for EHW-I-C and EOH-I-C.

This pattern was also observed in the dosage through the complexation of flavonoids with aluminum chloride. EHW-I, like phenolic compounds, presented higher levels of flavonoids (19.91 ± 0.79 RE mg/g), and the SPE, also favored the increase of this content for the aqueous extraction, EHW-I-C (53.78 ± 0.45 RE mg/g), when compared to the contents presented by hydroalcoholic extracts, EOH-I e EOH-I-C, 10.39 ± 3.67 and 42.20 ± 5.38 RE mg/g, *r*espectively.

Table 1. Yields and content of phenolic compounds and flavonoids from the aqueous and hydroalcoholic extracts obtained from inflorescence of *Musa paradisiaca*

	Yields[1]	Phenolics [2]	Flavonoids[3]
EHW-I	1.8*	70.39 ± 1.24 [a]	19.91 ± 0.79 [a]
EOH-I	2.0*	31.50 ± 2.56 [b]	10.39 ± 3.67 [b]
EHW-I-C	19**	288.64 ± 6.37 [c]	53.78 ± 0.45 [c]
EOH-I-C	21**	60.21 ± 1.38 [d]	42.20 ± 5.38 [d]

[1] Calculated as dry weight in relation to the original *fresh material and **dry material; expressed as a percentage. [2] Determined according to the method described by Singleton e Rossi Jr [6]; expressed as mg gallic acid equivalents *(*GAE) per gram of dry extract. [3] Determined according to the method described by Woisky e Salatino [7]; expressed as mg rutin equivalents (RE) per gram of dry extract. Data are presented as mean ± SD and different letters in each column represent statistically significant differences between samples by Tukey test ($p \leq 0.05$).

3.2. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)

Due to the high content of phenolic compounds and flavonoids, the extracts EHW-I-C e EOH-I-C were analyzed in HPLC-ESI-MS/MS. Of the 46 analyzed standards (Table S1), only 6 were found in the samples, as shown in Table 2. These, two are phenolics acids and four are flavonoids. The profile of both extracts is very similar. Both samples presented, as major phenolic compounds in this analysis, ferulic acid and rutin. However, the aqueous extract (EHW-I-C) presented the highest levels, 1.568 ± 0.125

mg/g for ferulic acid and 5.247 ± 1.590 mg/g for rutin (Table 2).

Table 2. Quantitative analysis of phenolic compounds presents in EHW-I-C and EOH-I-C by HPLC-ESI-MS/MS

Standards	EHW-I-C	EOH-I-C
p-coumaric acid	< LQ	< LQ
Ferulic acid	1.568 ± 0.125	0.337 ± 0.166
Quercetin	0.077 ± 0.054	0.094 ± 0.011
Taxifolin	0.056 ± 0.028	0.022 ± 0.012
Isoquercittrin	0.039 ± 0.008	0.032 ± 0.022
Rutin	5.247 ± 1.590	2.089 ± 0.299

Result expressed in mg per gram of dry extract. LQ = Limit of Quantitation

3.3 Antioxidant assays *in vitro*

All extracts demonstrated antioxidant activity in ABTS and FRAP *in vitro* assays, as seen in Table 3. A high Pearson correlation coefficient (Figure S1) was observed regarding the content of phenolic compounds and antioxidant activity for ABTS (r = 0.9650, p = 0,0350) and FRAP (r = 0.9814, p = 0.0186). However, this correlation coefficient cannot be confirmed for flavonoids in ABTS (r = 0.9001, p = 0.0999) and FRAP (r = 0,8160, p = 0.1832). In $O2^{\bullet-}$ scavenging, only the aqueous extracts showed activity. The EC_{50} for EHW-I was 341.30 ± 0.68 µg/mL and, after SPE, the activity improved by about 90%, where the EC_{50} for EHW-I-C was 31.07 ± 6.41 68 µg/mL. The hydroalcoholic crude extract (EOH-I) did not show activity in the superoxide anion scavenging (Figure S2 A) and the extraction before the SPE with C18 column (EOH-I-C) still showed a pro-oxidant character, despite the great content of rutin (Figure S2).

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

Inflorescences of other species of the genus *Musa* presented variable values in relation to the content of phenolic compounds and flavonoids. The ethanolic extract (100%, 6 days) of the inflorescence of *M. balbisiana*, showed high content of phenolic compounds (92.01 ± 0.40 GAE mg/g), however, lower than flavonoids (4.85 ± 0.40 quercetin equivalents mg/g) [12], while, the hydroalcoholic extract (50%, v/v, 30 min) of the inflorescence of *M. cavendishii* presented both lower levels, 16.90 GAE mg/g and 3.54 RE mg/g [13]. The difference in results may have been due to different extraction conditions. The profile of phenolic compounds obtained from the HPLC-ESI-MS / MS analysis of the EHW-I-C and EOH-I-C extracts obtained from the inflorescences of *M. paradisiaca*, are like that found in the crude hydroalcoholic extracts of the leaves of

Table 3. Antioxidant activity of the extracts obtained from the inflorescence of *Musa paradisiaca*

	[1] $ABTS^{\bullet+}$	[2] FRAP	[3] $O_2^{\bullet-}$
EHW-I	0.82 ± 0.02[a]	0.43 ± 0.03 [a]	341.30 ± 0.68
EOH-I	0.72 ± 0.04[b]	0.51 ± 0.07[a]	-
EHW-I-C	3.04 ± 0.40 [a]	2.63 ± 0.03 [a]	31.07 ± 6.41
EOH-I-C	1.41 ± 0.06[a]	0.77 ± 0.02 [b]	-
BHT	*1.92 ± 0.15[a]*	*0.26 ± 0.015 [a]*	-
Rutin	*9.77 ± 0.09[b]*	*10.78 ± 0.29 [b]*	*26.43 ± 1.03*
Gallic acid	*28.25 ± 0.9[c]*	*19.97 ± 0.57 [c]*	*36.08 ± 1.04*

[1] Determined according to the method described by Re et al. (1999); expressed as mM Trolox equivalents per gram of dry extract. [2] Determined according to the method described by Müller et al. (2010*); expressed as* mM Fe^{2+} equivalents per gram of dry extract. [3] Determined according to the method described by Gomes et al. (2007); expressed as EC_{50} (µg/mL). - not determined. Data are presented as mean ± SD and different letters in each column represent statistically significant differences between samples by Tukey test ($p \leq 0.05$).

this species, where the major compound found, was also the flavonoid rutin [14].

Many secondary plant metabolites can act as pro-oxidant molecules, depending on the reaction conditions [15]. This property may also be directly related to the number of hydroxyls present in the molecule. Mono and dihydroxylated flavonoids, in studies, did not demonstrate pro-oxidative activities, however, multiple hydroxyls, especially in ring B, can increase the production of radicals, such as hydroxyl [16]. Thus, additional studies are needed to elucidate the components that would be causing the pro-oxidant character in the $O_2^{\bullet-}$ scavenging in the hydroethanolic extract.

It can be concluded that the inflorescences of *M. paradisiaca* are rich in phenolic compounds, like the rutin and ferulic acid could be related to the relevant antioxidant activity obtained by the aqueous extract after SPE.

Acknowledgement

The authors thank CAPES for the fellowship granted to M. Seyfried. We are grateful to PROEX-CAPES for its partial financial support.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

5. REFERENCES

[1] Bibern, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal, 5 (1), 9-19.

[2] Bouayed, L.; Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 3, (4), 228-237.

[3] Dai, J.; Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15, 7313-7352.

[4] Imam, M. Z.; Akter, S. (2011). *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A Phytochemical and pharmacological review. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1 (5), 14-20.

[5] Infante, J.; Rosalen, P. L.; Lazarini, J. G.; Franchin, M.; Alencar, S. M. (2016). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. PLoS One, 11 (4).

[6] Singleton, V. L.; Rossi Jr, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16 (3), 144- 158.

[7] Woisky, R. G.; Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research, 37 (2), 99-105.

[8] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26 (9/10), 1231–1237.

[9] Müller, L. Gnoyke, S.; Popken, A, M.; Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and

related parameters of different fruit formulations. LWT - Food Science and Technology, 43, 992-999.

[10] Gomes, A.; Fernandes, E.; Silva, A. M. S.; Santos, C. M. M.; Pinto, C. G. A.; Cavaleiro, J. A. S.; Lima, L. F. C. (2007). 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. Bioorganic & Medicinal Chemistry,15 (18), 6027-6036.

[11] Mukaka, M. M. (2012). Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research, Malawi Medical Journal; 24(3), 69-71.

[12] Revadigar, V.; Al-Mansoub, M. A.; Asif, M.; Hamdan, M. R.; Majid, A. M. S. A.; Asmawi, M. Z.; Murugaiyah, V. (2017). Anti-oxidative and cytotoxic attributes of phenolic rich ethanol extract of *Musa balbisiana* Colla inflorescence. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7 (05), 103-110.

[13] Schmidt, M.; Prestesa, R. C.; Kubota, E. H.; Scapin, G.; Mazutti, M. A. (2015). Evaluation of antioxidant activity of extracts of banana inflorescences (*Musa cavendishii*). CyTA – Journal of Food, 13.

[14] Kappel, V. D.; Cazarolli, L. H.; Pereira, D. F.; Postal, B. G.; Madoglio, F. A.; Buss, D. F.; Reginatto, F. H.; Silva, F. R. M. B. (2013). Beneficial effects of banana leaves (*Musa* x *paradisiaca*) on glucose homeostasis: multiple sites of action. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 23 (4), 706-715.

[15] Chobot, V.; Hadacek, F. (2011). Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. Redox Report, 16 (6), 242-24.

[16] Procházková, D., Boušová, I.; Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia, 82, 513-523.

Supplementary material

Table S1. Qualitative analysis of phenolic compounds presents in EHW-I-C and EOH-I-C by HPLC-ESI-MS/MS

Standard phenolic compounds	EHW-I-C	EOH-I-C
4-Aminobenzoic acid		
Salicylic acid		
Cinnamic acid		
4-Anisic Acid		
Vanillin		
Mandelic acid		
4-(Hydroxymethyl)benzoic acid		
Protocatecuic *acid*		
Umbelliferone		
P-coumaric acid	**x**	**x**
Methoxyphenylacetic acid		
Vanillic acid		
Gallic acid		
4-Methylumbelliferone		
Coniferaldehyde		
Caffeic acid		
Syringaldehyde		
Scopoletin		
Ferulic acid	**x**	**x**
Syringic acid		
Sinapaldehyde		
Synaptic Acid		
Resveratrol		
Chrysin		
Pinocembrin		
Galangin		
Apigenin		
Naringenin		
Kaempferol		
Fustin		
Eriodictyol		
Aromadendrin		
Epicatechin		
Catechin		
Hispidulin		
Ellagic acid		
Quercetin	**x**	**x**
Taxifolin	**x**	**x**
Epigallocatechin		
Myricitrin		
Carnosol		
Chlorogenic acid		
Rosmarinic acid		
Epicatechin gallate		
Isoquercitrin	**x**	**x**
Naringin		
Rutin	**x**	**x**

Figure S1. Graphic illustration of Pearson's correlation between ABTS radical scavenging (A, a), ferric reducing antioxidant power (B, b) and total phenolic (mg GAE/ g dry extract) or flavonoid (mg RE/ g dry extract) content of *Musa paradisiaca* extractions. The variables were found significantly correlated at $p \leq 0.05$ (Two-tailed).

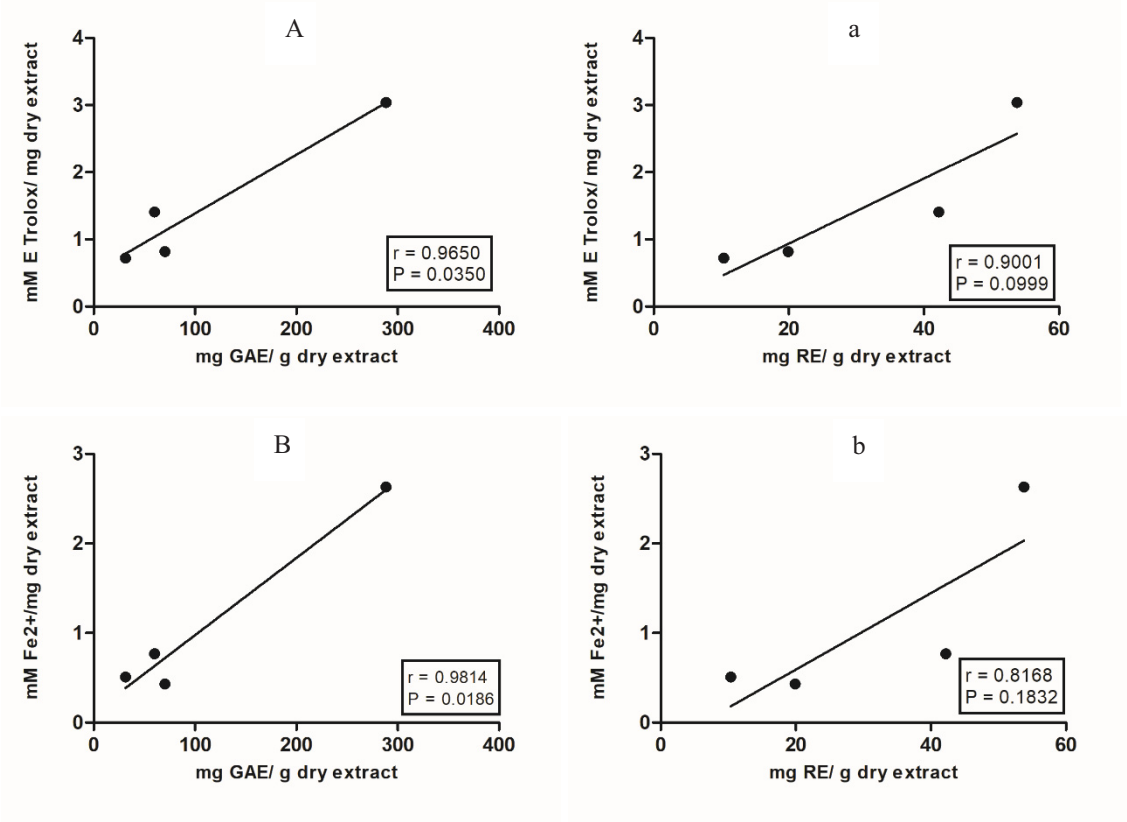
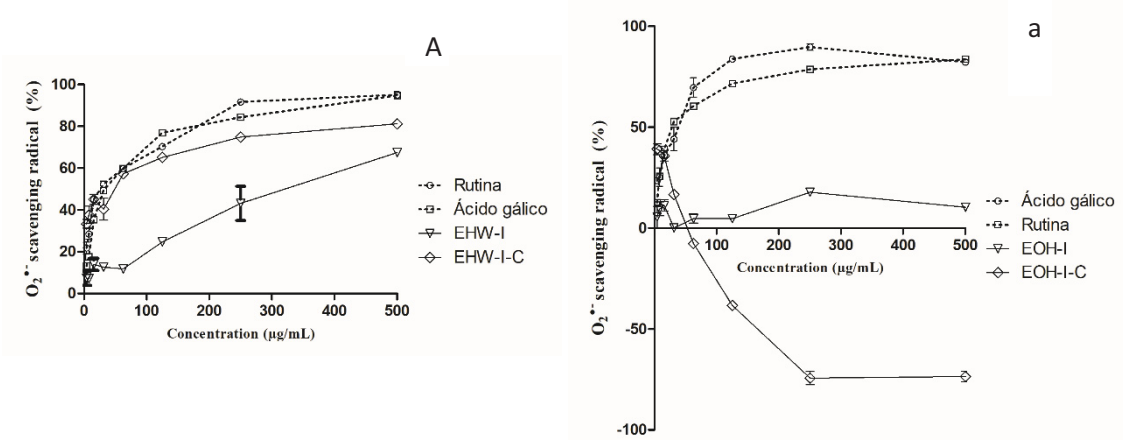


Figure S2. Profile of the activity curves of the $O_2^{\bullet-}$ radical scavenging of the aqueous (A) and hydroalcoholic (a) extracts obtained from the inflorescnces of *Musa paradisiaca*



SHORT COMMUNICATION II

In vitro ovicidal and larvicidal activity of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre* H. B. K.

Formatado para a revista *Journal of Parasitology Research* (Research gate: 2.81) - Qualis B3 - CBII

Research Article

Short Communication: *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre* H. B. K

Melina Seyfried [1], Andressa Soldera da Silva [1], Luciano Henrique Campestrini[2], Selma Faria Zawadzki-Baggio [1], Marcelo Beltrão Molento [3], Juliana Bello Baron Maurer [1§]

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, P.O. BOX 19046, 81531-900, Curitiba, PR, Brazil
[2] Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil
[3] Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, 80035-050, Curitiba, PR, Brazil
§ Corresponding author: Tel.: +55 41 33611576; Fax: +55 32662042.
E-mail address: jumaurer@ufpr.br ORCID Identifier, 0000-0001-6235-331X

Abstract

The resistance of parasites to commercial anthelmintic molecules is a worldwide problem. The helminths, like a *Haemonchus contortus*, has resistance to all classes of commercial drugs and, in this way, the search for new molecules or alternative treatments is extreme necessity. All structures of *Polygonum acre* are used traditionally in folk medicine, thus, this plant was chosen for anthelmintic analysis. The egg hatch test demonstrated that both extracts of the aerial parts of *P. acre* showed significant ovicidal activity on *H. contortus* eggs, with IC_{50} = 514.95 ± 6.73 e 817.36 ± 28.55 µg/mL, respectively for EHW-PA and ETOH-PA. In the analysis of phenolic compounds in HPLC, with the most effective ovicidal extract (EHW-PA), demonstrated the presence of gallic acid, rutin and quercetin, which may be acting in the anthelmintic activity.

1. Introduction

Internal parasitism, or gastrointestinal parasitism, is one of the major problems in the production of ruminants around the world [1]. *Haemonchus contortus* is one of the main responsible for the reduction of weight gain, productivity (meat, wool or milk) and mortality, especially in young animals [2]. The control of this parasite is based on the repetitive administration of anthelmintics [3], however, due to the indiscriminate use of these drugs, the emergence of a global problem arose: resistant parasites appeared to the main classes of antiparasitic chemical molecules [1]. Thus, the search for alternatives for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants is currently extremely important. The chemical compounds from medicinal plants, have been gaining prominence as a source of potentially therapeutic molecules [3].

Polygonum acre H.B.K., is an herbaceous plant, belonging to the family Polygonaceae, widely used in traditional medicine [4]. Thus**,** the purpose of this study was to analyze *in vitro* ovicidal and larvicidal activities of extracts obtained from the aerial parts of *P. acre* on eggs and larvae of *H. contortus*.

2. Methods

2.1 Aqueous and hydroalcoholic extractions of aerial parts of Polygonum acre

The aerial parts of *P. acre* obtained commercially (Chá & Cia - Ervas Medicinais, São José dos Campos, BR), were used to obtain the hot aqueous (6.7%, m/v, 1.5 L, 70 ºC, 60 min) and hydroalcoholic extraction (70%, v/v, 12%. m/v, 10 days in the dark, 25 ºC). After, both extracts, were vacuum filtrated, concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40°C, freeze-dried,

stored at - 4 °C in the dark, and designated, respectively, EHW-I and EOH for hot aqueous and hydroalcoholic extract.

2.2 Qualitative phytochemical screening

The extracts were qualitatively analyzed, following the methodologies described by Matos [5], for the presence of: anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids (differential pH test), saponins (permanent lather formation with pH change), cyanogenic heterosides (picrate-impregnated paper, amino groups (ninhydrin tests), tannins and polyphenols (test for ferric chloride, gelatin and lead acetate), flavonoids (Shinoda reaction, reaction with aluminum chloride and Pew reaction), steroids and/or triterpenes (Lieberman-Burchard's test), alkaloids (Dragendorff's reagent), coumarins (reaction with potassium hydroxide and ultraviolet light), anthraquinones or anthraquinone heterosides (reaction with potassium hydroxide and with hydrogen peroxide).

2.3 High-performance liquid chromatography analysis (HPLC)

The phenolic analysis was conducted using an Agilent 1200 Series high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Co., St. Clara, CA, USA) equipped with a vacuum degasser (G1322A), quaternary pump (G1311A), manual injector (Rheodyne, 7725i), and a multi UV-VIS wavelength detector (G1365D) operating at a wavelength of 254, 280, 300, 325, and 375 nm, using an Agilent Eclipse XDB-C-18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size). The mobile phase used was the following elution gradient with acetonitrile: 5% (0 - 5 min), 10% (5 – 10 min), 30% (10 – 20 min), 50% (20 - 30 min) e 5% (30-35 min) at a flow rate of 1 mL/min. The standards were prepared individually in methanol at a concentration of 100 µg/mL. Twenty microliters of the sample were injected through a manual injector. The samples were diluted in methanol:water (1:9 v/v) at a concentration of 5 mg/mL and filtered through a 0.22-µm membrane filter (JetBiofil, Guangzhou, China) prior to injection. The phenolic compounds were identified by comparing their retention times with standards. The EZChrom Elite program via Windows 7 was used for system control and data analysis.

2.4 In vitro anthelmintic activity

Authorization for the use of laboratory animals was obtained from the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Parana (n° 065/2015).

2.4.1 The egg hatch test (EHT)

The EHT was performed using the methodology described by Bizimenyera et al. [6]. Eggs were recovered from the feces of sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes and fecal culture analysis showed *H. contortus* as the predominant nematode (95%) species. For the assay, the feces were homogenized in water (30ºC) and were filtered successively through decreasing sieve sizes (1 mm, 150, 75, 56, and 25 µm). The eggs that were retained in the final filter were collected and centrifuged for 2 min at 140 x g. The supernatant was removed, and sucrose solution (0.9 M, d = 0.375 g/mL, 25 °C) was added. In this condition, the eggs floated allowing their easy collection. The eggs obtained from this process were transferred to a plastic 12-mL tube and were, again, washed with distilled water (30 ºC), and re-suspended in distilled water. The egg concentration was counted via an optical microscope (SM-LUX model, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Germany). The egg suspension was distributed into 24-well plates (100 eggs/well) together with the extracts (50, 250, 500, 1000µg/mL), in a total volume of 1 mL. Test samples for the negative control (distilled H_2O) and a positive control (Albendazole sulfoxide, 60 µg/mL) were obtained in parallel. The plates were maintained in a BOD-type incubator (Biological Oxygen Demand, Eletrolab, Sao Paulo, Brazil) at 25 °C for 24 h. The egg hatch was blocked by

the addition of Lugol's iodine solution and the readings was made on the inverted microscope (INV 100 model, Bel Engineering, Monza, Italy). The results are expressed as percentages of inhibition of egg hatch, determined by the formula: (number of eggs / (number of eggs + number of L1) × 100, considering (L1) = L1 larvae; (eggs) = eggs not hatched.

2.4.2 Larval migration test (LMT)

The LMT was determined using the method described by Demeler et al. [7]. Larvae L3 of *H. contortus* (95%, until 30-day old) were incubated with a solution of 0.3% (v/v) of sodium hypochlorite for 1 h at 25 °C, in order to remove the cuticle. After that, they were washed (3 x) with distilled water and were quantified and distributed into 24-well plates (200 larvae/well). The plant extracts with a final concentration of (50, 100, 500, 1000 µg/mL), were added, and the plates was incubated in a BOD at 25 ºC for 6 h. Tests using a negative control (distilled water) and a positive control (Ivermectin at 100 µg/mL final concentration) were performed in parallel. After the first incubation, the material was transferred to plates with apparatus containing a mesh size 22 µm nylon membrane, and incubated at the same conditions, but with a bellow source of light (150 Watts) to stimulate L3 migration. After 18 h, the apparatus was removed, and the L3 that migrated were counted using an inverted microscope. The L3 that did not migrate were also counted. The average number of L3 that migrated, for each tested concentration, was transformed into the percentage of migration

2.5 Statistical Analysis

The results of the EHT and LMT tests ($n = 3$) were analyzed by One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test by using the program GraphPad Prism 5. The differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. The concentrations of the extract that inhibited 20, 50, and 90% of egg hatching, expressed as IC_{20}, IC_{50}, and IC_{90}, were calculated using linear equations ($R^2 \geq 0.98$) obtained by linearizing the activity curves by using the program GraphPad Prism

3 Results and Discussion

Both extracts showed a similar profile in the phytochemical screening, as observed in Table 1. The only difference was the presence of terpene/steroids in ETOH-PA. This result is expected, due to the hydrocarbon character of these molecules conferring non-polar characteristics [8]. The presence of this class of molecules is known in the genus *Polygonum*, because the polygodial, a sesquiterpene dialdehyde which has been researched due to its antibiotic and antifungal activity [9]. However, this molecule is apparently not effective in anthelmintic activity.

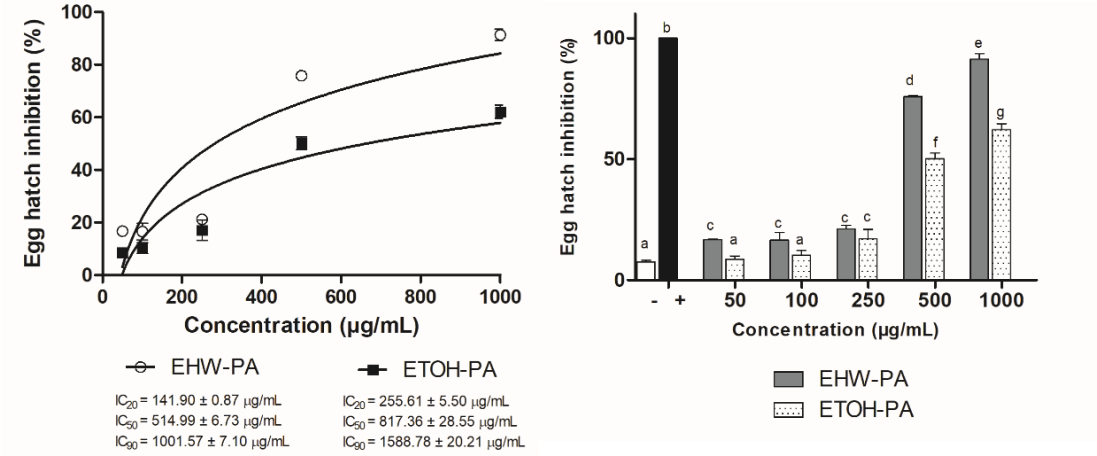
Table 1 - Qualitative chemical characterization of the extracts obtained from the aerial parts of *Polygonum acre*

Secondary metabolite	EHW-PA	ETOH-PA
Anthocyanic heterosides	Inc.	Inc.
Saponins	+	+
Cyanogenic heterosides	-	-
Amino groups	+	+
Tannins	+	+
Flavonoids	+	+
Steroids and/or triterpenes	-	+
Coumarins	+	+
Quinones	+	+

Anthocyanic heterosides = anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids; Quinone = anthraquinones or anthraquinone heterosides; +: Positive result for the presence of compound; -: Negative result for the presence of compounds.

The activity of the ETOH-PA extraction (IC_{50} = 817.36 ± 28.55µg/mL) in inhibited *H. contortus* egg hatching, was statistically lower ($P \leq 0.0001$) than that presented by the EHW-PA extraction (EC_{50} = 514.95 ± 6.73 µg/mL, as shown in Figure 1 (A, a). approximately 91.29% (± 2.2) egg hatching, while the ethanolic extraction, in the

Figure 1 Egg hatch inhibition of the aqueous (EHW-PA) and hydroalcoholic (EOH-PA) extracts obtained from aerials parts of *Polygonum acre* using the Egg Hatch Test.



(-) H_2O; (+) Albendazole (60 µg/mL). Different letters in each column represent significant difference compared to negative control (H_2O) determined using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

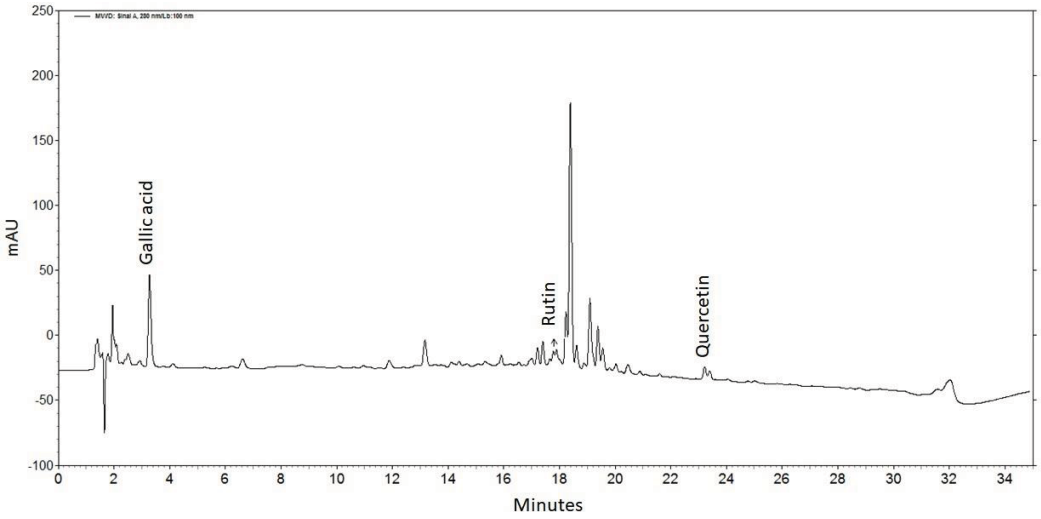
same contraction, inhibited about 62.08% (± 2.52).

At the highest concentration tested (1000 µg/mL), he aqueous extract inhibited

Regarding LMT (Figure S1), approximately 81.6% (± 3.5) of larvae treated with ivermectin (100 µg) did not migrate through the apparatus. Polyphenolic compounds are known to have anthelmintic activity [10] and study shows that exsheathed larvae were susceptible to the action of the tannins [11]. However, despite the positive result for the presence of tannins (Table 1), EHW-PA and ETOH-PA did not affect L3 motility at the concentrations tested (Fig. S1). The results obtained by these extracts were statistically similar ($P \leq 0.0001$) to the negative control (distilled H2O), 5.6% (± 0.4).

To better understand the ovicidal activity of EHW-PA, this extract was analyzed for the content of phenolic compounds. According to the retention times obtained by phenolic compound standards, it was possible to identify the presence of gallic

Figure 2 - HPLC profile at 280 nm of the aqueous (EHW-PA) extract obtained from the aerials parts of *Polygonum acre*



acid (3.38 min), rutin (17.96 min) and quercetin (23.43 min), the Figure 2 show the HPLC profile at 280 nm. Nikolaeva, Lavrentéva e Nikolaeva [12] also found these compounds in the analysis of the phenolic content by HPLC (acetonitrile: acetic acid, 15:80; 20:80; 36:74) the aerial parts of 4 other species of the genus *Polygonum* (*P. divaricatum*, *P. angustifolium*, *P. amphibium* e *P. aviculare*).

Phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids, may be influencing the ovicidal activity of the aerial parts of *Polygonum acre*, thus further studies of chemical characterization are required.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest

Acknowledgement

The authors wish to thank CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*) for the doctoral fellowship granted to M. Seyfried. We are also grateful to PROEX-CAPES (*Programa de Excelência Acadêmica*) for its partial financial support. This work did not receive any specific grant

References

[1] Albuquerque, A. C. A., Basseto, C. C., Almeida, F. A., Amarante, A. F. T. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. Veterinary Parasitology, vol. 246, p. 112-117, 2017.

[2] El-Ashrsm, S.; Nasr, I.; Mehmood, R.; Hu, M.; Suo, X. Haemonchus contortus and ovine host: a restrospective review. International Journal of Advanced Research, vol. 5, n.3, p. 972-999, 2017.

[3] Kamaraj, C., Rahuman, A. A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. Research in Veterinary Science, vol. 91, p. 400-404, 2011.

[4] Lima, S. S., Tavares, E. S., Moreira, D. L., Leitão, G. G, Esquibel, M. A. Anatomia de folha e caule e quantificação espectrofotométrica de fenóis totais e taninos da erva-de-bicho (*Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* Meisn.). Brazilian Journal of Botany, vol. 32, p. 339-348, 2009.

[5] Matos, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental, 3ª ed. EUFC: Fortaleza, 2009.

[6] Bizimenyera, E. S., Githiori, J.B., Eloff, J.N., Swan, G.E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. Veterinary Parasitology. 142, 336-343, 2006.

[7] Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J., von Samson-Himmelstjerna, G. 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. Vet. Parasitol. 174, 58-64.

[8] Jiang, Z.; Chappell, J.; Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. Current protocols in plant biology.vol., p. 345-358, 2016.

[9] Just, J.; Jordan, T. B.; Paull, B.; Bissember, A. C.; Simith, J. A. Practical isolation of polygodial from *Tasmannia lanceolata*: a viable scaffold for synthesis. Organic & Biomolecular Chemistry, vol. 13, p. 11200-11207, 20015.

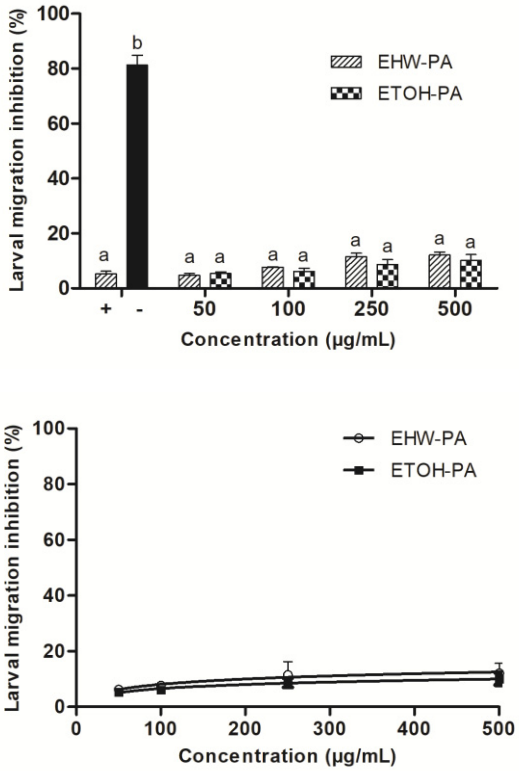
[10] Fouche, G.; Sakong, B. M.; Adenubi, O. T.; Pauw, E.; Leboho, T.; Wellingston, K. W.; Elof Anthelmintic activity of acetone extracts from South African plants used on egg hatching of *Haemonchus contortus.*

[11] Molan, A. L.; Hoskin, S. O.; Barry, T. N.; McNabb, W. C. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. The Veterinary, vol. 8, p. 44-48, 2000.

[12] Nikolaeva, G. G.; Lavrentéva, M. V.; Nikolaeva, I. G. Phenolics compounds from several *Polygonum* species. Chemistry of Natural Compounds, vol. 45, n. 5, p. 735-736, 2009.

Supplementary material

Fig. S1. Larval migration inhibition of the aqueous (EHW-I) and hydroalcoholic (EOH-I) extracts obtained from the aerials parts of *Polygonum acre* on the Larval Migration Test



(-) H_2O; (+) Ivermectin (100 µg/mL). Different letters in each column represent significant difference compared to negative control (H_2O) determined using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

6. CONCLUSÕES

Com o trabalho pode-se concluir que:

- As inflorescências de *Musa paradisiaca* e as partes aéreas de *Polygonum acre* consistem de uma estrutura rica em compostos fenólicos;
- Ambas as frações apresentaram caráter ovicida frente aos ovos de *Haemonchus contortus* e que esta atividade estaria relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos.
- Apesar das análises químicas demonstrarem que a rutina é o flavonoide mais abundante nas frações de *M. paradisiaca*, provavelmente, não seja ela que esteja conferido a ação anti-helmíntica, pois isolada não apresentou atividade sobre a eclosão dos ovos. A sua atividade ovicida, possivelmente, está relacionada com a presença de compostos como o ácido clorogênico., enquanto que em *P. acre*, estaria relacionada outros compostos fenólicos.
- O processo de SPE foi eficiente para a remoção de substâncias indesejáveis nas frações, aumentando o teor de compostos fenólicos, as quais, estão estritamente relacionados com a capacidade antioxidantes destas frações, principalmente em relação as frações de *P. acre;*
- As preparações tradicionais com as partes aéreas desta espécie, são ricas em carboidratos, proteínas e, principalmente, de compostos fenólicos. A maior diferença seria em relação a dosagem terapêutica pois, enquanto que as infusões e decocções são administradas na forma de chá e em relação ao quantidades de xícaras/dia, as tinturas são ministradas, geralmente, na forma de gotas;
- Por fim, que as frações obtidas de ambas as espécies vegetais, possuem moléculas promissoras para serem utilizadas em preparações anti-helmínticas e antioxidantes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, K.; RIZWANI, G. H.; ZAHID, H.; ASIF, A. Pharmacognostic evaluation of *Musa paradisiaca* L. Bract, flower, trachea and tracheal fluid. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol. 4, n. 4, p. 1461-1475, 2015.

ABONGWA, M.; MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P. Brief review on the mode of action of antinematodal drugs. **Acta Veterinaria**, vol. 67, n. 2, p. 137-152, 2017.

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary - secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 22, n. 2, p. 239-244, 2011.

AKANDE, A.; ABAOBA, S.; FLAMINI, G. Constituents and anthelmintic activity evaluation of *Albizia Adiantifolia* (Schumach) W.F. Wright essential oils From Nigeria. **International Journal of Chemistry**, vol. 10, n. 2, p. 10-15, 2018.

ALBERS, G. A. A.; GRAY, G. D.; JAMBRE, L. F. L.; BARGER, I. A.; BARKER, J. S. F. The effect of *Haemonchus contortus* infection on hematological parameters in young Merino sheep and its significance for productivity. **Animal Production**, vol. 50, n. 01, p. 99-109, 1990.

ALBUQUERQUE, A. C. A.; BASSETTO, C. C.; ALMDEIDA, F. A.; AMARANTE, A. F. T. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology**, vol. 246, p. 112-117, 2017.

ALISI C. S.; NWANYANWU C. E.; AKUJOBI C. O.; IBEGBULEM C. O. Inhibition of dehydrogenase activity in pathogenic bacteria isolates by aqueous extracts of *Musa paradisiaca* (Var *Sapientum*). **African Journal of Biotechnology**, vol. 7, n. 12, p. 1821-1825, 2008.

ALMEIDA C. E.; KARNIKOWSKI M. G. O.; FOLETO R.; BALDISSEROTTO B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista Saúde Pública**, vol. 29, p. 428-433, 1995.

ALMEIDA, J. R. G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SANTOS, M. R. V.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *Amburana cearenses* - uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, vol. 6, n. 11, 2010.

AL-OMAR, M. A.; NEEDHAM, C.; ALSARRA, I. A. Pathological roles of reactive oxygen species and their defense mechanisms. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 12, n. 1, p. 1-18, 2004.

ALVES, T. M.; RIBEIRO, F. L.; KLOOS, H.; ZANI, C. L. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 96, n. 6, p. 831-833, 2001.

AMARANTE, A. F. T. Nematódeos gastrointestinais em ovinos. In: CAVALCANTE, A. C.R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: Epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa, 2012, p. 14-42.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, vol. 120, p. 91-106, 2004.

ANOSA, G. N.; OKORO, O. J. Anticoccidial activity of the methanolic extract of *Musa paradisiaca* root in chickens. **Tropical Animal Health and Production**, vol. 43, p. 245-248, 2011.

ANULIKA, N. P.; IGNATIUS, E. O.; RAYMOND, E. S.; OSASERE, O. I.; ABIOLA, A. H. The chemistry of natural product: plant secondary metabolites**. International Journal of Technology and Emerging Engineering Research**, vol 4, n. 8, p. 1-8, 2016.

ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 32, n. 7, p. 671-683, 1994.

ASSEFA, A.; KECHERO, Y.; TOLEMARIAM, T.; KEBEDE, A.; SHUMI, E. Anthelmintic effects of indigenous multipurpose fodder tree extracts against *Haemonchus contortus*. **Tropical Animal Health and Production**, vol. 50, p. 727-732, 2018.

ATANASOV, A. G; WALTEMBERG, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; JEISS, E. H.; TOLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, J.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, vol. 33, p. 1582-1614, 2015.

BAGGA S.; STRANEY D. Modulation of camp and phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, vol. 56, n. 2, p. 51-61, 2000.

BAGNALL, N. H.; RUFELL, A.; RAZA, A.; ELLIOTT, T.; LAMB, J.; HUNT, P. W.; KOTZE, A. C. Mutations in the Hco-mptl-1 gene in a field-derived monepantel resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, vol. 7, p. 326-340, 2017.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTLE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plants chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. **Science**, vol. 228, n. 4707, p. 1157-1160, 1985**.**

BARB, J. C.; WERNER, D. J.; GRIESBACH, R. J. Genetics and Biochemistry of Flower Color in Stokes Aster. Journal of the **American Society for Horticultural Science**, vol. 133, n. 4, p. 569-578, 2008.

BERNHOFT, A. A brief review on bioactive compounds in plants. In**:** BERNHOFT, A (Ed.) **Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals.** Oslo: Proceedings from a symposium held at the Norwegian Academy of Science and Letters, 2010.

BEUTLER, J. A. Natural products as a foundation for drug discovery. **Current Protocols in Pharmacology**, vol. 46, 2009.

BIERI, S.; BRANCHET, A.; VEUTHEY, J.; CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 103, n.3, p. 439-447, 2006**.**

BÓKKON, I. Recognition of functional roles of free radicals. **Current Neuropharmacology**, vol. 10, n. 4, p. 287-288, 2012.

BORBA, H. R.; FREIRA, R. B.; ALBUQUERQUER, A. C.; CARDOSO, M. E. O; BRAGA, I. G.; ALMEIDA, S. T. P.; FERREIRA, M. J .C; FERNANDES, G. L. T.; CAMACHO, A. C; LIMA, R. C.; ALMDEIRA, A. C. C.; MATTOS, D. M. M.; DUARTE, R. M.; NASCIMENTO, S. F.; FRAMIL, R. A.; DIRE, G. F. Anthelmintic comparative study of *Solanum lycocarpum* St. Hill. extracts in mice naturally infected with *Aspicularis tetraptera*. **Nature and Science**, vol. 8, n; 4, p. 94-100, 2010.

BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A_2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 98, n. 1-2, p. 21-29, 2005.

BOULIN, T.; FAUVIN, A.; CHARVET, C. L.; CORTE, J.; CABERET, J.; BESSEREAU, J. L.; NEVEU, C. Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. **British Journal of Pharmacology**, vol. 164, p. 1421-1432, 2011.

BRANDÃO, M. G. L.*;* PAUSA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas gerais. In: Seminário sobre a Economia Mineira, XIV., 2010, Minas Gerais. **Anais.**..Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, vol. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines - Linking plant biochemistry and physiology to human health**. Plant Physiology**, vol. 124, p. 507-514, 2000.

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, vol. 127, n. 4, p. 1821-1827, 2011.

BUDEL, J.M.; FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R.; TAKEDA, I. J. M. Morpho-anatomical study of the cladodes of *Homalocladium platycladum* (F.J. Muell.) L.H. Bailey (Polygonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** vol. 17, n. 1, p. 39-43, 2007.

BUER, C.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. C. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, vol. 52, n. 1, p. 98-111, 2010.

BUXTON, S. K.; CHARVET, C. L.; NEVEU, C.; CABARET, J.; CORTET, J.; PEINEAU, N.; ABONGWA, M.; COURTOT, E.; ROBERTSON, A. P.; MARTIN, R. J. Investigation of acetylcholine receptor diversity in a nematode parasite leads to characterization of tribendimidine- and derquantel-sensitive nAChRs. **PLOS Pathogens**, vol. 10, n. 1, p. 1-14, 2014.

CARDOSO, C. A. L.; HONDA, N. K.; DIAS, E. S. **Avaliação do perfil cromatográfico em espécies de *Polygonum* e amostras comercializadas como "erva-de-bicho"**. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 16, n. 2, p. 236-245, 2006.

CAPOTE; M. R. P.; SANCHEZ, G. M.; FERNANDEZ, O. S. L. *In vitro* antioxidant actions of *Musa paradisiaca* leaf extract (acitan). **Pharmacologyonline**, vol. 1, p. 539-544, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 15, p. 15-25, 2013.

CARR, G. D. **Musaceae** [2002]. Fotografia, color. Disponível em: < CARR, G. D. Disponível em:< http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/mus.htm >. Acesso em 5 de fevereiro de 2018.

CARR, G. D. **Polygonaceae** [2004]. Fotografia, color. Disponível em:< http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/polygon.htm >. Acesso em 10 de Fevereiro de 2018.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, vol. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHANDY, M. L.; SOMAN, C.; KUMAR, P.; KURUP, S. JOSE, R. Understanding molecular mechanisms in multivariant actions of levamisole as an anti-helminthic, anti-inflammatory, antioxidant, anti-neoplastic and immunomodulatory drug. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, vol. 28, p. 354-357, 2016.

CHOSIDOW, A.; GENDREL, D. Safety of oral ivermectin in children. **Archives de Pédiatrie**, vol. 23, n. 2, p. 204-209, 2016.

CHOUDHARY, R. K.; OH, S.; LEE, J. 2011, An ethnomedicinal inventory of knotweeds of Indian Himalaya. **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 5, n. 10, p. 2095-2103, 2011.

CIALDELLA, A, M.; BRANDBYGE, J. Polygonaceae. In: SPICHIGER, R.; RAMELLA, L. (Eds). **Flora del Paraguay.** Vol 33. Conservatoire el Jardin Botaniques de la Ville de Genève & Missouri Botanical Garden, Saint Loius, 2001. p. 106.

COELHO-CASTELO, A. A. M.; TROMBONE, A. P. F.; ROCHA, C. D.; LORENZI, J. C. C. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina**, vol. 41, n. 2, p. 127-142, 2009.

ČORIĆ, I.; MILIČ, D.; MATKOVIĆ-ČALOGOVIĆ, D.; TOMAŠKOVIĆ. Synthesis and crystal structures of two isomeric nitro-*a*-resorcylic acids. **Structural Chemistry**, vol. 20, p. 73-80, 2009.

COSTA, F. S.; BELLOTI, A.; FARAH, G. J.; CAMARINI, E. T. Hipertratamento de miíase decorrente de trauma facial complexo. **Revista de cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial**, vol. 12, n. 3, p. 17-24, 2012.

COSTA, M.; ANTÔNIO, M. A.; BRITO, A. R. M. Effects of prolonged administration of *Musa paradisiaca* L. (banana), an antiulcerogenic substance, in rats. **Phytotherapy Research**, vol. 11, p. 28-31, 1997.

COSTA, V. M.M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 31, n. 1. P. 65-71, 2011.
CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**., vol. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, vol. 10, p. 397-412, 2011.

DAVID, B.; WOLFFENDER, J.; DIAS, D. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends**. Phytochemistry Reviews**, vol. 14, p. 299-315, 2015.
DEPETER, E. J; GEORGE, L. W. Rumen transfaunation. **Immunology Letters**, vol. 162, p. 69-76, 2014.

DETSI, A.; MAJDALANI, M.; KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; KEFALAS, P. Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 17, p. 8073-8085, 2009.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DOUGHTY, J.; ALJABRI, M.; SCOTT, R. I. Flavonoids and the regulation of seed size in Arabidopsis. Biochemical Society Transactions, vol. 42, p. 364-369, 2014.

DREWES, S. E.; ROUX, D. G. A New flavan-3,4-diol from *Acacia auriculiformis* by paper ionophoresis. **Biochemical journal**, vol. 15, n. 4, p. 523-530, 1966.

DUKE, S.O. The emergence of grass root chemical ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 104, n. 43, p. 16729-16730, 2007.

EDDOUKS, M.; CHATTOPADHYAY, D.; FEO V.; CHO, W.C. Medicinal plants in the prevention and treatment of chronic diseases 2013. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 14, p. 1-3, 2014.

EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 137, p. 108-113, 2011.

EL-ASHRAM, S.; NASR, I.; MEHMOOD, R.; HU, M.; SUO, X. *Haemonchus contortus* and ovine host: a retrospective review. **International Journal of Advanced Research**, vol. 5, n. 3, p. 972-999, 2017.

EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; JAMBRE, L. F. L. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**, vol. 46, p. 755-769, 2016.

FASSETT, N. C. The Variations of *Polygonum punctatum*. **Brittonia**, vol. 6, n. 4, 1949.
FAWE, A.; ABOU-ZAID, M.; MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, vol. 88, n. 5, p. 396-401, 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, D.; SLADE, D. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring *O*-heterocycles. **Natural Product Reports**, vol. 19, p. 517-541, 2002.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in plant Science**, vol. 3, p. 1-15, 2012.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, vol. 7, p. 1-8, 2006.

FRANCO, D. **Smartweed, dotted (*Polygonum punctatum*)** [2014]. Fotografia, color. Disponível em:< http://www.nwvisualplantid.com/smartweed-dotted-polygonum-punctatum >. Acesso em 10 de fevereiro de 2018.

FEDARKO, N. S. Theories of Aging. Conference Report from the 2009 CGS Annual Meeting: Education Day. **Health Plexus**, 2009.

FREDHOLM, B. Methylxanthines. **Handbook of experimental pharmacology**, vol. 200. Springer, 2011.

FUKUYAMA, Y.; SATO, T.; ASAKAWA, Y.; TAKEMOTO T. A potent cytotoxic warburganal and related drimanetype sesquiterpenoids from *Polygonum hydropiper*. **Phytochemistry,** v. 21, n.12, p. 2895-2898, 1982.

FUKUYAMA, Y.; SATO, T.; MIURA, I.; ASAKAWA, Y. Drimane-type sesqui- and norsesquiterpenenoids from *Polygonum hydropiper*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1521-1524, 1985.

FUKUYAMA, Y.; SATO, T.; MIURA, I.; ASAKAWA, Y.; TAKEMOTO T. Hydropiperoside, a novel coumaryl glycoside from the roots of *Polygonum hydropiper*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 549-552, 1983.

FURUTA, T.; FUKUYAMA, Y.; ASAKAWA, Y. Polygonolide, a isocoumarin from *Polygonum hydropiper* processing anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 25, p. 517-520, 1986.

GARCÍA, J. E.; GÓMEZ, L.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; RIVERA-CORONA, J. L.; MILLÁN-OROZCO, J. M.; ASCACIOS, J. A.; MEDINA, M. A.; MELLADO, M. Anthelmintic efficacy of hydro-methanolic extracts of *Larrea tridentata* against larvae *of Haemonchus contortus*. **Tropical Animal Health and Production**, vol. 50, p. 1099-1105, 2018.

GEARY, T. G.; SIMS, S. M.; THOMAS, E. M.; VANOVER, L.; DAVIS, J. P.; WINTERROWD, C. A.; KLEIN, R.; HO, N. F. H.; THOMPSON, D. O. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. **Experimental Parasitology**, vol. 77, p. 88-96, 1993.

GEARY, T. G.; MORENO, Y. Macrocyclic lactone anthelmintics: spectrum of activity and mechanism of action. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, vol. 13, p. 866-872, 2012.

GERSHENZON, J. Secondary metabolites and plant defense. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3ª Edição. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2002, Chapter 13.

GEURDEN, T.; HODGE, A.; NOÉ, L.; WINSTANLEY, D.; BARTLEY, D. J.; TAYLOR, M.; MORGAN, C.; FRASER, S. J.; MAEDER, S.; BARTRAM, D. The efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against anthelmintic resistant gastro-intestinal nematodes of sheep in the UK. **Veterinary Parasitology**, vol.189, p. 308 - 316, 2011.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E. Effect of CO2 enrichment on synthesis of some primary and secondary metabolites in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe**). International Journal of Molecular Sciences**, vol. 12, p. 1101-1114, 2011.

GIADA, M. L. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power**.** In: MORALES GONZÁLEZ, J.A (Ed.). **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**. Rio de Janeiro: InTech, 2013, p. 87-112.

GILLEARD, J. University of Calgary**. Gilleard lab** [1999]. Fotografia, color. Disponível em: < https://www.ucalgary.ca/jsgilleard/images > Acesso em 20 de Fevereiro de 2018

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**, vol. 139, p. 308-320, 2006.

GOMES, M.N.; MURATOV, E.N.; PEREIRA, M.; PEIXOTO, J.C.; ROSSETO, L. P.; CRAVO, P.V.L.; ANDRADE, C.H.; NEVES, B.J. Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. **Molecules**, vol. 22, 1210, p. 1-25, 2017.

GORZALCZANY, S.; ACEVEDO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. FERRARO, G. Search for anti-inflammatory activity in Argentine Medicinal Plants. **Phytomedicine,** vol. 3, n. 2, p. 181-184, 1996.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 27, p. 1-93, 2006.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, vol. 21, p. 213-228, 1997.

HAQUE, M.R.; BRADBURY, J.H. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v.77, p.107-114, 2002.

HAREKRISHNA, R.; CHAKRABORTY, A.; BHANJA, S.; NAYAK, B. S.; MISHRA S. R.; ELLAIAH, P. Preliminary phytochemical investigation and anthelmintic activity of *Acanthospermum hispidum* DC. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, vol. 2, n. 5, p. 217-221, 2010.

HARON, A. F.; WILLIAMS, Z. B.; HOLLER, L. D.; HILDRETH, M. B. Comparison of three different preservatives for morphological and real-time PCR analyses of *Haemonchus contortus* eggs. **Veterinary Parasitology**, vol. 145, p. 361–365, 2007.
HARTMANN, T. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. **Planta**, vol. 219: 1-4, 2004.

HARVEY, I. M. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 91, p. 3-20, 2001.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 13, p. 572-584, 2002.

HELDT, H. W. **Plant Biochemistry**. 3. Ed. California: Academic Press, 2005. p. 451-453.

HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; MUNNÉ-BOSCH, S. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. **Tree Physiology,** vol. 24, p. 1303-1311, 2004.

HETTIARACHCHY, N. S.; GLENN, K. C.; GNANASAMBANDAM, R.; JOHNSON, M. G. Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. **Journal of Food Science**, vol. 61, n. 3, p. 516-519, 1996.

HEWITSON, J. P.; GRAINGER, J. R.; MAIZELS, R. M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. **Molecular & Biochemical Parasitology**, vol. 167, p. 1-11, 2009.

HOSSEINZADEH, S.; JAFARIKUKHDAN, A.; HOSSEINI, A.; ARMAND, R. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, vol. 6, p.635-642, 2015.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General pharmacology**, vol. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HOUNSOME, N.; HOUNSOME, B.; TOMOS, D.; EDWARDS-JONES, G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. **Journal of Food Science**, vol. 73, n. 4, p. 48-65, 2008.

HOWELL, A. B.; REED, J. D.; KRUEGER, C. G.; WINTERBOTTOM, R.; CUNNINGHAM, D. G.; LEAHY. M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. **Phytochemistry**, vol. 66, p. 2281-2291, 2005.

HUFFMAN, M. A.; VITAZKOVA, S. K. Primates, plants, and parasites: the evolution of animal self-medication and ethnomedicine. In: ELISABETSKY, E. ETKIN, N. L. **Ethonopharmacology**. Oxford: Eolss Publishers, 2007.

HUSSAIN, A.; KHAN, M. N.; IQBAL, Z.; SAJID, M. S.; MUHAMMAD KASI KHAN, M. K. Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, vol. 179, p. 92-99, 2001.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, vol. 54, p.287-293, 2018.

IMAM, M. Z.; AKTER, S. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A phytochemical and pharmacological review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, vol. 1, n. 5, P. 14-20, 2011.

JÁCOME, R. L. R. P.; LOPES, D. E. S.; RECIO, R. A.; MACEDO, J. F.; OLIVEIRA A. B. Caracterização farmacognóstica de *Polygonum hydropiperoides* Michaux e *P. spectabile* (Mart.) (Polygonaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, vol. 14, n. 1, p. 21-27, 2004.

JAIN, P. K.; OSHI, H. Coumarin: chemical and pharmacological profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, vol. 2, n. 6, p. 236-240, 2012.

JANSEN, M. A; VAN DEN NOORT, R. E.; TAN, M. Y.; PRINSEN, E.; LAGRIMINI, L. M.; THORNELEY, R. N. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. **Plant Physiology,** vol.126, p.1012-1023, 2001.

JAWLA, S.; KUMAR, Y.; KHAN, M. S. Y. Antimicrobial and antihyperglycemic activities of *Musa paradisiaca* flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 2, n. 2, p. 914-918, 2012.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, vol. 91, p. 400-404, 2011.

KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S, S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKAS, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MÄSER, P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, vol. 452, p. 176-181, 2008.

KANG, S. S.; LEE, J. Y.; CHOI, Y. K.; SOMG, S. S.; KIM, J. S.; JEON, S. J.; HAN, Y. N.; SON, K. H., HAN, B. H. Neuroprotective effects of naturally occurring bioflavonoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 15, p. 3588-3591, 2005.

KAPLAN F.; KOPKA J.; HASKELL, D. W.; ZHAO, W.; SCHILLER, K. C.; GATZKE, N.; SUNG, D. Y.; GUY, C. L. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. **Plant Physiology**, vol.136, p. 4159-4168, 2004.

KARUPPIAH, P.; MUSTAFFA, M. Antibacterial and antioxidant activities of *Musa sp*. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 3, n. 9, p. 737-742, 2013.

KASOTE, D. M.; KATYARE, S. S.; HEGDE, M.; BAE, H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, vol. 11, n. 8, p. 982-991, 2015.

KHAN, A.; TAK, H.; NAZIR, R.; LONE, B. A. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activities of *Iris kashmiriana* Linn. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, vol. 17, n. 3, p. 235-240, 2016.

KHAN, M. K.; HUMA, Z.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 33, n. 1, p. 85-104, 2014.

KHOO, H. E.; AZLAN, A.; TANG, S. T.; LIM, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits**. Food e Nutrition Research**, vol. 61, p. 1-21, 2017.

KOLECKAR, V.; KUBIKOVA, K.; REHAKOVA, Z.; KUCA, K.; JUN, D.; JAODAR, L.; OPLETAL. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry***,* vol. 8, p. 436-447, 2008.

KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J. D.; VIVOT, E.; CRUAÑES J.; MARTINO V.; FERRARO G.; CAVALLARO L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 64, p. 79-84, 1999.

KOUGAN, G. B.; TABOPDA, T.; KUETE, V.; VERPOORTE, R. Simple phenols, phenolic acids, and related esters from the medicinal plants of Africa In: KUTE, V. (Ed.). Camarões, Elsiever, 2013.

KREJČÍK, S. ***Musa x paradisiaca* L. - Banana** [2009]. Fotografia, color. Disponível em:< https://www.biolib.cz/en/image/id77589/>. Acessado em 10 de fevereiro de 2018.

KRISHNA, P. G. S**ynthesis stereochemistry and biological activity studies on aurones and isoaurones**. 2007. 203 f. Tese (Doutorado em Química) - Lailaimpex Research Center, Acharya Nagarjuna University, Índia, 2007.

KUCHAI, J. A.; AHMAD, F.; CHISTI, M. Z.; TAK, H.; AHMAD, J.; AHMAD, S.; RASOOL, M. A Study on morphology and morphometry of *Haemonchus contortus***. Pakistan Journal of Zoology**, vol. 44, n. 6, p. 1737-17-41, 2012.

KÜHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, vol. 24, p. 117-191, 1976.

KUMAR, H.; LIM, H. W.; MORE, S. V.; KIM, B. W.; KOPPULA, S.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. The Role of Free Radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 13, p. 10478-10504, 2012.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Scientific World Journal,** vol. 2013, p. 1-13, 2013.

KUMARASINGHAN, R.; PRESTON, S.; YEO, T. C.; LIM, D. S.; TU, C. L.; PALOMBO, E. A.; S. H. W, J. M.; GASSER, R. B.; BOAG, P. R. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, vol. 9, n. 187. p. 1-7, 2016.

KUŞ, N.; BREDA, S.; REVA, I.; TASAL, E.; OGRETI, C.; FAUSTO, R. FTIR Spectroscopic and theoretical study of the photochemistry of matrix-isolated coumarin. **Photochemistry and Photobiology**, vol. 83, p. 1237-1253, 2007.

KUSKOSKI, E. M.; AGUSTÍN G. ASUERO, A. G.; M. CARMEN GARCÍA-PARILLA, M. C.; ANA M. TRONCOSO3, A. M.; ROSEANE FETT, R. Acitividad antioxidante de pigmentos anticiánicos**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p.537-56.

LACY, A.; O´KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 10, p. 3797-3811, 2004.

LAMB, J.; ELLIOTT, T.; CHAMBERS, M.; CHICK, B. Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in northern NSW of Australia. **Veterinary parasitology**, vol. 241, p. 48-51, 2017.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 45, n. 1, p. 145-151, 2009.

LESPINE, A. Lipid-like properties and pharmacology of the anthelmintic macrocyclic lactones. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, vol. 9, n. 12, p. 1-15, 2013
.
LIMA S. S.; MOREIRA D. L.; AFFONSO V. R.; HENRIQUES A. B.; SATO A.; ESQUIBEL M. A.; LEITÃO G. G.; LAGE C. L. Micropropagation of *Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* (Mart.) Meisn, and seasonal variation of tannins in acclimatized plants. **Journal Medicinal Plants Research**, vol. 4, p. 573-578, 2010.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, S. S.; ESQUIBEL, M. A.; HENRIQUES, A. B.; SILVA, F. O.; SILVA, P. H. B.; LAGE, C. L. S. Cultura monoclonal de erva de bicho (*Polygonum acre* H. B. K. var *aquatile*) para produção de um fitoterápico em escala comercial**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, vol. 4, n. 1, p. 51-55, 2001.

LIMA, S. S.; TAVARES, E.S.; MOREIRA, D. L.; LEITÃO, G. G; ESQUIBEL, M. A. Anatomia de folha e caule e quantificação espectrofotométrica de fenóis totais e taninos da erva-de-bicho (*Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* Meisn.). **Brazilian Journal of Botany**, vol. 32, p. 339-348, 2009.

LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; CASSIDY, C. S.; MAR, A.; CHEN, F. C. Biflavonoids as novel antituberculosis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 11, p. 2101-2104, 2001.

LIU, R.; SONG, S.; LIN, Y.; RUAN, T.; JIANG, G. Occurrence of synthetic phenolic antioxidants and major metabolites in municipal sewage sludge in China. **Environmental Science & Technology. Advanced Search**, vol. 49, p. 2073-2080, 2015.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, vol 4, n. 8, p. 118-127, 2010.

LOGANAYAKI, N.; RAJENDRAKUMARAN, D.; SELLAMUTHU MANIAN, S. Antioxidant capacity and phenolic content of different solvent extracts from banana (*Musa paradisiaca*) and mustai (*Rivea hypocrateriformis*). **Food Science and Biotechnology**, vol. 19, n. 5, p. 1251-1258, 2010.

LOPES, R.C.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A.; CECON, P.R. Caracterização isoenzimática de oito acessos de Erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 433-437, 2003.

LOPES, W. D. Z.; CARVALHO, R. S.; OIIVEIRA, P. V.; PEREIRA, V.; MARTINEZ, A. C.; MAZZUCATTO, B. C.; COLLI, M. H.; RUIVA, M. A. Intoxicação de ovinos que receberam duas aplicações de closantel, na dosagem terapêutica (7,5mg/kg), com intervalo de 28 dias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 34, n. 12, p. 1162-1166, 2014.

MACHEN, R., CRADDOCK, F., CRAIG, T., AND FUCHS, T. A *Haemonchus contortus* management plan for sheep and Goats in Texas. **Texas A&M AgriLife Extension Service**, EAN-015 (10/17), 2017.

MAIZ-TOME, L. 2016. *Polygonum punctatum.* **International Union for Conservation of Nature and Natural Resources**: The Red List of Threatened Species, 2016.

MALLICK, C.; CHATTERJEE, K.; GUHABISWAS, M.; GOSH, D. Antihyperglycemic effects of separate and composite extract of root of *Musa paradisiaca* and leaf of *Coccinia indica* in streptozotocin-induced diabetic male albino rat. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines,** vol. 4, n. 3, p. 362-371, 2007.

MAMOLOS, A. P.; KALBURTJI, K. L. Significance of allelopathy in crop rotation. **Journal of Crop Production**, vol. 4, n. 2, p. 197-218, 2001.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S.; ABUSHELAIBI, A.; ALAM, A. Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: a detailed review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 13, p. 1125-1140, 2014.

MARTÍNEZ-CROVETTO, R. N. Estudios etnobotanicos I, nombhe de plantas y su utilidade segun los índios Toba del este del Chago. **Bonplandia**, vol. 1, p. 279-333, 1964.

MARTINS, A. C.; BERGAMASCO, P. L. F.; FELIPPELLI, G.; TEBALDI, J. H.; DUARTE, M. M. F.; TESTI, A. J. P.; LAPERA, I. M.; HOPPE, E. G. L. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: fecal egg count reduction tests and randomized controlled trials. **Seminia: Ciências Agrárias**, vol. 38, n. 1, p. 231-238, 2017.

MATOS, M.J.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; ABREU, O.A.; MOLINA, E.; YORDI, E.G. Coumarins - An Important Class of Phytochemicals. In: RAO, A.V., RAO, L.G. (Eds). **Phytochemicals-Isolation, Characterization and Role in Human Health**. Croatia: InTech, 2015. p. 113-140.

MCCARTHY, T, L.; KERRY, J. P.; KERRY, J. F.; LYNCH, P. B.; BUCKLEY, D. J. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. **Meat Science**, vol. 57, p. 177-184, 2001.

MCNALLY D. J.; WURMS K.V.; LABBE C; BELANGER R. R. Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, vol. 63, n. 6, p. 293-303, 2003.

MCNEILLY, T. N.; NISBET, A. Immune modulation by helminth parasites of ruminants: implications for vaccine development and host immune competence. **Parasite**, vol. 21, n. 51, 2014.

MEDEROS, A. E., RAMOS, Z., BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors**, vol. 7, n. 598, 2014.

MELO, E. O gênero *Polygonum* L. (Polygonaceae) no estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus**, n. 14, p. 45-55, 1996.

MELO, A. C. F.; BEVILAQUA, C. M. L. Resistência anti-helmíntica em nematoides de pequenos ruminantes: uma revisão**. Ciência Animal***,* vol. 12, n. 1, p. 35-45, 2002.

MESQUITA-JR; D.; ARAÚJO, J. A. P; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário - Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, vol. 50, n. 5, p. 552-80, 2010.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, vol. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Valela, 2000.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. *25*, p. 291-312, 2010.

MILLIKEN, W.; KLITGÅRD, B.; BARACAT, A. **Polygonaceae** [2009]. Fotografia, color. Disponível em:< http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Polygonaceae.htm.

MOCTEZUMA, C.; HAMMERBACHER, A.; HEIL, M.; GERSHEZON, J.; MÉNDEZ-ALONSO, R.; OYAMA, K. Specific polyphenols and tannins are associated with defense against insect herbivores in the tropical oak *Quercus oleoides*. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 40, p. 458-467, 2014.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTES, A. T.; VAN WYK, J. A.; CHAGAS, A. C. S.; ARAÚJO, J. V.; BORGES, F. A. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**., v. 80, n. 2, p. 253-263, 2013.

MOGHBEL, N.; RYU, B.; STEADMAN, K. J. A reversed-phase HPLC-UV method developed and validated for simultaneous quantification of six alkaloids from *Nicotiana* spp. **Journal of Chromatography B**, vol. 997, p. 142-145, 2015.

MOHAMMED, M. T.; KADHIM, S. M.; JASSIMAND, A. M. N.; ABBAS, S. I. Free radicals and human health. **International Journal of Innovation Sciences and Research**, vol.4. n. 6, p. 218-223, 2015.

MOLLA, S. H.; BANDYOPADHYAY, P. K. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of *Murraya koenigii* against gastro-intestinal nematodes of sheep. **Journal of parasitic diseases**, vol. 40, n. 2, p. 362-368, 2016.

MORANDI D.; BRANZANTI B.; GIANINAZZI-PEARSON V. Effect of some plant flavonoids on *in vitro* behavior of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Agronomie,** vol**.** 12, n.10, p. 811-816, 1992.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

MULCAHY, G.; O'NEILL, B.; DONNELY, S.; DALTONA, J. P. Helminths at mucosal barriers-interaction with the immune system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 56, p.853-868, 2004.

MURAKAMI, Y.; KAWATA, A.; KATAYAMA, T.; FUJISAWA, S. Anti-inflammatory Activity of the Artificial Antioxidants 2-*Tert*-butyl-4-methoxyphenol (BHA), 2,6-Di-*tert*-butyl-4- methylphenol (BHT) and 2,4,6-Tri-*tert*-butylphenol (TBP), and their various combinations. ***In vivo***, vol. 29, p. 197-206, 2015.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, p. 3309-3312, 2003.

NARASIMHULU, G.; REDDY, K.; MOHAMED, J. The genus Polygonum (Polygonaceae): An ethnopharmacological and phytochemical perspective - Review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol. 6, n. 2, p. 21-45, 2014.

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUVADI, M. R.; KRISHNA, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology,** vol. 33, p. 2-16, 2001.

NARI, A. Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. **Organización de Las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación**, n. 157, ROMA, 2003.

NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products,** vol. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, vol. 14, n. 12, p. 1669-1691, 2004.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, vol. 5, p. 27986-28006, 2005.

NIRMALA, M.; GIRIJA, M.; LAKSHMN, K.; DIVYA, T. Hepatoprotective activity of *Musa paradisiaca* on experimental animal models. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 2, n. 1, p. 11-15, 2012.

NISHA, P.; MINI, S. Flavanoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescence down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats. **Journal of Functional Foods**, vol.5, p. 1838-1847, 2013.

NOËL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: CARVALHO, OS., COELHO, P. M. Z., and LENZI, H. L (Eds). ***Schitosoma mansoni*** **e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Editora Fio Cruz, 2008. pp. 207-244.

OKOLI, R. I.; AIGBE, O. ; OHAJU-OBODO, J. O; MENSAH, J. K. Medicinal herbs used for managing some common aliments among Esan people of Edo State, Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, vol. 6, n. 5, p. 490-496, 2007.

OLIVEIRA, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, F.; MACEDO, I. T. F. Plantas taníferas e o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes**. Ciência Rural**, vol. 41, n. 11, p. 1967-1974, 2011.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; FERRAZ, C. A. A.; SILVA, M. G.; LAVOR, E. M.; ROLIM, L. A.; LIMA, J. T.; FLEURY, A.; PICOT, L.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTAS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S. Flavonoids: Promising Natural Products for Treatment of Skin Cancer (Melanoma). In: BADRIA, F. A. (Ed.). **Natural Products and Cancer Drug Discovery**. Croácia: InTech, 2017. 314 p.

OU, K.; GU, L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. **Journal of Functional Foods,** vol. 7, p. 43-53, 2014.

PANCHE, A., N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, vol. 5, n. 47, p.1-15, 2016.

PASTORI, T.; KUHN, A.W.; TEDESCO, M.; HOFFMANN, C.E.; NEVES, L.A.S.; CANTO-DOROW, T.S.; TEDESCO, S.B. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, vol.17, n. 2, p.186-194, 2015.

PAZMIÑO-DURÁN, E. A.; GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R. E.; GLÓRIA, B. A. Anthocyanins from banana bracts (*Musa* x *paradisiaca*) as protentional food colorants. **Food Chemistry**, vol. 73, p. 327-332, 2001.

PEER, W. A.; MURPHY, A. S. Flavonoids as signal molecules: Targets of flavonoid action. In: GROTEWOLD, E. (Ed.). **The Science of Flavonoids**. New York: Springer, 2007. p. 273

PELISSARI, F. M.; ANDRADE-MAHECHA, M. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Starch - Stärke,** vol. 64, n.5, p. 382-391, 2012.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAN, M. C.; MUÑOZ, J.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 77, p. 37-40, 2001.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, vol. 14, p. 2202-2211, 2009.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus.* **Veterinary Parasitology**, vol. 109, p. 59-63, 2002.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plant´s usage. **Pharmacognosy Review**, vol. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BERTOLINI, A.; PATUI, S.; VIANELLO, A. Plant flavonoids - Biosynthesis, transport and involvement in stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, p. 14950-14973, 2013.

PHAM-HUY, L.; HE, HUA; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health**. International Journal of Biomedical Science**, vol., n. 2, p. 89-96, 2008.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal** of **Clinical Biochemistry**, vol. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.
PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, vol. 63, p. 1035-1042, 2000.

POURCEL, L.; ROUTABOUL, J. M.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science**, vol. 12, n. 1, p. 1-8, 2006.

PRANZO, M. B.; CRUICKSHANK, D.; CORUZZI, M.; CAIRA, M. R.; BETTINI, R. Enantiotropically Related Albendazole Polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Science**, vol. 99, n. 9, p. 3731-3742, 2010.

PRICHARD, R. K. The fumarate reductase reaction of Haemonchus contortus and the mode of action of some anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, vol. 3, p. 409-417, 1973.

PRICHARD, R. K.; GEARY, T. G. Drug discovery: Fresh hope to can the worms. **Nature**, vol. 452, n. 7184, p. 157-158, 2008.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; ROCHA, R. P.; BERBERT, P. A. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, vol. 14, n. 3, p. 453-457, 2012.

RAJA, P. B.; RAHIM, A. A.; QUERESHI, A. K.; AWANG, K. Green synthesis of silver nanoparticles using tannins. **Materials Science-Poland**, vol. 32, n.3, p. 408-413, 2014.

RAKHSHANDEHROO, E.; ASADPOUR, M.; MALEKPOUR, S. H.; JAFARI, A. The anthelmintic effects of five plant extracts on the viability of *Parascaris equorum* larvae. **Equine Veterinary Education**, vol. 29, n. 4. p. 219-224, 2017.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, vol. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMAWAT, S. DASS, S.; MATHUR, M. The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In: RAMAWAT, K. (Ed.) Herbal Drugs: **Ethnomedicine to modern medicine**. Heidelberg: Springer, 2009, p. 7-32.

RATNAVATHI, C.V.; PATIL, J.; CHAVAN, U. D. **Sorghum biochemistry: an industrial perspective**. 1 ed. Academic Press, 2016. P. 358.

RAYES, D.; ROSA, M. J.; SPITZMAUL, G.; BOUZAT, C. The anthelmintic pyrantel acts as a low efficacious agonist and an open-channel blocker of mammalian acetylcholine receptors. **Neuropharmacology,** vol. 41, p. 238-245, 2001.

RIBAS, J. L; RICHTER, E. M.; MILCZEWSKI, V.; CERDEIRO, A. P.; SCHAFHCUSER, E. Eficácia da Folha de Bananeira (*Musa sp.)* no Controle de Vermes Gastrintestinais em Pequenos Ruminantes. **Revista Brasileira de Agroecologia**, vol. 4, n. 2, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, vol. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROBERTSON, S. J.; PENNINGTON, A. J.; EVANS, A. M.; MARTIN, R. J. The action of pyrantel as an agonist and an open channel blocker at acetylcholine receptors in isolated *Ascaris suum* muscle vesicles. **European Journal of Pharmacology**, vol. 271, p. 273-282, 1994.

ROBINSON, M. W.; MCFERRAN, N.; TRUDGETT, A. HOEY, L. FAIRWEATHER, I. A possible model of benzimidazole binding to b-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, vol. 23, p. 275–284, 2004.

RODRIGUEZ, A. V.; GOLDBERG, V.; VIOTTI, H.; CIAPPESONI, g. Early detection of *Haemonchus contortus* infection in sheep using three different faecal occult blood tests. **Open Veterinary Journal**, vol. 5, n. 2, p. 90-97, 2015.

ROMERO-BENEVIDES, J.; RUANO, A. L.; SILVA-RIVAS, R.; CASTILLO-VEINTIMILA, P.; VIVANCO-JARAMILLO, S.; BAILON-MASCOSO, N. Medicinal plants used as anthelmintics: ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 129, p. 209-217, 2017.

RVC - ROYAL VETERINARY COLLEGE - Food and Agriculture Organization (FAO). **Guide to veterinary diagnostic parasitology** [2017]. Disponível em: < https://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/ruminantl3/Haemonchus.htm >. Acesso em 20 de fevereiro de 2018.

SAGER, H.; HOSKING, B.; BAPST, B.; STEIN, P.; VANHOFF, K.; KAMINSKY, R. Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. **Veterinary Parasitology**, vol. 159, p. 49-54, 2009.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.

SAKHAEE, E.; DERAKHSHANFAR, A. Polioencephalomalacia associated with closantel overdosage in a goat. **Journal of the South African Veterinary Association**, vol. 81, n. 2, p. 116–117, 2010.

SAKUTA, M. Transcriptional control of chalcone synthase by environmental stimuli. **Journal of Plant Research**, vol. 113, p. 327-333, 2000.

SALES, N.; LOVE, S. Resistance of *Haemonchus sp*. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel/abamectin combination confirmed in sheep in NSW Australia. **Veterinary parasitology**, vol. 228, p. 193-196, 2016.

SALHAN, M.; KUMAR, B.; TIWARI, P.; SHARMA, P.; SANDHAR, H. K.; GAUTAM, M. Comparative anthelmintics activity of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Clitoria ternatea*. **International Journal of Drug Development & Research**, vol. 3, n. 1, p. 62-69, 2011.

SALMINEN, J. P.; LEMPA, K. Effects of hydrolysable tannins on a herbivorous insect: fate of individual tannins in insect digestive tract. **Chemoecology,** vol. 12, p. 203-211, 2002.

SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S. K. Roles of flavonoids in plants. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, vol. 6, n. 1, p. 12-35, 2011.

SANGSTER, N. C.; GILL, J. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. **Parasitology Today**, vol. 15, n. 4, p. 141-146, 1999.

SANTOS, F. C. C.; CARVALHO, N. U. Alcoholic tincture of garlic (*Allium sativum*) on gastrointestinal endoparasites of sheep - Short Communication. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.1, p. 115-118, 2014.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives**. Mutation Research,** vol. 519, p. 103-119, 2002.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant´s extracts. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines,** vol. 8. n. 1, p. 1-10, 2011.

SAVALI, A. S.; BHINGE, S. D.; CHITAPURKAR, H. R. Evaluation of hair growth promoting activity of *Musa paradisiaca* unripe fruit extract. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, vol. 2, n. 3, p. 120-124, 2011.

SCOTT, I.; POMROY, B.; PAUL, K.; GREG, S.; BARBARA, A.; MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary parasitology**, vol. 198, p. 166-171, 2013.

SEARS, M. E. Chelation: Harnessing and enhancing heavy metal detoxification - A review. **Scientific World journal**, vol. 2013; p. 1-13, 2013.

SEGURA-CABRERA, A.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; LIZARAZO, C.; GUO, X.; CORREA-BASURTO.; RODRÍGUEZ-PÉREZ. A computational analysis of the binding mode of closantel as inhibitor of the *Onchocerca volvulus* chitinase: insights on macrofilaricidal drug design. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, vol. 25, n. 12, p. 1107-1119, 2011.

SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicines usage. **Journal of HerbMed Pharmacology**, vol. 3, n. 1, p. 1-3, 2014.

SHALABY, H. Anthelmintics resistance; How to overcome it? **Iranian Journal of Parasitology***,* vol. 8, n.1, p. 18-32, 2013.

SHANMUGA, S. C.; SUBRAMANIAN, S. *Musa paradisiaca* flower extract improves carbohydrate metabolism in hepatic tissues of streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 2, n. 3, p. 1498-1503, 2012.

SHODEHINDE, S. A.; OBOH, G. Antioxidant properties of aqueous extracts of unripe *Musa paradisiaca* on sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rat pancreas *in vitro*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 3, n. 6, p. 449-457, 2013.

SILVA-BRAMBILLA, M. G.; MOSCHETA, I. S. Anatomia foliar de Polygonaceae (Angiospermae) da planície de inundação do alto rio Paraná. **Acta Scientiarum**, vol. 23, n. 2, p. 571-585, 2001.

SINGH, K.; KAUR, A. P. Physiological and pathological role of reactive oxygen species. **International Journal of Medical Sciences**, vol. 6, n. 1, p. 31-48, 2013.

SINGH, S. K.; KESARI, A. N.; RAI, P. K.; WATAL, G. Assessment of glycemic potential of *Musa paradisiaca* stem juice. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, vol. 22, n. 2, p. 48-52, 2007.

SOLDERA-SILVA, A.; SEYFRIED, M.; CAMPESTRINI, L. H.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.; MINHO, A, P.; MOLENTO, M. B.; MAURER, J. B. B. Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of *Persea americana* seed extracts. **Veterinary Parasitology**, vol. 251, p. 34-43, 2018.

SOTOMAIOR, C. S.; CARLI, L. M.; TANGLEICA, L.; KAIBER. B. K.; SOUZA, F. P. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Revista Acadêmica**, vol. 5, n. 4, p. 397-412, 2007.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 47, p. 59-67, 2008.

STUCHLÍKOVÁ, L. R..; MATOUŠKOVÁ, P.; VOKŘÁL, I.; LAMKA, I. V.; SZOTÁKOVÁ, B.; SEČKAŘOVÁ, A.; DIMUNOVÁ, D.; NGUYEN, L. T.; VÁRADY, M.; SKÁLOVÁ, L. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. **International Journal for Parasitology - Drugs and Drug Resistance,** vol. 8, p. 50-58, 2018.

SWATHI, D.; JYOTHI, B.; SRAVANTHI, C. A Review: pharmacognostic studies and pharmacological actions of *Musa paradisiaca*. **International Journal of Innovative Pharmaceutical Research**., vol. 2, n. 2, p. 122-125, 2011.

TABATABAEI, S. A.; SOLEIMANI, M.; MANSOURI, M. R.; MIRSHAHI, A.; INANLOU, B.; ABRISHAMI, M.; PAKRAH, A. R.; MASARAT, H. Closantel; a veterinary drug with potential severe morbidity in humans. **BMC Ophthalmology**, vol. 16, n. 1, p 1-5, 2016.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. J **Food Science and Technology, vol.** 52, n. 3, p. 1272-1282, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. Secondary metabolites. In:_____.**Plant physiology and development**. 6 ed. Oxford: Oxford University Press, 2015, Appendix 4.

TAKAHASHI, A.; OHNISHI, T. The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the International Space Station. **Biological Sciences in Space,** vol. 18, n. 4, p. 255-260, 2004.
TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TEIXEIRA A. H.; DALOSTO C.; BOLASSEL C.; CHAGAS A. M.; BORTOLUZZI M. A. P.; JUCHEM W. R. C. Efeito protetor do *Polygonum acre* H. B. K. sobre as hemorragias artificiais em camundongos. **Saúde**, vol. 15, n. 1-2, p. 105-116, 1989.

THEODORIDIS, G.; KANTIFES, A.; MANESIOTIS, P.; RAIKOS, N.; TSOUKALI-PAPADOPOULOU. Preparation of a molecularly imprinted polymer for the solid-phase extraction of scopolamine with hyoscyamine as a dummy template molecule. **Journal of Chromatography A.** vol. 987, n. 1-2, p.103-109, 2003.

TIWARI, R.; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, vol. 3, n. 5, 2015.

TODOROVA, T. V.; TRAYKOV, M. G.; TADJER, A. V.; VELKOV, Z. Structure of flavones and flavonols. Part I: Role of substituents on the planarity of the system. **Computational and Theoretical Chemistry**, vol. 1017, p. 85-90, 2013.

URBAN, J.; KOKOSKA, L.; LANGROVA, I.; MATEJKOVA, J. *In vitro* anthelmintic effects of medicinal plants used in Czech Republic. **Pharmaceutical Biology**, vol. 46, n. 10-11, p. 808-813, 2008.

VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary parasitology**, vol. 209, n. 3-4, p. 278-280, 2015.

VAN HAAFTEN, R. I. M.; HAENEM, R. M. M.; EVELO, C. T. A; BAST, A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. **Drug Metabolism Reviews**, vol. 35, n. 2-3, p. 215-253, 2003.

VARED, T.; GAD, G. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. **Molecular Plant**, vol. 3, n. 6, p. 956-972, 2010.

VARGAS-MAGAÑA, J. J.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AGUILAR-CABALERRO, A. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H.; CHAN-PÉREZ, J. I. Anthelmintic activity of acetone–water extracts against Haemonchus contortus eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. **Veterinary Parasitology**, vol. 206, p. 322-327, 2014.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, C. A.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, vol. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELAYUTHAM, P.; BABU, A.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 15, n.18, p.1840-1850, 2008.

VENKATESH, G. K.; PRADEEPA, K.; KUMAR, S. R. S.; VIJAV, K. Anthelmintic Activity of *Musa paradisiaca* (L.) *cv.* Puttabale**. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, vol. 5, n. 2, p. 67-69, 2013.

VK - VETERIAN KEY. **The laboratory diagnosis of parasitism** [2017]. Fotografia, p&b. Disponível em: < https://veteriankey.com/the-laboratory-diagnosis-of-parasitism/ >; Acesso em 20 de Fevereiro de 2018.

VIJAYAKUMAR, S.; G. PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant activity of banana flavonoids. **Fitoterapia**, vol. 79, p. 279-282, 2008.

VINHOLES, J.; SILVA, B. M.; SILVA, L. R. **Hydroxycinnamic acids (HCAS): structure, biological properties and health effects.** 1ª Edição. Nova Iorque: Nova Science Publishers, vol. 88, 2015.

WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 126, n. 3-4, p. 277-289, 2006.

WANSI, J. D.; DEYKOTA, K. P.; TSHIKALANGE, E.; KUETE, V. Alkaloids from the Medicinal Plants of Africa. In: KUTE, V. (Ed.). **Medicinal Plant Research in Africa**. Camarões: Elsiever, 2013. Chapter 14.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. **Molecules**, vol. 17, 12771-12791, 2012.

YAKUBU, M. T.;NARUDEEN, Q. O; SALIMON, S. S.; YAKUBU, M. O.; JIMOH, R. O.; NAFIU, M. O.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T.; WILIAMS, F. E. activity of *Musa paradisiaca* sap in wistar rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2015, p. 1-9, 2015.

YAMASAKI H, SAKIHAMA Y, LKEHARA N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H202. **Plant Physiology,** vol. 115, p. 1405-1412, 1997.

YAZICI, L.; YILMAZ, G. Determination of alkaloids and oil rates of some poppy (*Papaver somniferum* L.) varieties cultivated as winter and summer. International **Journal of Secondary Metabolite**, vol. 4, n. 3, p. 359-362, 2017.

YOKOTA, K.; KIMURA, H.; OGAWA, S.; AKIHIRO, T. Analysis of A-type and B-type highly polymeric proanthocyanidins and their biological activities as nutraceuticals. **Journal of Chemistry**, vol. 2013, p. 1-7, 2013.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, vol. 54, p. 176-186, 2001.

ZAMORA-MARTINEZ, M. C.; POLA, C. N. P. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology,** vol. 35, p. 229-251, 1992.

ZENK, M. H.; JUENGER, M. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. **Phytochemistry**, vol. 68, n. 22-24, 2007.

ZHUANG, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; ZHANG, W.; XING. C.; MIAO, Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, vol. 117, p. 7762-7810, 2017.

ANEXOS

ANEXO 1 - LAUDO TÉCNICO DE CONTROLE DE QUALIDADE DO FORNECEDOR COMERCIAL DO *Polygonum acre*

Botanika

Controle de Qualidade

Ref N/ Pedido: 0414004417

Yerba & Botanika Ltda.
Av. Celso Garcia, 3854 - CEP: 03064-000
Tatuapé - São Paulo - SP

NOMENCLATURA: ERVA DE BICHO

Nome científico (gênero/espécie):	*Polygonum acre Ell.*	Esterilização:	Houve
Identificação botânica:	*Polygonum acre Ell.*	Família:	Poligonaceae
Parte utilizada:	Parte aérea	Origem:	Brasil
Manufatura/Val (mês/ano):	01/05/2014 - 01/05/2017	Lote:	ERBI01/1014
Método de secagem:	Estufa		

Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:
Folhas e talos de coloração verde acastanhado, odor e sabor característicos.

Teste de pureza e integridade:
Umidade: 10,35% (*esp. máx 14%); Cinzas Totais: 14,3% (*esp. máx. 15%); Elementos estranhos: Ausente (*esp. máx. 2,0%).

Análisa de princípios ativos e/ou marcadores:
Teor de Taninos: 1,05% (*esp. mín. 1,0%)
Teor de Flavonóides: 0,27% (*esp. mín. 0,01%)

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem total	Máx. 10.000 UFC/g	De Acordo
Bolores e leveduras	Máx. 1.000 UFC/g	De Acordo
Enterobactérias	Ausência/g	De Acordo
E. coli	Ausência/10g	De Acordo
Staphylococcus aureus	Ausência/g	De Acordo
Pseudomonas sp	Ausência/g	De Acordo
Salmonella sp	Ausência/10g	De Acordo

Observações:
* Armazenamento em local seco e ventilado, sem umidade e calor;
* Mudança de cor pode ocorrer devido ao fato de que o produto é de origem natural ou vegetal;
* Nós não somos responsáveis quando os produtos são manipulados e / ou utilizado de forma contrária aos padrões.
* Ensaios complementares, como microbiologia, podem ser realizados com custos adicionais.
* NR refere-se a análise não realizada.
* A validade será descon[illegible] caso o produto seja manipulado ou armazenado em locais inadequados.
* Este laudo não é comercial.

Metodologia Interna Especificação Interna
Lote do Fornecedor: 002
LI:ERBI231014/01

Sinonimias: Persicaria punctata (Elliott) Small, Persicaria punctata var. ecilíata Small, Persicaria punctata var. robustior (Small) Small, Persicaria punctata var. tacubayana Nieuwl., Persicaria robustior (Small) E.P. Bicknell, Polygonum acre Kunth, Polygonum acre var. aquatile Meisner in Martius, Polygonum acre var. brachystachyum Meisn., Polygonum acre var.

Helena de Moura Santos
FARMACÊUTICA RESPONSÁVEL
CRF/SP: 55799

ANEXO 2 - CERTIFICADO APROVADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 065/2015, referente ao projeto **"Avaliação de extratos de sementes de abóbora (*Cucurbita máxima* DUCHESNE) e abacate (*Persea americana* MILL) contra helmintos de pequenos ruminantes"**, sob a responsabilidade de **Andressa Soldera da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau B de invasividade, em reunião de 27/08/2015

Vigência do projeto	Setembro 2015 a Outubro de 2016
Espécie/Linhagem	Ovinos
Número de animais	2
Peso/Idade	Variado
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Canguiri – UFPR

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 065/2015, regarding the project **"Evaluation of extracts from pumpkin (*Cucurbita máxima* DUCHESNE) and avocado (*Persea americana* MILL) seeds against helminths from small ruminants"**, under **Andressa Soldera da Silva** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree B of invasiveness, in session of 08/27/2015.

Duration of the project	September 2015 to October 2016
Specie/Line	Sheep
Number of animals	2
Wheight/Age	Vary
Sex	Females
Origin	Canguiri farm - UFPR

Curitiba, 27 de Agosto de 2015.

Ananda Portella Félix
Presidente CEUA-SCA

Simone Tostes de Oliveira Stedile
Vice-Presidente CEUA-SCA

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR

NOTA: O presente estudo encontra-se incluso no mesmo número de protocolo aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.