

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos
alternativos**

Claudia Giordani

Pelotas, 2017

Claudia Giordani

**Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos
alternativos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marlete Brum Cleff

Co-Orientador: Sílvia Regina Leal Ladeira

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G497a Giordani, Claudia

Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos / Claudia Giordani ; Marlete Brum Cleff, orientadora ; Sílvia Regina Leal Ladeira, coorientadora. — Pelotas, 2017.

150 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Hidroalcolólico. 2. Antibacteriana. 3. Antifúngica. 4. Fitoquímica. 5. Citotoxicidade. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Ladeira, Sílvia Regina Leal, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Claudia Giordani

Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências (área de concentração Sanidade Animal), Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 22/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dra. Marlete Brum Cleff (Orientador)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rogério Antônio Freitag
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dra. Carine Dahl Corcini
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Quero agradecer a Deus pela vida, e meus pais, Gilberto Giordani e Miraci Giordani, pelos ensinamentos, amor, incentivo e preocupação, além de me proporcionarem todas as condições para minhas realizações pessoais e profissionais. Todo meu mérito também pertence a vocês dois. Quero agradecer também meu irmão, Gustavo Giordani, pelo apoio, que mesmo na distância, se fez presente de alguma forma.

Ao meu namorado, Valter Taroco, pelo apoio, compreensão, paciência e amor incondicional, sempre me fazendo olhar para a luz no final do túnel. Muito obrigada por tudo, te amo!

À minha orientadora Prof. Marlete Brum Cleff pela oportunidade e confiança para realização desse e outros trabalhos nas áreas da pesquisa, ensino e extensão. Também quero agradecer pelo incentivo, aprendizado e amizade, ao longo desses anos. À minha co-orientadora, Dra. Sílvia Regina Leal Ladeira, pela amizade, ensinamentos, compreensão e ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, além do apoio psicológico.

Às “Fitopeeteanas”, Cris, Karina, Carol, Sol e Gabi, pela amizade, paciência, compreensão e auxílio constante, principalmente nos dias mais difíceis, vocês foram essenciais para a conclusão desta etapa.

A todos estagiários do grupo FITOPEET, e aos estagiários do grupo ReproPel Nathália Wacholz Kanabah e Rafael Mielke Barbosa, pela contribuição direta ou indireta nesta pesquisa.

Às minhas amigas Isabel Martins Madrid, Rosema Santin e Luciana Laitano Dias de Castro, que apesar da distância ou dos desencontros cotidianos sempre me auxiliaram, apoiaram, aconselharam e elucidavam minhas dúvidas.

Às alunas de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos Jéssica Fernanda Hoffmann e Bianca Camargo Aranha, e ao Prof. Fábio Clasen Chaves pela oportunidade de realizar parte de meu trabalho com vocês, e pela transferência de

conhecimentos. Aos alunos de Pós-graduação em Veterinária, Diego Martins Pires e Josiara Mendes pela colaboração nas análises celulares/microbiológicas.

Às técnicas de laboratório Otávia de Almeida Martins e Carla Hartwig por estarem sempre à disposição para me auxiliar no que for preciso.

Aos Profs. Geferson Fisher, Gilberto D'Ávila Vargas, Mário Carlos Araújo Meireles, Renata Osório de Faria, Carine Dahl Corcini, Antônio Sérgio Varela Júnior e Eliza Simone Sallis pela participação/contribuição, a nível laboratorial e de conhecimentos, para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela bolsa de estudos, e ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (PPGV-UFPel) pela oportunidade da realização da Pós-Graduação a nível de doutorado.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho - Abraham Lincoln”

Resumo

GIORDANI, Claudia. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. 2017. 150f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde épocas remotas, e atualmente são alvos da pesquisa para obtenção de novos compostos bioativos, para combater, principalmente, patógenos resistentes. Nessa realidade, existe a preocupação do uso das plantas sem a avaliação química e toxicológica. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a suscetibilidade dos isolados clínicos resistentes aos fármacos convencionais frente a extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU), *Polygonum hydropiperoides* (PH), *Baccharis trimera* (BT), *Equisetum hyemale* (EH) e *Solidago chilensis* (SC), e determinar a composição química, atividade antioxidante e toxicidade *in vitro* e *in vivo* dos extratos. Para avaliação da suscetibilidade *in vitro* das bactérias (n=58) e fungos (n=30) realizou-se o teste de microdiluição em caldo (CLSI, M07-09, M38-A2 e M27-A3). Os níveis de atividade antioxidante foram identificados pelos testes com DPPH e ATBS, e os compostos químicos identificados através de cromatografia líquida e gasosa. A determinação da toxicidade dos extratos *in vitro* foi avaliada em células Vero (teste do MTT), em células espermáticas (parâmetros de motilidade = CASA, e de estrutura = citometria de fluxo), e em eritrócitos caninos (capacidade hemaglutinante e hemolítica). A toxicidade *in vivo* foi avaliada em ovos de codorna embrionados. Os extratos de ST, PH e EU apresentaram ação fungicida e fungicida sobre *Sporothrix brasiliensis*, *Malassezia pachydermatis* e dermatófitos (0,19-100 mg.mL⁻¹), bacteriostática e bactericida em Gram-positivas e Gram-negativas (0,03-7,5 mg.mL⁻¹), além de níveis antioxidantes superiores, com presença de compostos fenólicos e flavonoides. Em relação a toxicidade *in vitro*, houve alterações nas concentrações mais altas, principalmente nos EU e ST. No ensaio de toxicidade espermática observou-se redução na viabilidade celular e motilidade espermática, reação no acrossoma, aumento de fluidez da membrana, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, sendo observadas alterações a partir da concentração 1,5 mg.mL⁻¹ para ST, ao contrário de PH, onde só se observam alterações na motilidade a partir de 6,2 mg.mL⁻¹. Em concentrações ≤0,08 mg.mL⁻¹ (ST, EU e PH) não foram observadas reações de hemaglutinação e hemólise, sendo PH o menos tóxico. Na avaliação *in vivo*, nenhum destes extratos demonstrou efeitos tóxicos nos embriões (0,94-7,5 mg.mL⁻¹). Os extratos de ST, EU e PH, apresentam-se promissores, com possibilidade de isolamento de substâncias antimicrobianas e antioxidantes.

Palavras-chave: hidroalcoólico; antibacteriana; antifúngica; fitoquímica; citotoxicidade

Abstract

GIORDANI, Claudia. **Antimicrobial activity of plant extracts and toxicity in alternative models**. 2017. 150f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Medicinal plants have been used since remote times, and are currently the target of the research to obtain new bioactive compounds, to combat, mainly, resistant pathogens. In this reality, there is concern about the use of plants without chemical and toxicological evaluation. The objective of this study was to evaluate the susceptibility of the clinical isolates resistant to conventional drugs against hydroalcoholic extracts of *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU), *Polygonum hydropiperoides* (PH), *Baccharis trimera* (BT), *Equisetum hyemale* (EH) and *Solidago chilensis* (SC), and to determine the chemical composition, antioxidant activity and *in vitro* and *in vivo* toxicity of the extracts. The broth microdilution test (CLSI, M07-09, M38-A2 and M27-A3) was used to evaluate the *in vitro* susceptibility of bacteria (n = 58) and fungi (n = 30). The levels of antioxidant activity were identified by the DPPH and ATBS tests, and the chemical compounds identified by liquid and gas chromatography. *In vitro* toxicity determination of extracts was evaluated in Vero cells (MTT test), sperm cells (motility parameters = CASA, and structure = flow cytometry), and in canine erythrocytes (haemagglutination and haemolytic capacity). *In vivo* toxicity was evaluated in embryonated quail eggs. The extracts of ST, PH and US presented fungistatic and fungicidal action on *Sporothrix brasiliensis*, *Malassezia pachydermatis* and dermatophytes (0,19-100 mg.mL⁻¹), bacteriostatic and bactericidal on Gram-positive and Gram-negative (0.03- 7.5 mg.mL⁻¹), in addition to superior antioxidant levels, with presence of phenolic compounds and flavonoids. In relation to *in vitro* toxicity, there were changes in the highest concentrations, mainly in the US and ST. In the sperm toxicity assay, a reduction in cell viability and sperm motility was observed, acrosome reaction, increased membrane fluidity, decreased mitochondrial membrane potential, and changes from 1.5 mg.mL⁻¹ to ST, unlike PH, where there are only changes in motility from 6.2 mg.mL⁻¹. At concentrations ≤0.08 mg.mL⁻¹ (ST, EU and PH) no haemagglutination and haemolysis reactions were observed, PH being the least toxic. In the *in vivo* evaluation, none of these extracts showed toxic effects on the embryos (0.94-7.5 mg.mL⁻¹). The extracts of ST, EU and PH, are promising, with the possibility of isolation of antimicrobial substances and antioxidants.

Keywords: hydroalcoholic; antibacterial; antifungal; phytochemistry; cytotoxicity

Lista de Figuras

Artigo 2

- Figura 1 Parâmetros de motilidade total e progressiva de espermatozoides de suínos (%) (média±erro padrão) frente as diferentes concentrações do extrato hidrolacoólico de *Schinus terebinthifolius*.^{abcd}Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre as concentrações na mesma avaliação de motilidade..... 54

Artigo 3

- Figura 1 Porcentagem de bactérias Gram-positivas inibidos (Concentração Inibitória Mínima = CIM) e eliminados (Concentração Bactericida Mínima = CBM) pelos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* (ST), *E. uniflora* (EU), *P. hydropiperoides* (PH), *E. hyemale* (EH), *B. trimera* (BT) e *S. chilensis* (SC) nas concentrações testadas..... 83
- Figura 2 Porcentagem de bactérias Gram-negativas inibidas (Concentração Inibitória Mínima = CIM) e eliminadas (Concentração Bactericida Mínima = CBM) pelos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* (ST), *E. uniflora* (EU), *P. hydropiperoides* (PH), *E. hyemale* (EH), *B. trimera* (BT) e *S. chilensis* (SC) nas concentrações testadas..... 84

Artigo 4

- Figura 1 Motilidade total e progressiva média (%) (±Desvio Padrão) de espermatozoides suínos frente a diferentes concentrações e tempos de exposição ao extrato de *P. hydropiperoides* (PH).^{abc}Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de exposição (p<0,05)..... 105

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Results of the broth microdilution test, using hydroalcoholic extracts (mg.mL^{-1}), itraconazole ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), and ketoconazole ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) in clinical isolates of <i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>Malassezia pachydermatis</i> , and dermatophytes.....	31
Tabela 2	Percentage of antioxidant activity by DDPH and ATBS tests ($\% \pm \text{SD}$), quantification of phenols and flavonoids ($\text{mg/mL} \pm \text{SD}$) in plant extracts of <i>Schinus terebinthifolius</i> (ST), <i>Polygonum hydropiperoides</i> (PH), <i>Equisetum hyemale</i> (EH), and <i>Eugenia uniflora</i> (EU).....	32
Tabela 3	Chemical composition by ultra-performance liquid chromatography of hydroalcoholic extracts of <i>Schinus terebinthifolius</i> (ST), <i>Eugenia uniflora</i> (EU), and <i>Polygonum hydropiperoides</i> (PH).....	33
Tabela 4	Vero cell viability ($\%$) after treatment with hydroalcoholic extracts of <i>Schinus terebinthifolius</i> (ST), <i>Polygonum hydropiperoides</i> (PH), and <i>Eugenia uniflora</i> (EU) at concentrations from 100 to 0.19 mg.mL^{-1}	34

Artigo 2

Tabela 1	Compostos identificados através da cromatografia de ultra-alta eficiência (CLAE) no extrato hidrolacóico de <i>Schinus terebinthifolius</i>	51
Tabela 2	Análise dos parâmetros de motilidade de espermatozoides de suínos ($\text{média} \pm \text{erro padrão}$) frente as diferentes concentrações do extrato hidrolacóico de <i>Schinus terebinthifolius</i>	54

Tabela 3	Análise das células espermáticas de suíno (média±erro padrão) através da citometria de fluxo após tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>Schinus terebinthifolius</i>	56
----------	--	----

Artigo 3

Tabela 1	Perfil de resistência das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas de lesões cutâneas de animais e cepas padrões através do teste de antibiograma com fármacos utilizados na rotina veterinária.....	79
----------	--	----

Tabela 2	Concentrações inibitórias (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) através do teste de microdiluição em caldo utilizando os extratos hidroalcoólicos de <i>S. terebinthifolius</i> , <i>S. chilensis</i> , <i>P. hydropiperoides</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>B. trimera</i> frente às bactérias Gram-negativas.....	81
----------	---	----

Tabela 3	Concentrações inibitórias (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) através do teste de microdiluição utilizando os extratos hidroalcoólicos de <i>S. terebinthifolius</i> , <i>S. chilensis</i> , <i>P. hydropiperoides</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>B. trimera</i> frente às bactérias Gram-positivas.....	82
----------	--	----

Tabela 4	Compostos químicos identificados através de cromatografia líquida de ultra-eficiência dos extratos hidroalcoólicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> (ST), <i>Eugenia uniflora</i> (EU) e <i>Polygonum hydropiperoides</i> (PH).....	85
----------	---	----

Tabela 5	Compostos químicos identificados através de cromatografia gasosa dos extratos hidroalcoólicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> (ST), <i>Eugenia uniflora</i> (EU) e <i>Polygonum hydropiperoides</i> (PH).....	88
----------	--	----

Tabela 6	Atividade hemaglutinante e hemolítica em eritrócitos caninos a 2% nos extratos hidroalcoólicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> , <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Polygonum hydropiperoides</i>	89
----------	--	----

Artigo 4

Tabela 1	Compostos químicos identificados por cromatografia líquida de ultra-eficiência do extrato hidroalcoólico de <i>P. hydropiperoides</i> (PH).....	105
----------	---	-----

Tabela 2	Parâmetros de motilidade espermática (média±desvio padrão) frente ao extrato hidroalcoólico de <i>P. hydropiperoides</i> (PH) nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas.....	106
Tabela 3	Resultado da citometria de fluxo das células espermáticas de suínos (média±erro padrão) frente às diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>P. hydropiperoides</i> (PH).....	108

Lista de Abreviaturas e Siglas

Å	Ångström
µL	Microlitro
<i>A.h</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>A.o</i>	<i>Alloiococcus otitis</i>
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
ANR	Acrossoma Não Reagido
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Proteína proapoptótica
BCF	Frequência do batimento flagelar cruzado
Bcl-2	Proteína antiapoptótica
BHI	Infusão de cérebro e coração
BT	<i>Baccharis trimera</i>
BTS	Beltsville Thawing Solution
CASA	Sistema computadorizado de análise de sêmen
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC50	Concentração citotóxica em 50%
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEF	Cefalexina
CET	Cetoconazol
CEX	Ceftriaxona
CFM	Concentração Fungicida Mínima

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAP	Distância média percorrida
DCL	Distância curvilínea
DFC	Carboxifluoresceína diacetate
DFI	Índice de fragmentação de DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DSL	Distância linear
Dt	Dermatófitos
<i>E.a</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E.c</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E.clo</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E.fl</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E.fa</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EH	<i>Equisetum hyemale</i>
ENR	Enrofloxacin
ES	Extrato seco
EU	<i>Eugenia uniflora</i>
EUCAST	European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing
eV	Energia de colisão
F	Fluidez de membrana
FAME	Padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Frag	Fragmentação
G	Grama
GC-MS	Cromatografia Gasosa com espectro de massas
H2DCF-DA	2'7'diclorofluoresceína diacetato

HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
Hz	Hertz
IM	Integridade de membrana
IP	Iodeto de propídeo
ITR	Itraconazol
<i>K.p</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kg	Quilograma
L	Litro
Labvir	Laboratório de Virologia e Imunologia
LC50	Concentração letal em 50%
LIN	Linearidade
LPO	Lipoperoxidação
LRD	Laboratório Regional de Diagnóstico
<i>M.p</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
m/z	Relação massa/carga
Mcg	Micrograma
MDA	Malondialdeído
Mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MicVet	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária
MOPS	Ácido 3(N-Morpholino)propanesulfônico
MP	Motilidade progressiva
MS/MS	Espectrometria de massas
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
MT	Motilidade total
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
n / n°	Número
NEO	Neomicina
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial de Saúde

OXA	Oxacilina
<i>P.a</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P.m</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P.p</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P.v</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PDA	Detector de arranjo de diodos
PEN	Penicilina
pH	Potencial de hidrogênio
PH	<i>Polygonum hydropiperoides</i>
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
PNA	Lecitina de amendoim <i>Arachis hypogaea</i>
PPGV	Programa de Pós-Graduação em Veterinária
ppm	Partes por milhão
R	Resistente
ReproPEL	Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal
Rh123	Rodamina 123
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RS	Rio Grande do Sul
RT	Tempo de retenção
S	Suscetível
<i>S.a</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.ag</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S.b</i>	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
<i>S.d</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>S.h</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>S.ho</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>S.i</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
<i>S.p</i>	<i>Streptococcus pluranimalium</i>
<i>S.sp</i>	<i>Streptococcus sp</i>
<i>S.x</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
SC	<i>Solidago chilensis</i>

SE	Solução Estoque
seg	Segundos
ST	<i>Schinus terebinthifolius</i>
STR	Retilinearidade
T	Transmitância
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
Un	Unidade
UV/Vis	Ultravioleta e/ou visível
V	Volt
v/v	volume/volume
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade linear progressiva
WOB	Oscilação

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
°	Graus
'	Minutos
''	Segundos
±	Mais ou menos
+	Positivo
-	Negativo
>	Maior
<	Menor
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
©	Copyright
®	Marca registrada

Sumário

1 Introdução.....	19
2 Objetivos	24
3 Artigos.....	25
3.1 Artigo 1.....	25
3.2 Artigo 2.....	43
3.3 Artigo 3.....	67
3.3 Artigo 4.....	99
4 Considerações finais	117
Referências.....	118
Anexos	148

1 Introdução

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é toda planta ou partes desta que contenham substâncias ou classes de substâncias responsáveis por uma ação terapêutica (BRASIL, 2011). O uso das plantas medicinais é uma prática muito antiga, e mesmo tendo estudos com expressivos avanços científicos, muitas espécies ainda são utilizadas conforme a medicina popular (ALVIM et al., 2006). Atualmente as plantas ganham espaço tanto para tratamentos em humanos como nos animais, devido ao consumidor almejar produtos ecologicamente corretos, sem resíduos químicos e também na busca por menores custos no tratamento, colaborando desta forma com aspectos econômicos e sociais (WHO, 2002; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

No âmbito da pesquisa, a busca por novos princípios bioativos para combate de microrganismos patogênicos resistentes tem sido intensificada, e apresenta grande relevância (CECHINEL FILHO et al., 1998; BARBOSA-FILHO et al., 2007). A seleção de microrganismos resistentes a antimicrobianos vem se destacando como um problema em saúde pública, onde a velocidade de disseminação dos genes de resistência tem sido maior que a capacidade de produção de novos fármacos efetivos (ARAÚJO et al., 2009). Sendo assim, pesquisas vêm demonstrando plantas com atividade antimicrobiana, e algumas espécies têm apresentado mais de um tipo de atividade *in vitro* (DUARTE 2006; ALVES et al., 2009). Para os testes de avaliação antimicrobiana tanto para fármacos como extratos vegetais/compostos isolados, estudos se baseiam, principalmente, em protocolos disponibilizados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) e European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) para avaliações padronizadas, ambos apresentando resultados de confiabilidade equivalentes (STOPPA et al., 2009; SILLEY et al., 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte para se obter uma variedade de fármacos (PRASHAR et al., 2003). No Brasil, em 2008, foi aprovado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que dentre seus objetivos, tem o intuito de garantir acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009). E

adicionalmente a isso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem regulamentando o uso de algumas plantas medicinais, através de estudos científicos comprobatórios de eficácia em determinadas enfermidades e/ou sinais clínicos (BRASIL, 2011).

Porém, dentro desta realidade surgem preocupações acerca do uso popular e tradicional sem avaliação toxicológica dos recursos vegetais, sendo apenas o uso empírico insuficiente para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006; AGRA et al., 2007; 2008). As reações adversas provenientes do uso de plantas ou extratos vegetais podem ser decorrentes de seus componentes, contaminantes ou preparações caseiras duvidosas (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). Estes efeitos podem também ocorrer por substâncias isoladas de plantas, como diversos compostos orgânicos, produtos do metabolismo primário e secundário, e que podem exercer efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. Para assegurar o uso das plantas, é imprescindível a realização de testes de eficácia, segurança e qualidade, utilizando-se métodos para a obtenção de informações toxicológicas pré-clínicas através de pesquisas *in vitro* e *in vivo* (ZÖLLNER & SCHWARZ, 2013). Assim, faz-se necessária a determinação dos compostos presentes, dose/concentração, duração, frequência, via de exposição, assim como propriedades físico-químicas e suscetibilidade individual que provoquem um efeito nocivo (SPINOSA et al., 2008). Porém estudos avaliando a toxicidade de plantas medicinais ainda são pouco realizados, necessitando ser intensificados (VEIGA JÚNIOR et al., 2005; CLEFF et al., 2008).

Na fase de avaliação toxicológica, além da realização de testes, também é preciso fazer o emprego dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement* = Substituição, Redução e Refinamento) em todos âmbitos da pesquisa. É possível que diferentes substâncias possam causar níveis elevados de toxicidade ou serem letais e que, através de uma sequência de ensaios prévios (*in vitro*, *in chemico*, *in silico* e *ex vivo*) ao uso de animais, pode-se determinar a continuação dos estudos ou modificações em diversos aspectos, como concentração ou via de administração, além de conhecer as alterações sobre determinadas estruturas, órgãos e ou células. Com isso, ocorre uma redução nos custos e tempo no desenvolvimento da pesquisa, além da substituição e redução no número de animais utilizados na etapa *in vivo* (CAZARIN et al., 2004; MARTINEZ-HIDALGO, 2007; OECD, 2017).

A maioria dos estudos de toxicidade utiliza células de linhagem (pele, rim e fígado), entretanto existe a possibilidade de usar outras fontes, como a célula espermática. Já que estas possuem sensibilidade genérica às células somáticas e uma alta sensibilidade a toxinas que provoquem alteração na homeostasia iônica celular, energia e função mitocondrial (HOORNSTRA et al., 2003; JÄÄSKELÄINEN et al., 2003; SEVERIN et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; ANDERSSON et al., 2010). A avaliação das células espermáticas pode ser realizada através de sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA), que fornece informações sobre a cinética espermática, através da digitalização dos espermatozóides por vídeo, calculando os parâmetros de linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação ou wobble (WOB), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide (ALH) que determinam quantitativamente o movimento; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) representam a qualidade da cinética; e motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) (SILVA et al., 2009). Associado ao CASA, pode-se fazer avaliação por citometria de fluxo, técnica que é bastante empregada na pesquisa de fármacos, onde é possível determinar as propriedades físicas e fluorescência de partículas de células, permitindo a avaliação profunda sob diversos parâmetros, entre eles, atividade metabólica e mitocondrial, respiração celular, degradação e dano de DNA, formação de espécies reativas de oxigênio e integridade de membrana (FRITZSCHE & MANDENIUS, 2010; GREEN et al., 2011; HOSSAIN et al., 2011).

Outros métodos vêm ganhando espaço em etapas iniciais de avaliação de toxicologia e eficácia, representando alternativas ao uso de animais de laboratório, como testes em seres invertebrados (larva de camarão - *Artemia salina*, ou pulga d'água - *Daphnia pulex*) ou animais em estágio inicial de desenvolvimento (ovo de galinha embrionado) (ANDRADE et al., 2002). Assim como a utilização de células sanguíneas, que apresenta como vantagem a metodologia simples, pouco invasiva e de baixo custo, onde se pode avaliar substâncias com capacidade de interação com a membrana de eritrócitos, estabelecendo assim uma triagem toxicológica (DRESCH et al., 2005; PEQUENO & SOTO-BLANCO, 2006).

Com relação a plantas medicinais com ampla distribuição em Pelotas, RS, destacam-se algumas de uso empírico pela população local como a *Baccharis trimera* (Carqueja), *Solidago chilensis* (Lanceta), *Equisetum hyemale* (Rabo-de-lagarto),

Eugenia uniflora (Pitangueira), *Polygonum hydropiperoides* (Erva-de-bicho) e *Schinus terebinthifolius* (Aroeira mansa) (GIORDANI, 2013). A espécie *E. uniflora*, possui importância por pertencer a família Myrtaceae, que apresenta maior número de representantes na flora arborácea do Rio Grande do Sul, destacando-se também *B. trimera* da família Asteraceae nativa do sul e sudeste do país, com ampla utilização na medicina popular. As espécies *P. hydropiperoides* pertencente à família Polygonaceae e *S. chilensis* da família Asteraceae, apesar de serem consideradas plantas invasoras, são muito utilizadas no Brasil como medicinais, enquanto *S. terebinthifolius* da família Anacardiaceae que é originária do Peru, apresenta alta distribuição no Brasil, possuindo propriedades medicinais e alimentícias. Já a planta *E. hyemale*, da família Equisetaceae, apesar de ter uso na medicina popular também é muito utilizada com fins ornamentais (LISBOA-NETO et al., 1998; JÁCOME et al., 2004; LENZI & ORTH, 2004; CESÁRIO & GAGLIANONE, 2008; LORENZI & MATOS, 2008).

Existem relatos sobre a atividade antimicrobiana de grande parte das plantas encontradas na região de estudo, entre elas, *E. uniflora* (SOUZA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008), *P. hydropiperoides* (FREIXA et al., 1998) e *S. terebinthifolius* (FREIRES et al., 2010), *E. hyemale* (QUEIROZ et al., 2015) *B. trimera* (BETONI et al., 2006; ALEIXO et al., 2013) e *S. chilensis* (VILA et al., 2002), porém muitos estudos *in vitro* são desenvolvidos com cepas padrões e isolados humanos, diferindo da realidade em medicina veterinária, onde é crescente o número de isolados microbianos multirresistentes, especialmente de bactérias e fungos (LARA et al., 2008; CRUZ et al., 2012; GUTERRES et al., 2014; MORAES et al., 2014).

Outro aspecto importante é a identificação da composição química das plantas e extratos, já que suas atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, antiúngica, antioxidante, entre outras, estão associadas com a presença de determinadas substâncias, como os compostos fenólicos, por exemplo (FINKEL & HOLBROOK, 2000; SOUZA et al., 2007; ORHAN et al., 2010). Em relação à atividade antioxidante, tais compostos têm sido encontrados nas plantas, e muitos deles com alta eficiência sobre a eliminação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (KENNY et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são produtos fisiológicos das células normais, podendo atuar benéficamente (ex: sinalização celular) ou, em superprodução/deficiência de antioxidantes, provocando efeitos

deletérios, por exemplo, estresse oxidativo causando danos em lipídios, proteína e DNA celular, e alterações em proteínas (VALKO et al., 2007).

Diante desta realidade, a determinação do potencial antimicrobiano, perfil fitoquímico e tóxico dos extratos vegetais torna-se de grande importância, tendo em vista a aplicabilidade dos resultados.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de *Baccharis trimera*, *Equisetum hyemale*, *Eugenia uniflora*, *Polygonum hydropiperoides*, *Schinus terebinthifolius* e *Solidago chilensis*, assim como avaliar a toxicidade, potencial antioxidante e identificar os compostos químicos presentes.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de microrganismos patogênicos (bactérias e fungos) isolados de casos clínicos em animais frente aos extratos hidroalcoólicos de *Baccharis trimera* (Carqueja), *Equisetum hyemale* (Rabo-de-lagarto), *Eugenia uniflora* (Pitangueira) *Polygonum hydropiperoides* (Erva-de-bicho), *Schinus terebinthifolius* (Aroeira mansa) e *Solidago chilensis* (Lanceta), além de testar a suscetibilidade dos isolados aos fármacos de uso rotineiro na veterinária.

- Realizar teste de citotoxicidade *in vitro*, utilizando células de linhagem Vero e espermatozóides suínos, dos extratos vegetais que apresentarem atividade antimicrobiana *in vitro*;

- Determinar a atividade antioxidante dos extratos vegetais;

- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides dos extratos vegetais;

- Identificar os compostos químicos majoritários presentes nos extratos vegetais com maior atividade antimicrobiana *in vitro*;

- Realizar teste de atividade hemolítica e hemaglutinante dos extratos vegetais que apresentarem maior atividade antimicrobiana *in vitro*;

- Realizar teste de embriotoxicidade sobre embriões de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) dos extratos vegetais com maior atividade antimicrobiana *in vitro*.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Chemical, cytotoxic and antifungal properties of plant extracts against isolates of veterinary importance

Claudia Giordani, Isabel Martins Madrid, Luciana Laitano Dias de Castro, Karina Affedt Guterres, Caroline Bohnen de Matos, Jéssica Fernanda Hoffmann, Fábio Clasen Chaves, Renata Osório de Faria, Marlete Brum Cleff

Será submetido à revista Mycopathologia

**Chemical, cytotoxic and antifungal properties of plant extracts against isolates of
veterinary importance**

Claudia Giordani^[1], Isabel Martins Madrid^[2], Luciana Laitano Dias de Castro^[3], Karina Affedlt Guterres^[1], Caroline Bohnen de Matos^[1], Jessica Fernanda Hoffmann^[4], Fábio Clasen Chaves^[4], Renata Osório de Faria^[5], Marlete Brum Cleff^[6]

- ^[1] Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. clarte@hotmail.com, +55 53 3275-7504
- ^[2] Centro de Controle de Zoonoses de Pelotas, Prefeitura Municipal de Pelotas, RS, Brasil.
- ^[3] Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil.
- ^[4] Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.
- ^[5] Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.
- ^[6] Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

ABSTRACT

Sporotrichosis, malasseziosis, and dermatophytosis are among the most prevalent animal fungal diseases. Therapeutic treatment of these diseases is impaired due to the limited amount of available active principles, their toxic effects, and occurrence of resistance. The objectives of this study were to evaluate the antifungal potential of hydroalcoholic extracts of *Equisetum hyemale*, *Eugenia uniflora*, *Polygonum hydropiperoides*, and *Schinus terebinthifolius* against *Sporothrix brasiliensis*, *Malassezia pachydermatis*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, and *Trichophyton mentagrophytes*, determine the toxicity of the extracts, and characterize their composition. Antifungal activity was evaluated by the broth microdilution test (CLSI M38-A2 and M27-A3), chemical composition was determined by LC-MS, and extract toxicity was assessed using the MTT assay on Vero cells. Extracts of *E. hyemale* and *P. hydropiperoides* showed limited antifungal activity while extracts of *S. terebinthifolius* and *E. uniflora* demonstrated fungicidal and fungistatic activities, low cytotoxicity, and the greatest antioxidant capacity and phenolic and flavonoid contents.

Keywords: Plants medicinal; Mycoses; Clinical isolates; extracts.

Introduction

Fungal diseases are prominent in the veterinary field. Some mycoses including sporotrichosis and dermatophytosis with great zoonotic potential are of public health concern. Additionally, animal contact with people and the increased number of companion animals promote transmission of such diseases¹.

Sporotrichosis, malasseziosis, and dermatophytosis are amongst the most frequent mycoses in domestic animals. Species of the *Sporothrix schenckii* complex can cause sporotrichosis in humans and animals, commonly affecting felines. *Sporothrix brasiliensis* is the predominant species in Southeast and South regions of Brazil². *Malassezia pachydermatis* is the major fungal agent of otitis and dermatitis. Its capacity to form biofilms in a hospital setting increases the risk to immunocompromised patients in intensive care³. Dermatophytes are spread through the environment, utensils, and humans among others, via direct or indirect contact. In addition, some animals may act as asymptomatic carriers of these fungi^{4,5}.

Treatment of veterinary mycoses is difficult due to limited effective antifungal agents, high cost, and adverse side effects. Treatment is usually long, with reports of recurrence as well as resistant isolates⁶. Therefore, discovery of novel antifungal compounds and the development of new treatment strategies against these pathogens are necessary.

Plant extracts have long been surveyed in search for effective and safe therapeutic alternatives. Ethnobotanical uses of plants may help direct the search for such compounds^{7,8-12}. The common use of plants in folk medicine involves homemade preparations for humans and animals without scientific knowledge of efficacy or toxicity. Indiscriminate use of such products can lead to adverse effects from over dosage, drug interactions, and the presence of unknown toxic compounds or contaminants. Plant certification and safe use of plant extracts involves developing pre-clinical studies and characterization of compounds present in plant species used empirically by the population⁷.

The objective of this study was to perform *in vitro* evaluations of the antifungal activity of hydroalcoholic extracts from the ethnobotanically relevant plants: *Equisetum hyemale*, *Eugenia uniflora*, *Polygonum hydropiperoides*, and *Schinus terebinthifolius* on clinical isolates of dogs and cats, as well as to determine antioxidant potential, phenolic composition, and cytotoxicity of the extracts.

Plant extracts

Plant shoots were collected in Pelotas-RS (31°33'02.0' S, 52°16'45.5" W) between March/April. Voucher specimens were deposited in the PEL Herbarium, Federal University of Pelotas (UFPel), Capão do Leão-RS, Brazil and identified as *Schinus terebinthifolius* (ST) (25934), *Eugenia uniflora* (EU) (25930), *Polygonum hydropiperoides* (PH) (25931), and *Equisetum hyemale* (EH) (25928). One hundred grams of dried ground sample from each plant was extracted using 500 mL ethanol (70%)¹³ and filtered through filter paper (80 g/m²). The extract was concentrated in a rotary evaporator under vacuum at 50°C. The concentrated extract was diluted to 500 mL using sterile distilled water (pH 7.5).

Antifungal Susceptibility Testing

Antifungal activity of each extract was tested using a broth microdilution test^{14,15} against thirty clinical isolates from the Mycological Diagnostic and Research Center-UFPel collection including otitis and dermatitis (*Malassezia pachydermatis* n=10/canines), dermatophytosis (*Microsporum canis* n=1, *Microsporum gypseum* n=1, *Trychophyton mentagrophytes* n=1/canines), and sporotrichosis (*Sporothrix brasiliensis* n=17/felines) causing mycoses. *M. pachydermatis* inoculum was grown for 48h (35°C) on Sabouraud dextrose agar containing chloramphenicol. *S. brasiliensis* was grown on yeast extract agar for 72h (35°C), and dermatophytes were grown on potato dextrose agar for 288h (25°C). Fungal inoculum was prepared by transferring a fraction of each grown colony into a sterile saline solution. Inoculum concentration was standardized in a spectrophotometer [70% transmittance (T) for *S.*

brasiliensis, 80-82% T for dermatophytes, and 60-65% T for *M. pachydermatis* at 530 nm] using saline and culture media (RPMI 1640 with MOPS or Sabouraud Broth). A positive control containing culture media and fungal inoculum, and a negative control containing culture media only (blank) were prepared. Hydroalcoholic extracts were tested in triplicate at 10 serial concentrations (0.19-100 mg.mL⁻¹). Tests with ketoconazole (0.015-16 µg.mL⁻¹) and itraconazole (0.015-64 µg.mL⁻¹) were also performed to evaluate isolate sensitivity. Isolates with MICs ≥ 8 µg.mL⁻¹ for itraconazole and ketoconazole for filamentous fungi, and MIC ≥ 1 µg/mL for itraconazole and ≥ 4 µg.mL⁻¹ for ketoconazole for yeasts were considered resistant^{14,15}. Assay results were expressed in minimum inhibitory concentration (MIC) by measuring colony growth or medium turbidity compared to the positive control after 72h at 35°C (*M. pachydermatis* and *S. brasiliensis*) or 120h at 25°C (dermatophytes). For determination of minimum fungicidal concentration (MFC), 10 µL of the microplate suspensions (MIC) were seeded and incubated in culture media at specific temperatures for each fungus^{13,14}.

Determination of the chemical composition

Total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent. After a 2h reaction the absorbance was measured at 725 nm, and results were expressed in milligram of gallic acid equivalents per gram of sample¹⁶. Flavonoid content was determined by measuring absorbance at 510 nm and results were expressed in milligrams of (+)-catechin equivalents per g of sample¹⁷.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin e-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging capacities of crude extracts were determined and expressed as percent (%) DPPH and ABTS radical remaining according to the equation: %inhibition= $A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}} \times 100$; where A_{control} is the absorbance of the control (containing all reagents except the sample) and A_{sample} is the absorbance of the sample¹⁸.

Phenolic compounds present in plant extracts (4 mg.mL⁻¹ of methanol) were analyzed by LC-MS¹⁹. Phenolic compounds were characterized by UV-Vis spectra (220-800 nm), retention time relative to the external standards, mass spectra, and fragmentation patterns.

Cytotoxicity assay

Extract cytotoxicity was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide (MTT) method, in triplicate²⁰. The test was performed on VERO cells, which were maintained in RPMI 1640 media and supplemented with 10% FBS and kept in contact with 12 hydroalcoholic extract concentrations (100-0.045 mg.mL⁻¹) for 24h.

Statistical Analysis

Antifungal activity and cytotoxicity data for each extract was subjected to an analysis of variance (ANOVA), and the means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$) (Statistix software v. 9.0).

Results

Antifungal Susceptibility Testing

Extracts of ST, PH, and EU showed antifungal activity against all isolates tested, with *M. pachydermatis* being the most susceptible. ST and EU had the lowest MIC and MFC, respectively (Table 1).

Table 1 Results of the broth microdilution test, using hydroalcoholic extracts (mg.mL^{-1}), itraconazole ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), and ketoconazole ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) in clinical isolates of *Sporothrix brasiliensis*, *Malassezia pachydermatis*, and dermatophytes

Espécie		<i>S.b</i>		<i>M.p</i>		Dt	
		Mean (mg.mL^{-1})	Range (mg.mL^{-1})	Mean (mg.mL^{-1})	Range (mg.mL^{-1})	Mean (mg.mL^{-1})	Range (mg.mL^{-1})
ST	MIC	6.61 ^c	3.12-12.5	3.12 ^a	3.12	6.25 ^b	6.25
	MFC	13.78 ^b	3.12-50	5.65 ^a	3.12-6.25	6.25 ^b	6.25
EH	MIC	100	100->100	100	100->100	83.33 ^a	100-50
	MFC	>100	>100	>100	>100	>100	>100
PH	MIC	59.19 ^a	6.25-100	5.65 ^a	3.12-25	25 ^c	12.5-50
	MFC	69.85 ^a	12.5-100	6.24 ^a	3.12-25	37.5 ^a	12.5-50
EU	MIC	20.95 ^{bc}	3.12-50	3.12 ^a	3.12	4.23 ^b	0.19-6.25
	MFC	30.88 ^b	12.5-50	4.63 ^a	3.12-12.5	4.23 ^b	0.19-6.25
CET	MIC	-	-	0.03	0.03	16	16
	MFC	-	-	0.07	0.03-0.25	16	16
ITR	MIC	20.96	0.5->64	-	-	5.58	0.25-16
	MFC	44.38	1->64	-	-	5.66	0.5-16

*S.b: *Sporothrix brasiliensis*; M.p: *Malassezia pachydermatis*; Dt: Dermatophytes; -: Not tested; >100 and >64: No activity at the concentrations tested; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MFC: Minimum Fungicide Concentration; S.b: *Sporothrix brasiliensis*; ST: *Schinus terebinthifolius*; EH: *Equisetum hyemale*; PH: *Polygonum hydropiperoides*; EU: *Eugenia uniflora*; CET: Ketoconazole; ITR: Itraconazole. ^{a,b,c}Means followed by different letters within a column are significantly different by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

When analyzing the antifungal potential of EU against dermatophytes, a smaller MIC was observed for *M. canis* (0.2 mg.mL^{-1}) when compared to *M. gypseum* and *T. mentagrophytes* (6.2 mg.mL^{-1}).

Cat isolates of *S. brasiliensis* (23.5%; n=4), the most virulent of the *Sporothrix schenckii* complex, were not sensitive to itraconazole at the highest tested concentration ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$). MIC and MFC against dermatophytes were $16 \mu\text{g/mL}$ for ketoconazole and 0.2 to $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for itraconazole. *M. canis* was the most resistant isolate, while different isolates of *M. pachydermatis* were highly susceptible to ketoconazole. Although there were no MIC and MFC values for most isolates, Queiroz et al.²² reported that ethanolic and methanolic extracts of *E. hyemale* had antifungal activity on *M. canis*, *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* (MIC and MFC from 0.62 to 1.25 mg.mL^{-1}).

Determination of the chemical composition

S. terebinthifolius extracts showed the highest scavenging capacity against DPPH and ABTS radicals and the highest phenolic and flavonoid contents, while *E. hyemale* extract had the lowest of all three parameters (Table 2).

Table 2 Percentage of antioxidant activity by DDPH and ATBS tests (% \pm SD), quantification of phenols and flavonoids (mg.mL⁻¹ \pm SD) in plant extracts of *Schinus terebinthifolius* (ST), *Polygonum hydropiperoides* (PH), *Equisetum hyemale* (EH), and *Eugenia uniflora* (EU)

Extracts	DDPH (%)	ATBS (%)	Phenols (mg.g ⁻¹)	Flavonoids (mg.g ⁻¹)
ST	86,81 \pm 0,65 ^a	95,81 \pm 0,48 ^a	129,32 \pm 5,03 ^a	11,01 \pm 0,16 ^a
PH	10,28 \pm 1,23 ^c	22,09 \pm 0,85 ^c	15,59 \pm 0,67 ^c	4,62 \pm 0,69 ^c
EH	0 ^d	28,49 \pm 0,98 ^c	5,87 \pm 1,68 ^d	0,16 \pm 0 ^d
EU	36,06 \pm 3,35 ^b	63,82 \pm 2,05 ^b	33,01 \pm 1,57 ^b	7,81 \pm 0,52 ^b

*ST: *Schinus terebinthifolius*; EH: *Equisetum hyemale*; PH: *Polygonum hydropiperoides*; EU: *Eugenia uniflora*; CET: Ketoconazole; ITR: Itraconazole.
^{a,b,c,d}Different letters correspond to a statistical difference between treatments in each test (p<0.05).

Eighteen phenolic compounds were identified in extracts tested. Ethyl gallate, myricitrin, and gallic acid were predominant in ST, quinic acid and quercetin were most abundant in PH, and quinic acid, ethyl gallate, ellagic acid, and myricitrin predominated in EU (Table 3).

Table 3 Chemical composition by ultra-performance liquid chromatography of hydroalcoholic extracts of *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU), and *Polygonum hydropiperoides* (PH)

RT (min)	Experimental m/z	Theoretical m/z	Error (ppm)	Identification	Main Fragments (m/z)	Collision Energy (eV)	mSigma	EU (mg.g ⁻¹)	ST (mg.g ⁻¹)	PH (mg.g ⁻¹)
2.83	191.056	191.0561	8.0	(-)-quinic acid ²	173.0432/127.0382	19.6	10.2	5.08	0.06	3.83
5.49	169.0140	169.0142	0.7	Gallic acid ¹			4.3	0.13	1.12	0.07
10.28	289.0729	289.0718	-4.0	Catechin ¹			32.8	0.04	0.09	0.20
11.27	353.0869	353.0878	3.9	Chlorogenic acid ¹			9.5	0.22	-	0.38
12.05	179.0363	179.0350	-7.3	Caffeic acid ¹			10.0	0.01	0.05	0.04
13.24	197.0458	197.0455	0.2	Ethyl gallate ²	169.0145/125.0242/140.0108	19.9	5.1	1.70	29.60	0.24
13.67	163.0405	163.0401	-2.4	Coumaric acid ¹			21.3	0.01	0.01	0.02
14.01	193.0518	193.0506	-5.9	Ferulic acid ¹			17.4	-	-	0.04
14.41	463.0869	463.0882	0.2	Myricitrin ²	316.0169	33.2	33.2	1.18	1.47	0.38
15.08	433.0781	433.0776	1.0	Quercetin 3-arabinoside ²	300.0249	31.7	44.5	0.67	0.25	1.34
15.21	300.9986	300.9990	1.4	Ellagic acid ¹			15.6	1.61	0.22	0.07
15.58	317.0319	317.0303	-5.1	Myrecetin ¹			13.2	0.05	0.08	0.13
16.89	301.0368	301.0354	-4.8	Quercetin ¹			9.2	0.43	0.11	4.12
18.00	285.0395	285.0405	2.9	Kaempferol ¹			12.5	0.12	0.01	0.03
18.35	269.0466	269.0455	-4.0	Apigenin ¹			12.6	0.70	-	-
19.41	255.0657	255.0663	2.4	Pinocembrin ¹			5.9	0.58	0.02	0.02
19.62	373.0931	373.0929	-1.0	3',5-Dihydroxy-3,4',5',7-tetramethoxyflavone ²	343.0420/358.0620	28.7	45.2	-	-	0.52
20.12	253.0513	253.0506	-2.6	Chrisin ¹			22.3	0.01	0.01	0.01

*RT: Retention time; Frag: Fragmentation; ¹ Confirmed with the standard compound; ² Confirmed with MS/MS; *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU), and *Polygonum hydropiperoides* (PH).

Cytotoxicity assay

Cell toxicity was observed for all extracts at the highest concentrations tested (100 and/or 50 mg.mL⁻¹) with 51% survival rate of Vero cells. At 3.1 mg.mL⁻¹, cell viability was more than 87% for all tested extracts (Table 4).

Table 4 Vero cell viability (%) after treatment with hydroalcoholic extracts of *Schinus terebinthifolius* (ST), *Polygonum hydropiperoides* (PH), and *Eugenia uniflora* (EU) at concentrations from 100 to 0.19 mg.mL⁻¹

Concentration (mg.mL ⁻¹)	ST (%)	EU (%)	PH (%)
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
100	65.97±4.78 ^A	51.28±2.75 ^B	73.51±4.29 ^A
50	74.95±0.02 ^{AB}	60±6.49 ^B	81.41±0.92 ^A
25	80.31±0.1 ^{AB}	71.04±2.83 ^B	79.89±7.2 ^{AB}
12.6	84.05±1.32 ^{AB}	75.24±2.32 ^B	82.89±6.16 ^{AB}
6.2	86.03±1.97 ^{AB}	79.01±5.48 ^B	87.02±2.35 ^A
3.12	87.8±1.57 ^A	89.01±2.1 ^A	89.83±1.55 ^A
1.5	90.06±3.77 ^A	91.15±1.53 ^A	90.23±1.07 ^A
0.78	92.18±3.06 ^B	92.67±0.87 ^A	97.16±1.69 ^A
0.39	94.23±4.76 ^B	93.84±1.05 ^B	100±0.00 ^A
0.19	98.16±2.42 ^A	97.86±0.86 ^A	100±0.00 ^A

*Different ^{AB}Letters correspond to a statistical difference between plant extracts in the same concentration (p<0.05).

Discussion

S. terebinthifolius extracts have been shown to possess antioxidant, antineoplastic, anti-inflammatory, and anti-allergic activities²¹, as well as antifungal activity against *S. schenckii*, *Candida* spp.¹⁰, and *Trichophyton rubrum*²².

Surprisingly, a single isolate of *M. canis* was more sensitive (with low MIC and MFC) than all other species of dermatophytes tested. Souza et al.⁹ found MICs between 0.5-1 mg.mL⁻¹ against 30 isolates of four dermatophyte species (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes*). In the current study, a mean MIC of 4.2 mg.mL⁻¹ was observed for

dermatophytes (Table 1). While slightly higher than that observed by Souza et al.⁹, it is still considered a relatively strong anti-dermatophyte.

In agreement with the anti-mycosis potential of PH hydroalcoholic extracts observed here, a dichloromethane extract from the same species previously showed antifungal activity against *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cryptococcus neoformans*, *M. gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *T. mentagrophytes*⁷.

Although ethanolic and methanolic extracts of EH previously demonstrated antifungal activity against *M. canis*, *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* (MIC and MFC 0.6-1.2 mg.mL⁻¹)¹¹, no MIC and MFC values were determined for most isolates using the hydroalcoholic EH extract (Table 1).

Fungal recurrences and resistance in animals with sporotrichosis have been observed⁸. Studies have demonstrated both the sensitivity of *S. brasiliensis* to itraconazole, as well as resistance²³⁻²⁵. In this study, resistance to itraconazole was confirmed (Table 1) which is relevant as itraconazole is the first choice of antifungal treatment against human and animal sporotrichosis.

Although *M. pachydermatis* isolates tested showed no *in vitro* resistance to ketoconazole (Table 1), a MIC of 32 µg.mL⁻¹ has been previously reported²⁶. Furthermore, malasseziosis recurrences may be related to antibiotic and/or corticoid treatments, concomitant diseases, incorrect antifungal treatment, and predisposing factors related to atrial anatomy (pendulous ear, auditory canal hairs, and auditory canal stenosis)²⁷.

Fungal resistance and cases of recurrence involve several factors including improper dosage and therapy frequency and treatment time^{1,28}. Issues with antifungal therapy occur because antifungal agents are regularly sold without a prescription and are therefore easily accessible, unlike human antibacterial agents²⁹. In addition, free access to antifungal agents

may lead to increased adverse effects and intoxication due to overdose or concomitant therapy with other drugs²⁷.

Itraconazole and ketoconazole resistant isolates were susceptible to ST, PH, and EU extracts, demonstrating the anti-*Sporothrix* and anti-dermatophyte potential of these plants (Table 1).

Plant extracts rich in phenolic compounds showed activity against *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, and dermatophytes³⁰⁻³². Synergism between phenolic compounds and antifungal agents has been previously reported to be effective against resistant strains^{33,34}. The antioxidant capacity of plant phenolics can be associated with their antifungal activity. Therefore therapy using antifungal drugs in combination with phenolics can be tested for refractory clinical cases.

Several compounds isolated from plant extracts have demonstrated antifungal activity against pathogenic microorganisms³⁵⁻⁴⁰, many of them found in the extracts in the present study (Table 3). Caffeic acid derivatives have been shown to reduce biofilm formation more effectively than fluconazole³¹. However, activity varies with the concentration of each compound and the microorganism involved. Quercetin, catechin, and epicatechin singly and in combination were ineffective against *Candida tropicalis* but effective when associated with fluconazole³⁴. Therefore, compound activity should be further evaluated both alone and in combination with antifungal agents.

The greater susceptibility of *M. pachydermatis* to ST, EU, and PH extracts compared to *S. brasiliensis* and dermatophytes can be explained by the lack of resistance seen in this species due to its thick-walled and multi-layered enveloping lipid capsule. Under favorable conditions, the lipid content decreases and phenolic compounds accumulated in the membrane can destabilize it and lead to fungal death^{41,42}.

S. terebinthifolius extract toxicity on Vero cells has been shown to be 50% at concentrations $>0.1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (hydroalcoholic) and at 0.05 mg.mL^{-1} (aqueous)⁴³. Ethanolic extracts from *E. uniflora* leaves (0.1 mg.mL^{-1}) showed 8% cytotoxicity on macrophages⁴⁴.

The highest tested concentrations of ST ($100\text{-}25 \text{ mg.mL}^{-1}$), EU (100 and 50 mg.mL^{-1}), and PH (100 mg.mL^{-1}) extracts were both promising showing 100% inhibition of the isolates and safe with $\leq 40\%$ toxicity (Table 4).

ST and EU extracts showed the highest antioxidant activity and phenolic compound content and lowest MIC and MFC against clinical isolates tested (Table 1, 2, 3). Despite compound abundance in the extracts, the limited cytotoxicity observed (Table 4) indicates a new viable therapeutic option for the treatment of mycoses.

Conclusion

Hydroalcoholic extracts from *S. terebinthifolius*, *P. hydropiperoides*, and *E. uniflora* presented fungistatic and fungicidal activities against clinical isolates of *Sporothrix brasiliensis*, *Malassezia pachydermatis*, and dermatophytes with low cytotoxic potential. *S. terebinthifolius* extract had the highest free radical scavenging potential and phenolic and flavonoid contents.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors want to acknowledge the UFPel, CAPES, CNPq, and FAPERGS.

REFERENCES

1. Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). J Am Vet Med Assoc. 2004;224(10):1623-1629.

2. Oliveira MM, Paes RA, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*. 2011;172(4):257-267.
3. Chang HJ, Miller HL, Watkins N, et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. *N Engl J Med*. 1998;338(11):706-711.
4. Ates A, Ilkit M, Ozdemir R, Ozcan K. Dermatophytes isolated from asymptomatic dogs in Adana, Turkey: A preliminary study. *J Mycol Med*. 2008;18(3):154-157.
5. Zhan P, Liu W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*. 2017;182:77–86.
6. Gupta AK, Foley KA, Versteeg SG. New antifungal agents and new formulations against dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017;182:127–141.
7. Freixa B, Vila R, Vargas L, et al. Screening for antifungal activity of nineteen latin american plants. *Phytother Res*. 1998;12(6):427–430.
8. Guterres KA, Matos CB, Osório LG, Schuch ID, Cleff MB. The use of (1-3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2014;177(3-4):217-221.
9. Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, et al. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. *Braz J Microbiol*. 2002;33(3):247-249.
10. Johann S, Pizzolatti MG, Donnici CL, Resende MA. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Braz J Microbiol*. 2007;38(4):632-637.
11. Queiroz GM, Politi FAZ, Rodrigues ER, et al. Phytochemical characterization, antimicrobial activity, and antioxidant potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts. *J Med Food*. 2015;0(0):1–5.

12. Lopes G, Pinto E, Salgueiro L. Natural products: an alternative to conventional therapy for dermatophytosis? *Mycopathologia*. 2017;182:143–167.
13. Schiedeck G, Bevilaqua GAP, Bachtigal GF, Bauer MVL. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2008.
14. CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi M38-A2 Guideline. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. 52 p.
15. CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A3 Guideline. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. 40 p.
16. Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-58.
17. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999;64(4):555–559.
18. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30.
19. Hoffmann JF, Zandoná GP, Santos PS, et al. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. *Food Chemistry*. 2017; 237:638-644.
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
21. Carvalho MG, Melo AGN, Aragão CFS, Raffin FN, Moura TFAL. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Rev Bras Pl Med*. 2013;15(1):158-169.

22. Silva FM, Paula JE, Espindola LS. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses*. 2009;52(6):511–517.
23. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrillón MR, et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Med Mycol*. 2014;52(1):56-64.
24. Borba-Santos LP, Gagini T, Ishida K, Souza W, Rozental, S. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with *in vitro* low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. *J Med Microbiol*. 2015;64(4):415–422.
25. Waller SB, Madrid IM, Ferraz V, et al. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. *Braz J Microbiol*. 2016;47(4):896-901.
26. Jesus FPK, Lautert C, Zanette RA, et al. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Vet Microbiol*. 2011;152(1-2):161-164.
27. White PD. Medical management of chronic otitis in dogs. *Compend Cont Educ Pract Vet*. 1999;21(8):716-727.
28. Fera MT, La Camera E, De Sarro A. New triazoles and echinocandins: mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7(8):981-998.
29. Hudson MMT. Antifungal resistance and over-the-counter availability in the UK: A current perspective. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(3):345-350.
30. Bagla VP, McGaw LJ, Elgorashi EE, Eloff JN. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(383):1-6.
31. De Vita D, Friggeri L, D’Auria FD, et al. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(6):1502-1505.

32. Singh G, Kumar P, Joshi SC. Treatment of dermatophytosis by a new antifungal agent 'apigenin'. *Mycoses*. 2014;57(8):497-506.
33. Faria NCG, Kim JH, Gonçalves LAP, et al. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Lett Appl Microbiol*. 2011;52(5):506-513.
34. Silva CR, Andrade Neto JB, Campos RS, et al. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1468-1478.
35. Inouye S, Takahashi M, Abe S. Composition, antifungal and radical scavenging activities of 4 propolis. *Med Mycol J*. 2011;52(4):305-313.
36. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharma Biol*. 2011;49(4):396-402.
37. Agüero MB, Svetaz L, Baroni V, et al. Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. *Ind Crop Prod*. 2014;57:166-173.
38. Alves CT, Ferreira ICFR, Barros L, et al. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from north eastern Portugal against *Candida* species. *Future Microbiol*. 2014;9(2):139-146.
39. Li Z, Guo X, Dawuti G, Aibai S. Antifungal activity of ellagic acid *in vitro* and *in vivo*. *Phytother Res*. 2015;29(7):1019-1025.
40. Salazar-Aranda R, Granados-Guzmán G, Pérez-Meseguer J, González GM, Torres NW. Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. *Molecules*. 2015;20(10):17903-17912.

41. Rao A, Zhang YQ, Muend S, Rao R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5062-5069.
42. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(1):41-50.
43. Moura-Costa GF, Nocchi SR, Ceole LF, et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(2):631-8.
44. Santos KKA, Matias EFF, Tintino SR, et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp Parasitol.* 2012;131(1):130–2.

3.2 Artigo 2

Identificação química e avaliação tóxica *in vitro* do extrato de *Schinus terebinthifolius* em espermatozoides de suínos

Claudia Giordani, Cristine Cioato da Silva, Rafael Mielke Barbosa, Diego Martins Pires, Jéssica Fernanda Hoffmann, Fábio Clasen Chaves, Carine Dahl Corcini, Antônio Sérgio Varela Júnior, Marlete Brum Cleff

Será submetido à revista *Toxicology In Vitro*

Identificação química e avaliação tóxica *in vitro* do extrato de *Schinus terebinthifolius* em espermatozoides de suínos

C. Giordani^{a,*}, C.C. da Silva^a, R.M. Barbosa^b, D.M. Pires^c, J.F. Hoffmann^d, F.C. Chaves^d,
C.D. Corcini^c, A.S. Varela Júnior^f, M.B. Cleff^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

^bFaculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

^cDepartamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

^dDepartamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil

^fInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

Resumo

Schinus terebinthifolius (Aroeira-mansa) é utilizada na medicina popular e na culinária, além de apresentar diversas atividades medicinais comprovadas. Porém, a viabilidade e o uso terapêutico de produtos provenientes de plantas dependem de diversas etapas, destacando-se o perfil químico e toxicológico. Assim, o estudo teve como objetivo investigar os compostos químicos e toxicidade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*. A identificação química do extrato foi realizada através da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLAE) com espectro de massas. A avaliação toxicológica foi realizada através da análise computadorizada de espermatozoides (CASA) e por citometria de fluxo utilizando células espermáticas de suínos (n=3). Na cromatografia do extrato foram identificados 14 compostos, destacando-se etil galato (29,60 mg.g⁻¹), miricitrina (1,47 mg.g⁻¹) e ácido gálico (1,12 mg.g⁻¹). As alterações sobre a motilidade espermática iniciaram-se na concentração 6,2 mg.mL⁻¹, estando a maioria dos parâmetros alterados em concentrações ≥12,5 mg.mL⁻¹ (p<0,05). Na concentração de 12,5 mg.mL⁻¹ foram observados nos espermatozoides: reação no acrossoma, aumento da fluidez e redução de potencial de membrana mitocondrial, e

também diminuição da lipoperoxidação (LPO) e níveis de espécies de oxigênio reativas (ROS), quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Através dos resultados, observou-se que o extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* possui como majoritário o composto fenólico etil galato, e em concentrações maiores leva a efeitos tóxicos e na mesma proporção, efeitos antioxidantes em espermatozoides suínos, identificando um possível mecanismo de ação e também uma possibilidade de isolamento de substâncias ativas com efeito antioxidante.

Palavras-chave: Hidroalcoólico, citotóxico, fluidez, mitocôndria, espécies de oxigênio reativas, lipoperoxidação.

Abstract

Schinus terebinthifolius (Aroeira-mansa) is used in folk medicine and cooking, in addition to presenting several proven medicinal activities. However, the viability and therapeutic use of products from plants depend on several stages, especially the chemical and toxicological profile. Thus, the study aimed to investigate the chemical compounds and *in vitro* toxicity of the hydroalcoholic extract of *Schinus terebinthifolius*. The chemical identification of the extract was carried out through ultra high performance liquid chromatography (HPLC) with mass spectrum. The toxicological evaluation was performed through computerized spermatozoa analysis (CASA) and flow cytometry using sperm cells from swine ($n = 3$). In the chromatography of the extract, 14 compounds were identified, notably ethyl gallate (29.60 mg.g^{-1}), myricitrin (1.47 mg.g^{-1}) and gallic acid (1.12 mg.g^{-1}). The changes on sperm motility started at the concentration 6.2 mg.mL^{-1} , with the majority of parameters being altered at concentrations $\geq 12.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($p < 0.05$). At the concentration of 12.5 mg.mL^{-1} were observed in the spermatozoa: Acrosome reaction, increase in fluidity and reduction of mitochondrial membrane potential, as well as reduction of lipid peroxidation (LPO) and levels of reactive oxygen species (ROS). when compared to control ($p < 0.05$). The results showed that the hydroalcoholic extract of *Schinus terebinthifolius* has the phenolic ethyl gallate as the major compound and, in higher concentrations, leads to toxic effects and, in the same proportion,

antioxidant effects on swine spermatozoa, identifying a possible mechanism of action and also a possibility of isolation of active substances with antioxidant effect.

Keywords: Hydroalcoholic, cytotoxic, fluidity, mitochondria, reactive oxygen species, lipoperoxidation.

Introdução

Schinus terebinthifolius (Aroeira-mansa) pertence a família Anacardiaceae e possui ampla distribuição no Brasil (Lorenzi e Matos, 2008), sendo os frutos utilizados, a nível mundial, como condimento (Lenzi e Orth, 2004). Estudos com a espécie têm demonstrado atividade antimicrobiana, acaricida, repelente, antitumoral, antialérgico, antiinflamatório, antioxidante e inseticida (Nascimento et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Santos et al., 2013; Uliana et al., 2016).

A viabilidade e uso terapêutico de extratos oriundos de plantas depende de várias etapas de investigação, incluindo estudos de toxicidade pré-clínicas, para assim, determinar as substâncias promissoras, dose/concentração, duração, frequência, via de exposição, propriedades físico-químicas e suscetibilidade individual que acarretam em um efeito nocivo (Spinosa et al., 2008). Apesar de haver testes para avaliação da toxicidade de fitoterápicos e outras substâncias *in vitro*, *in chemico*, *in silico*, *ex vivo* e *in vivo* (Fernandes et al., 2016; OECD, 2017), não há um padrão exigido pelas agências de fiscalização, apenas um roteiro a ser seguido. Entretanto, a investigação aprofundada de diversos parâmetros é necessária, principalmente nas etapas iniciais, para reduzir ou descartar os testes com animais, pois caso as concentrações ou produtos apresentarem-se tóxicos, pode acarretar na inviabilidade da continuação do estudo e ou aplicação do produto como nova alternativa terapêutica (Fritzsche e Mandenius, 2010).

A utilização de outras técnicas para avaliar o efeito sobre células coletadas de imediato dos seres vivos e que não provoquem lesões e sem necessidade de eutanásia, faz-se necessária. Assim, os espermatozoides são descritos por possuírem grande sensibilidade na

detecção de toxinas que provoquem alteração na homeostasia iônica celular, energia e função mitocondrial, além da sensibilidade semelhante às linhas de células somáticas (Hornstra et al., 2003; Andersson et al., 2006; Severin et al., 2005; Jääskeläinen et al., 2003). Outros benefícios de se trabalhar com células espermáticas, seria o elevado número no ejaculado, podendo ser coletados com frequência sem acarretar desconforto ou dano ao animal, com metodologia simples de coleta e fácil armazenagem (Rodriguez-Martinez e Wallgren, 2010). Apesar de escassos, existem trabalhos que utilizam espermatozoides de humanos e animais para avaliar a toxicidade de substâncias, atendendo assim o princípio dos 3Rs (Replacement, Reduction e Refinement) (Hornstra et al., 2003; Andersson et al., 2004; Vicente-Carrilo et al., 2015). Contudo, estudos com produtos oriundos de plantas, que utilizam células espermáticas como modelo, são mais voltados para aspectos de criopreservação, capacidade espermicida e ou contraceptiva (Souad et al., 2007; Jellad et al., 2011; Meamar et al., 2012).

Assim, diante do desconhecimento da concentração e efeito nocivo do extrato de *Schinus terebinthifolius*, o trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade *in vitro* do extrato hidroalcoólico da planta utilizando espermatozoides de suínos, assim como determinar a sua composição.

Material e métodos

Folhas de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-mansa) foram coletadas na cidade de Pelotas - RS entre os meses de março e abril, com umidade relativa do ar de 70-80%, temperatura de 20-29°C, em dias ensolarados, pela parte da tarde, registrada no Herbário PEL da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – PEL N° 25.934. As folhas foram coletadas, pesadas e secas a 35°-40°C em estufa com circulação de ar durante três dias.

O extrato hidroalcoólico foi preparado a partir das folhas secas de *Schinus terebinthifolius*, sendo este material triturado e misturado ao álcool de cereais 70°, na proporção de 200 g em 500 mL (Schiedeck et al., 2008). A solução na concentração de 20% foi filtrada, após foi aquecida a 50°C no rotaevaporador com banho, para retirada do solvente, restituindo o volume inicial com água destilada estéril, resultando em um extrato

hidroalcoólico. Para utilização nos ensaios biológicos, as concentrações foram baseadas conforme estudos prévios de atividade antimicrobiana do extrato hidrolcoólico de *S. terebinthifolius* (dados não publicados) (1,5 a 100 mg.mL⁻¹).

A composição do extrato foi determinada em cromatógrafo líquido de ultra-eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadruplo-tempo de vôo) (Impact HD), injetando dez microlitros dos extratos (300 µg.mL⁻¹: liofilizados diluídos em metanol). Os compostos fenólicos foram separados utilizando pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 x 150 mm, 100 Å, 3 µm) Phenomenex (Torrance, CA, USA), sendo solução de ácido fórmico em água (0,1% v/v, eluente A) e metanol (eluente B) usadas como fase móvel, com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna a 40°C. O gradiente de eluição foi: 0–2 min, 10% B; 2–15 min, 10–75% B; 15-30 min, 75% B; 30–32 min 75-10% B; 32-40 min, 10% B. O detector de arranjo de diodos (PDA) foi calibrado para fazer a varredura na faixa de 210–800 nm. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI negativo, com voltagem do capilar em 4000 V, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, gás de secagem em 8 L.min⁻¹ e temperatura da fonte de 180°C; usando os parâmetros padrão do equipamento. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM, cobrindo toda a faixa de aquisição (m/z 50 a 1200). Os compostos fenólicos foram caracterizados por espectro UV/Vis (220–800 nm), tempo de retenção relativo aos padrões externos, espectro de massa e padrão de fragmentação comparados com dados internos e da literatura.

O estudo foi dividido em duas etapas (experimento 1 e 2), onde foi avaliado inicialmente a ação de diferentes concentrações do extrato (baseadas em estudo não publicado de atividade antimicrobiana) na cinética espermática, e a segunda, avaliando o efeito dos extratos nas células através da citometria de fluxo, sendo utilizadas as concentrações do extrato que não apresentaram alteração ou reduziram poucos elementos da cinética espermática.

No experimento 1 foram utilizados três machos suínos da linhagem alta performance totalizando seis ejaculados. Os machos estavam alojados em baias individuais, localizadas

na Fazenda da Palma - Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas, e foram coletados pelo método da mão-enluvada. Logo após a coleta o sêmen foi diluído na proporção 1:1 (v/v) em *Beltsville Thawing Solution* – BTS. Para os tratamentos foram adicionados extrato hidrolacólico de *S. terebinthifolius* ao BTS em seis diferentes concentrações (C0=BTS; C1 = 1,5; C2 = 6,2; C3 = 12,5; C4 = 50 e C5 = 100 mg.mL⁻¹). Sendo que nessa primeira etapa foi avaliada a cinética espermática através da análise computadorizada de espermatozoides (CASA) no equipamento Axio Scope A1 Ax10 (Zeiss), com o programa Sperm Vision©. Toda avaliação ocorreu em condições isotérmicas 37°C, sendo realizada média de leitura em 10 campos (≥ 1000 células/campo), avaliando os parâmetros de motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), distância média percorrida (DAP - mm), distância curvilínea (DCL), distância linear (DSL - mm), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL – mm/s), velocidade linear progressiva (VSL – mm/s), frequência do batimento flagelar cruzado (BCF - Hz), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH - mm), oscilação (WOB - Hz), linearidade (LIN %) e retilinearidade (STR %).

Experimento 2 – Nesta etapa foram avaliadas as estruturas celulares através da citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing - Life Technologies). Os parâmetros avaliados foram acrossoma não reagido (ANR), integridade de membrana (IM) e fluidez da membrana (F), potencial de membrana mitocondrial (PMM), índice de fragmentação de DNA (DFI), espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica (LPO). Foi utilizado laser violeta ($\lambda = 405$ nm), e as células coradas com Hoechst 33342, exceto a avaliação de DNA (concentração de 16,2 mM), sendo eliminados efeitos não-espermáticos tendo por base o gráfico de dispersão (Martinez-Alborcia et al., 2012). Para as leituras foram adicionados 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) sem cálcio (80g de NaCl, 11,5g de KCl, 24g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄ e 1L de água Mili-Q), apresentando 20.000 eventos por análise de esperma com fluxo de 200 células/s; para cada avaliação foram utilizadas sondas fluorescentes específicas, permanecendo por cinco minutos protegidas da luz a 37°C, e posteriormente adicionado 500 μ l de PBS sem cálcio.

Para avaliar o acrossoma, foram utilizados os corantes de lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*) (PNA) associado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1 µg/ml) (FITC-PNA), e o iodeto de propídio (IP) (7,3 µM). Espermatozoides reagidos e ou alterados apresentavam FITC-PNA + e IP -, FITC-PNA - e PI +; FITC-PNA + e PI +. O resultado foi expresso em percentagem de células com acrossoma não alterado (FITC-PNA - e a IP -) (Martinez-Pastor et al., 2006).

Já para a integridade de membrana espermática foi adicionado corantes 27 mM carboxifluoresceína diacetato (DFC) (células intactas convertem em substância fluorescente, não retido no citoplasma) e 7,5 mM de iodeto de propídio (IP) (em células danificadas, penetra no núcleo), classificados em não-danificados (DCF+/IP-) e danificados (DCF+/IP+; DCF-/IP+; DCF-/IP-) expressos em % de células não danificadas (Fernández-Gago et al., 2013).

A avaliação do DNA foi realizada com o corante acridina laranja (corante+DNA fluoresce verde = intacto, e vermelho alaranjado = danificado). Para esta avaliação, em 10 µl de sêmen foi adicionado 5 µl tampão TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 7,2) por 30 segundos, e 10 µl Triton (0,1% Triton X-100) por 30 segundos, e 5 µl acridina laranja (ácido cítrico 0,037 M, Na₂HPO₄ 0,126 M, 0,0011 M de EDTA dissódico, NaCl 0,15 M, pH 6,0) (Evenson e Jost, 1994). As leituras foram realizadas em < 5 min após inserção do acridina laranja, e os resultados expressos em índice de DNA fragmentado (DNA lesado).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) foram avaliadas utilizando (1 uM) 2'7'diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) (fluoresce verde = oxidado), e 7,3 µM de IP (marcador de células danificadas). Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência verde de espermatozoides vivos (IP-) (Domínguez-Rebolledo et al., 2011).

A função mitocondrial foi avaliada através da sonda fluorescente rodamina 123 (Rh123) (13 uM), que cora mitocôndrias, emitindo fluorescência verde intensa em mitocôndria com atividade elevada (maior potencial eletroquímico) e PI (7,3 uM). Os espermatozoides intactos foram classificados em elevada (↑fluorescência e ↑acúmulo Rh123) e baixa funcionalidade (↓fluorescência e ↓acúmulo Rh123), expressos em % celular com ↑ funcionalidade mitocondrial (Silva et al., 2016)

A lipoperoxidação (LPO) foi medida utilizando 0,002 mM C11 BODIPY 581/591 (fluoresce vermelho = sem lipoperoxidação; verde = presença de lipoperoxidação). Os resultados foram expressos através da média de fluorescência verde e vermelha, sendo a leitura realizada após 2 horas, considerada a % de presença de LPO (Balao da Silva et al., 2013).

Para a análise estatística foi utilizado o software Statistix 9.0®, sendo dados com normalidade, foi utilizado o teste ANOVA, teste de Tukey.

Resultados e discussão

Foram identificados 14 compostos no extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* através da cromatografia de ultra-alta eficiência (CLAE) (Tabela 1), sendo etil galato o composto majoritário, seguido de ácido gálico em concentração bem inferior.

Tabela 1. Compostos identificados através da cromatografia de ultra-alta eficiência (CLAE) no extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*.

TR (min)	Experimental m/z	Teórica m/z	Erro (ppm)	Identificação	Concentração (mg.g ⁻¹)
2.83	191.056	191.0561	8.0	Ácido quínico ²	0.06
5.49	169.0140	169.0142	0.7	Ácido gálico ¹	1.12
10.28	289.0729	289.0718	-4.0	(+)-Catequina ¹	0.09
12.05	179.0363	179.0350	-7.3	Ácido cafeico ¹	0.05
13.24	197.0458	197.0455	0.2	Etil galato ²	29.60
13.67	163.0405	163.0401	-2.4	Ácido cumárico ¹	0.01
14.41	463.0869	463.0882	0.2	Miricitrina ²	1.47
15.08	433.0781	433.0776	1.0	Quercetina 3-arabinose ²	0.25
15.21	300.9986	300.9990	1.4	Ácido elágico ¹	0.22
15.58	317.0319	317.0303	-5.1	Miricetina ¹	0.08
16.89	301.0368	301.0354	-4.8	Quercetina ¹	0.11
18.00	285.0395	285.0405	2.9	Kaempferol ¹	0.01
19.41	255.0657	255.0663	2.4	Pinocembrina ¹	0.02
20.12	253.0513	253.0506	-2.6	Chrisina ¹	0.01

*TR:Tempo de retenção; ¹Confirmado com padrão; ²Confirmado com MS/MS (espectrofotometria de massas).

Os compostos encontrados no extrato e seus derivados já têm sido relatados, assim como a atividade antimicrobiana ou sinérgica associada a fármacos, como kaempferol,

quercetina, miricetina (Wu et al., 2013), ácido quínico, ácido gálico, ácido cafeico (Özçelik et al., 2011), catequina (Masika et al., 2004), crisina (Suresh Babu et al., 2006), pinocembrina (Singh et al., 2014), ácido elágico (Rangkadilok et al., 2012) e etil galato (Mazurova et al., 2015).

Com relação a toxicidade, estudo de Mohan et al. (2014) com o etil galato em dose única (5,10 e 20 mg.mL⁻¹) não demonstrou mortalidade nos ratos, e apesar haver algumas mudanças bioquímicas no soro, estas não demonstraram sinais de toxicidade, indicando sua segurança. A toxicidade aguda utilizando o composto ácido gálico, de forma isolada, sobre zebrafish (*Danio reio*) foi avaliada por Techer et al. (2015), demonstrando concentração letal em 50% (LC50) de 707 mg.L⁻¹ em 96 h, sendo considerado praticamente como não tóxico (LC50>100 mg.L⁻¹), porém, houve aumento significativo na atividade de superperóxido dismutase em 20 a 100 mg.L⁻¹, e efeitos subletais em concentrações de 10 e 40 mg.L⁻¹, induzindo a atividade de glutaciona peroxidase e glutaciona transferase, os quais, estão relacionados a atividade antioxidante nas células. Estudo de Jamalan e colaboradores (2016) demonstraram que dentre os flavonoides testados, e também presentes no extrato de *S. terebinthifolius*, o uso do kaempferol resultou na restauração da motilidade espermática após exposição prévia a metais tóxicos e diminuição dos níveis de malondialdeído (MDA = produto da peroxidação lipídica), sendo observado o contrário com a catequina e quercetina, ocorrendo diminuição da motilidade.

Alguns compostos presentes no extrato de *S. terebinthifolius* têm sido estudados em espermatozóides como demonstra Zribi et al. (2012), que ao avaliarem a quercetina juntamente com meio de criopreservação em sêmen humano observou efeitos benéficos ao descongelamento na motilidade e viabilidade espermática, e integridade de DNA. A miricetina e quercetina estudadas por Anderson et al. (1997), demonstraram efeito antígenotóxico em linfócitos e espermatozóides humanos quando combinadas com mutagênicos alimentares. A crisina, estudada por Ciftci et al. (2012), acarretou em um aumento da motilidade, concentração de espermatozóides e níveis séricos de testosterona, e diminuição de espermatozóides defeituosos ao ser administrada por via oral para ratos. Oyagbemi et al.

(2016), ao estudarem a ação do ácido gálico sobre a toxicidade reprodutiva em ratos Wistar tratados com ciclofosfamida demonstraram um potencial androgênico, sugerindo uma ação estimulante do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, além de inibir a peroxidação lipídica e aumentar o estado antioxidante, mantendo, histologicamente, o testículo e epidídimo próximos ao normal, sendo que os animais previamente tratados com o ácido gálico apresentaram maturação espermática moderada a normal. Estudo com ácido gálico em ratos tratados com doxorubicina (tóxico aos testículos e suas funções) demonstrou melhorias nos níveis de malondialdeído testicular, testosterona, Bax (proteína proapoptótica) e Bcl-2 (proteína antiapoptótica), taxa celular, atividade de glutathione peroxidase e catalase, e nas medidas histopatológicas testiculares (Çeribaşı et al., 2012). Purdy et al. (2004) avaliaram a catequina na motilidade espermática, havendo efeitos benéficos em todas as concentrações testadas quando comparados ao controle negativo.

Sabe-se que os flavonoides, pertencentes à classe dos polifenóis, têm capacidade de se incorporarem à membrana celular e afinidade pelas bicamadas lipídicas dependentes de sua estrutura química, como por exemplo, a presença de ligação éster na estrutura da epicatequina gallate e epigallocatequina gallate contribui para a hidrofobicidade, e consequentemente, maior afinidade e incorporação à membrana celular (Nakayama et al., 2000). A atuação das catequinas sobre a membrana está relacionada a ligação de hidrogênio dos grupos poli-hidroxilo com a fração fosfolipídica e a interação das regiões hidrofóbicas com cadeias acilo de fosfolipídios, sendo que este fenômeno também ocorre nos compostos fenólicos (Fujisawa e Kadoma, 1989; Nakayama et al., 2000).

Em relação à motilidade espermática total e progressiva observou-se uma diminuição conforme o aumento da concentração do extrato de *S. terebinthifolius*, quando comparado ao controle, apresentando diferença estatística a partir de 6,2 mg.mL⁻¹ (Figura 1).

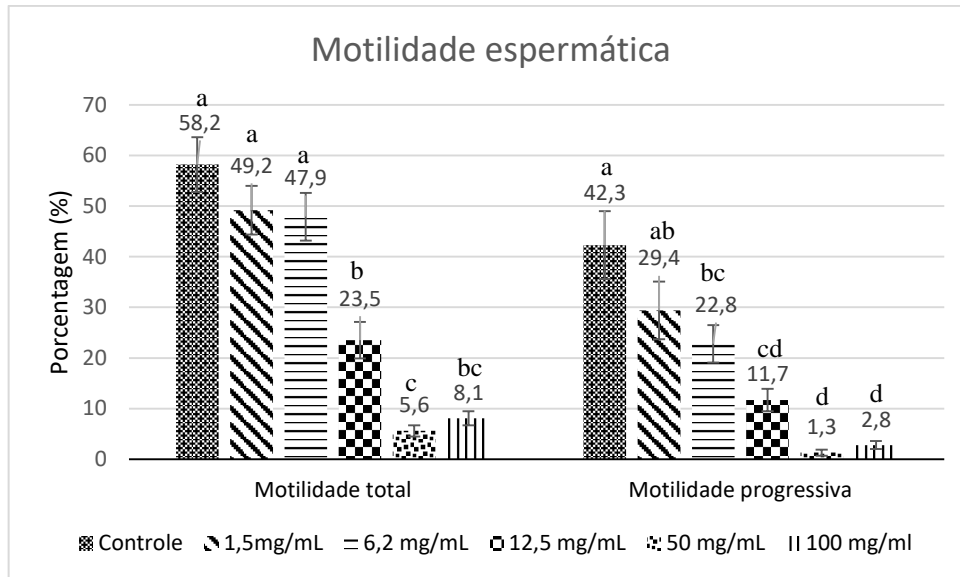


Figura 1. Parâmetros de motilidade total e progressiva de espermatozoides de suínos (%) (média±erro padrão) frente as diferentes concentrações do extrato hidrolacoólico de *Schinus terebinthifolius*. ^{abcd}Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre as concentrações na mesma avaliação de motilidade ($p < 0,05$).

Em relação às demais avaliações de motilidade, as concentrações de 12,5, 50 e 100 mg.mL⁻¹ afetaram a maioria dos parâmetros de motilidade quando comparado ao controle, ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise dos parâmetros de motilidade de espermatozoides de suínos (média±erro padrão) frente as diferentes concentrações do extrato hidrolacoólico de *Schinus terebinthifolius*.

Parâmetros	Concentração (mg.mL ⁻¹)					
	0 (BTS)	1,5	6,2	12,5	50	100
DAP (µm/s)	24,02±1,55 ^A	19,37±1,71 ^A	18,49±1,43 ^A	11,14±1,77 ^B	3,57±1,36 ^C	5,45±1,59 ^{BC}
DCL (µm/s)	51,60±3,46 ^A	39,51±3,64 ^{AB}	35,45±2,99 ^B	17,95±2,80 ^C	5,44±2,06 ^D	7,74±2,27 ^{CD}
DSL (µm/s)	14,86±1,20 ^A	13,75±1,36 ^A	13,06±0,94 ^{AB}	8,62±1,33 ^{BC}	2,60±0,97 ^D	4,07±1,15 ^{CD}
VAP (µm/s)	52,78±3,12 ^A	42,25±3,62 ^A	42,25±2,66 ^A	26,02±4,18 ^B	8,85±3,34 ^C	13,65±3,93 ^{BC}
VCL (µm/s)	112,41±7,27 ^A	85,14±7,57 ^B	79,73±5,62 ^B	41,29±6,32 ^C	13,54±5,11 ^D	19,29±5,55 ^{CD}
VSL (µm/s)	33,04±2,44 ^A	29,85±2,88 ^{AB}	30,07±1,67 ^{AB}	20,22±3,18 ^{BC}	6,45±2,42 ^D	10,44±2,93 ^{CD}
STR (%)	0,62±0,02 ^{AB}	0,65±0,05 ^{AB}	0,71±0,01 ^A	0,60±0,08 ^{AB}	0,26±0,10 ^C	0,38±0,1 ^{BC}
LIN (%)	0,29±0,02 ^A	0,32±0,02 ^A	0,38±0,01 ^A	0,38±0,05 ^A	0,17±0,06 ^A	0,27±0,07 ^A
WOB (µm/s)	0,47±0,02 ^{AB}	0,45±0,03 ^{AB}	0,53±0,02 ^A	0,49±0,07 ^{AB}	0,23±0,08 ^B	0,35±0,09 ^B
ALH (µm/s)	3,17±0,14 ^A	2,39±0,21 ^{AB}	2,91±0,22 ^A	1,68±0,31 ^{BC}	0,91±0,35 ^C	1,46±0,41 ^{BC}
BCF (Hz)	33,14±1,61 ^A	33,04±2,73 ^{AB}	35,17±1,67 ^A	20,96±3,40 ^{BC}	9,8±4,02 ^C	11,12±3,25 ^C

^{ABCD}Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre as concentrações em um mesmo parâmetro de motilidade ($p < 0,05$). MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, DAP: Distância média percorrida, DCL: Distância curvilínea, DSL: distância linear, VAP: Velocidade média da trajetória, VCL: Velocidade curvilínea, VSL: Velocidade linear progressiva, BCF: Frequência do batimento flagelar cruzado, ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, WOB: Oscilação, LIN: Linearidade, STR: Retilinearidade.

Dos parâmetros avaliados, o mais afetado foi o VCL, apresentando diminuição em todas as concentrações do extrato; e os menos afetados foram o STR e WOB. Já o LIN, não apresentou diferença em nenhuma das concentrações testadas quando comparado ao controle. A análise de espermatozoides assistida por computador (CASA) é um método objetivo de avaliação de motilidade e morfologia das células, podendo avaliar a qualidade do espermatozoide, e conseqüentemente, sua capacidade de fertilização (Verstegen et al., 2002). A redução da motilidade espermática pode ser provocada por alterações na mitocôndria, que conseqüentemente, reduzem a energia necessária para sua movimentação (ATP), porém, isso não aumenta o número de espermatozoides imóveis (Ortega-Ferrusola et al., 2009; Barros et al., 2013). Fato que poderia explicar o início da diminuição da motilidade progressiva, VCL e DCL na concentração 6,2 mg/mL, porém, esta observação não se repete nas maiores concentrações, chegando a 92,3% dos parâmetros alterados (50 e 100 mg.mL⁻¹) e com um número grande de espermatozoides imóveis, determinando assim, o potencial tóxico dessas concentrações.

Mazurova et al. (2015) testaram oito compostos quanto a atividade antibacteriana e toxicidade em espermatozoides de suíno, dentre eles, o ácido gálico e etil galato. Na avaliação da toxicidade, no tempo 0 utilizando o etil galato na concentração de 300µg.mL⁻¹ foi demonstrado uma motilidade de 30%, ficando inexistente quando testado a 600 e 1200 µg.mL⁻¹, já para o ácido gálico variou de 75% a 50% nas concentrações 300 a 2400 µg/mL. Os resultados observados por Mazurova et al. (2015), poderiam explicar os resultados observados neste estudo onde a motilidade estaria inversamente proporcional a concentração do extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius*, já que o etil galato foi o composto presente em maior concentração. Porém, em trabalho de Mohan et al., (2014) ao administrarem o etil galato em ratos, não observaram toxicidade, apesar de haver algumas alterações bioquímicas no soro. Desta forma, é possível sugerir que este composto altere apenas os processos energéticos das células espermáticas, já que não causou alterações consistentes em modelo *in vivo*.

Em relação à análise no citometro, podemos perceber que as diferenças nos resultados foram crescentes conforme a concentração do extrato, onde $12,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ apresentou alteração em 50% dos parâmetros avaliados (acrossoma, fluidez de membrana, potencial de membrana mitocondrial e ROS) quando comparados ao controle ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise das células espermáticas de suíno (média±erro padrão) através da citometria de fluxo após tratamento com extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*

Avaliação	Concentração (mg.mL^{-1})			
	0 (BTS)	1,5	6,2	12,5
ANR (%)	69,8±1,4 ^A	48,44±6,8 ^B	44±4,1 ^B	49,8±1,0 ^B
IM (%)	43,74±7,0 ^A	37,92±5,3 ^A	32,73±4,3 ^A	30,93±2,9 ^A
DFI	0,61±0,1 ^A	0,64±0,2 ^A	0,51±0,1 ^A	0,23±0,1 ^A
F (%)	48,95±10,9 ^B	68,96±4,0 ^{AB}	53,05±16,7 ^{AB}	96,47±15,6 ^A
ROS	1760,4±125,6 ^A	1409,2±218,3 ^{AB}	814,7±207,7 ^B	733,3±10 ^B
PMM (%)	59,58±14,0 ^A	42,62±13,7 ^{AB}	17,86±10,0 ^{AB}	13,30±7,7 ^B
LPO** (%)	37,71±3,7 ^A	41,51±2,0 ^A	36,49±6,1 ^{AB}	22,79±7,0 ^B

^{AB} Letras diferentes correspondem a diferença estatística ($p < 0,05$) entre as concentrações. ST: Extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*; ANR: Acrossoma Não Reagido; IM: Integridade de Membrana; DFI: Índice de fragmentação de DNA; F: Fluidez; ROS: Espécies Reativas de Oxigênio; PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial; LPO: Lipoperoxidação; ** $p = 0,07$.

A citometria de fluxo, é uma análise celular profunda, aferindo a fluorescência de células e partículas, permitindo assim avaliar várias estruturas e funções celulares, sendo bastante utilizada nas pesquisas de desenvolvimento e teste de fármacos, além da avaliação de qualidade seminal (Green et al., 2011; Houssain et al., 2011).

A alteração no acrossoma foi observada nas três concentrações do extrato ($p < 0,05$), sem diferir estatisticamente entre si. Isso pode ser explicado pela presença dos antioxidantes no extrato, que em casos da diminuição em demasia dos níveis de ROS acaba acarretando em processos fisiológicos, como por exemplo, a reação no acrossoma, capacitação, fusão espermatozoide-ovócito e fosforilação da proteína tirosina (O'Flaherty et al., 2003; Agarwal & Allamaneni, 2004). No entanto, também pode ser considerado como efeito tóxico, pois a reação prematura do acrossoma acaba por acarretar em uma redução da capacidade de fertilização do espermatozoide, pela menor capacidade de penetração na zona pelúcida (Oliveira et al., 2009). Outra explicação pode estar relacionada com a interação do

extrato/compostos fenólicos com os fosfolipídios (recobre a maioria dos lipídios presentes na membrana espermática) alterando-os e conseqüentemente desestabilizando a membrana plasmática pelo aumentando da sua fluidez, e na redução do LPO, ambos fatores predisponentes para a reação de capacitação (acrossoma reagido) (Kodama et al., 1996; Hartwig et al., 2012).

Já no parâmetro de integridade de membrana não houve diferença dos resultados do extrato com o controle, no entanto, em relação a fluidez de membrana, houve um aumento desta na concentração de 12,5 mg.mL⁻¹. A membrana está envolvida na capacitação, reação do acrossoma e fertilização, e a partir dela, existe o funcionamento correto das células, porém, não sendo fundamentais para processos pós-concepção (Silva e Gadella, 2006; Rota et al., 2010). O aumento da fluidez de membrana, do ponto de vista reprodutivo, é essencial para a capacitação do espermatozoide ou alteração da membrana plasmática (Nakagawa et al., 2004), porém em termos de toxicidade, esse aumento pode estar envolvido na apoptose, pois o contrário, remete uma ação protetora em modelos apoptóticos (Sergent et al. 2005). Um possível mecanismo dessa alteração pode ser uma desordem na força de Van der Waals entre as cadeias lipídicas, semelhante a ação do álcool (Balogh et al., 2005; Shigapova et al., 2005), já sendo sugerido que a fluidificação da membrana nos espermatozoides é responsável pela diminuição de sua motilidade (Sierra-Valdez et al., 2013). Além disso, a alteração na fluidez pode sugerir um dos mecanismos desse extrato vegetal para desempenhar a atividade antimicrobiana, sendo um resultado desejável neste aspecto. Helander et al. (1998) sugerem que o aumento da permeabilidade seja devido a alteração nos canais de cálcio, liberando substâncias de dentro da célula e queda no ATP intracelular, podendo explicar a diminuição da motilidade espermática.

O DNA, apesar de não ter função na concepção, é de extrema importância no desenvolvimento embrionário (Silva e Gadella, 2006), visto que, no presente estudo, não houve diferença nas concentrações testadas, assim, não vindo a acarretar em danos no futuro embrião ou apoptose celular (Di Santo et al., 2012). No entanto, danos ao DNA têm sido relatados em estudo utilizando ácido gálico e epigallocatequina de forma isolada (Hossain et

al., 2013), o que remete a necessidade da realização de avaliações dos compostos químicos isolados e em diferentes tempos de exposição, principalmente os majoritários neste extrato.

Lui et al. (2002) e Hassan et al. (2015) demonstraram que o extrato de *Panax ginseng*, tem efeito antioxidante e anti-apoptótico, devido suprimir a fragmentação de DNA pelo aumento da expressão de antioxidantes em ratos desafiados com doses subcrônicas de aflatoxina B1 e fumonisina B1, através da inibição da expressão de gene pró-apoptótico e atuar contra a progressão de danos no DNA provocados pelo estresse oxidativo. O extrato de *S. terebinthifolius*, devido a presença de substâncias antioxidantes pode ter mecanismos de ação semelhantes ao extrato de ginseng, porém são necessários estudos complementares para elucidar estes mecanismos de ação.

As concentrações 1,6 e 6,2 mg.mL⁻¹ do extrato não apresentaram diferença do controle no potencial de membrana mitocondrial. Estudo de Paoli et al. (2011) descobriram uma correlação positiva entre a motilidade espermática e seu potencial de membrana mitocondrial. Alterações desses parâmetros podem ser ocasionadas por falta de energia, alteração genética em codificadores de enzimas, alterações enzimáticas, defeitos estruturais ou na própria respiração mitocondrial (Paoli et al., 2011). O que está de acordo com o presente estudo, onde se observou que a motilidade diminui juntamente com o potencial de membrana mitocondrial, sendo inversamente proporcional à concentração do extrato, porém são necessários estudos adicionais para identificar os mecanismos que provocam essa diminuição. Além disso, o parâmetro de motilidade mais afetado foi o VCL, estando relacionado com os valores do potencial de membrana conforme estudo de Kasai et al. (2002) que relatam níveis maiores de motilidade e VCL em espermatozóides com um alto potencial de membrana mitocondrial. Sabe-se que o aumento de Ca²⁺, estresse oxidativo, degradação de fosfolípidos e produtos de degradação dos lípidos podem danificar a mitocôndria, e conseqüentemente, a energia celular e a motilidade do espermatozóide, sendo o potencial de membrana mitocondrial um indicador energético (Cossarizza et al., 1993; Kristián et al., 2004; Li et al., 2009; Cosson, 2010; Wiswedel et al., 2010). Alterações no potencial de membrana mitocondrial podem provocar a condensação da matriz e carrear o citocromo C ao espaço

intermembrana, ativando a apoptose (Gottlieb et al., 2003). Assim, a avaliação da mitocôndria é de extrema importância no caráter toxicológico, pois além do seu envolvimento na produção energética, também está relacionada com os mecanismos de morte celular, tanto pela via extrínseca como na intrínseca (Pereira et al., 2012). Porém, ao remeter esses resultados à atividade antimicrobiana, tal alteração pode sugerir que a presença de compostos fenólicos perturbe a membrana mitocondrial e alterem o funcionamento do efluxo das bombas transportadoras dos microrganismos patogênicos (Teodoro et al., 2015). Outro dado que chama a atenção é a maior concentração do composto etil galato no extrato (4031,90 mg.g⁻¹ de ES) quando comparado aos demais componentes, visto que já tem sido relatado, em combinação com antibióticos, como alternativa de tratamento para *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) (Soe et al., 2011).

Em relação aos efeitos benéficos da diminuição do ROS (espécies reativas de oxigênio), visto nas concentrações de 6,2 e 12,5 mg.mL⁻¹, pode-se citar a prevenção da peroxidação lipídica dos espermatozoides (alta concentração de ácidos graxos em sua membrana plasmática) (Ortega-ferrusola et al., 2011), e a apoptose espermática, que em grandes concentrações de ROS, induz a fragmentação do DNA (Di Santo et al., 2012). Os radicais livres, em determinadas concentrações, estão envolvidos em várias alterações como inflamações, distúrbios no sistema digestório, patologias autoimunes e infertilidade, sendo uma das principais causas de baixa motilidade e viabilidade espermática, fragmentação de DNA e desnaturação de proteínas (Ogbuewu et al., 2010; Aitken e Koppers, 2012).

Na avaliação do LPO, não houve lesão celular pela oxidação dos lipídios em nenhuma concentração do extrato, sendo isso de extrema importância, já que a peroxidação dos lipídios altera a estrutura e função da membrana nos espermatozoides, podendo danificar o DNA e proteínas. Nesse aspecto, se faz necessário um equilíbrio entre substâncias que estimulam e inibem a oxidação, para assim, manter as circunstâncias normais de funcionamento do espermatozoide (Ogbuewu et al., 2010).

Apesar de provocarem diminuição na motilidade espermática visualizada através do CASA, as concentrações < 12,5 mg.mL⁻¹ do extrato de *S. terebinthifolius* apresentaram baixa

toxicidade na célula espermática quando avaliada pela citometria de fluxo. As mudanças celulares visualizadas através da citometria de fluxo podem sugerir o (s) mecanismo (s) de atuação sobre os bactérias e fungos, sendo necessária a realização de testes complementares para elucidar os mecanismos de ação dos extratos e ou compostos químicos de forma isolada.

Conclusão

Através dos resultados do estudo, observou-se que o extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* possui como majoritário o composto fenólico etil galato, e em concentrações maiores leva a efeitos tóxicos como o um aumento da fluidez e redução no potencial de membrana mitocondrial. Porém, nessa mesma proporção, leva a uma diminuição de espécies reativas de oxigênio e níveis de lipoperoxidação em espermatozoides suínos, identificando um possível mecanismo de ação sobre células e também uma possibilidade de isolamento de substâncias ativas com efeito antioxidante.

Agradecimentos

ReproPel, Capes, CNPq, Fapergs e UFPel.

Referências

- Agarwal, A., Allamaneni, S., 2004. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online*. 9, 338–347.
- Aitken, R.J., Koppers, A.J., 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J. Andrology*. 13, 36–42.
- Anderson, D., Basaran, N., Dobrzyńska, M.M., Basaran, A.A., Yu, T., 1997. Modulating Effects of Flavonoids on Food Mutagens in Human Blood and Sperm Samples in the Comet Assay. *Teratogen. Carcin. Mut.* 17, 45–58.
- Andersson, M.A., Jaaskelainen, E.L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L.M., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulideproducing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2), 175–183.
- Andersson, M.C., Mikkola, R., Kotiaho, M., Hoornstra, D., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M., 2006. Boar spermatozoa as a tool in toxicological research, a novel application

for extended boar semen commercially produced by AI stations. *Reprod. Domest. Anim.* 41: 303-303.

Andersson, M.A., Mikkola, R., Rasimus, S., Hoornstra, D., Salin, P., Rahkila, R., Heikkinen, M., Mattila, S., Peltola, J., Kalso, S., Salkinoja-Salonen, M., 2010. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosol. *Toxicol. In Vitro.* 24, 2041–2052.

Balao da Silva, C.M., Ortega Ferrusola, C., Morillo Rodriguez, A., Gallardo Bolaños, J.M., Plaza Dávila, M., Morrell, J.M., Rodriguez Martínez, H., Tapia, J.A., Aparicio, I.M., Peña, F.J., 2013. Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 138: 241-251.

Balogh, G., Horvath, I., Nagy, E., Hoyk, Z., Benko, S., Bensaude, O., Vigh, L., 2005. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. *Febs J.* 272, 6077–6086.

Barros, L.O., Silva, S.V., Almeida, F.C., Silva, E.C.B., Carneiro, G.F., Guerra, M.M.P., 2013. Efeito da adição de glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelação do sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65, 430-438 .

Carvalho, M.G., Melo, A.G.N., Aragão, C.F.S., Raffin, F.N., Mourta, T.F.A.L., 2013. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Rev. Bras. Pl. Med.* 15, 158-169.

Çeribasi, A.O., Sakin, F., Türk, G., Sonmez, M., Atessahin, A., 2012. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 717–724.

Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M., Beytur, A., 2012. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats; *Andrologia.* 44, 181-186.

Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., Franceschi, C., 1993. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys Res. Commun.* 197,40-45.

Cosson, J. 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J. Fish. Biol.* 76, 240–279.

Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., Borini, A., 2012. Human sperm cryopreservation: update on techniques. Effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv. Urol.* 2012, 1–12.

Domínguez-Rebolledo, A.E., Martínez-Pastor, F., Bisbal, A.F., Ros-Santaella, J.L., García Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A.J., Garde, J.J., Fernández-Santos, M.R., 2011. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of

- hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 393–403.
- Evenson, D., Jost, L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol.* 42, 159-176, 1994.
- Fernandes, C.P., Félix, S.R., Nobre, M.O. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: Uma revisão. *Semina.* 37, 83-96, 2016.
- Fernandez-Gago, R., Domínguez, J.C., Martínez-Pastor, F., 2013. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. *Theriogenology.* 80, 400-410.
- Fujisawa, S., Kadoma Y., 1986. A Calorimetric Study on the Interaction of Phenol Derivatives with Phospholipid Liposomes as a Model for Biological Membranes. *Dent. Mater. J.* 5, 1-9.
- Fritzsche, M., Mandenius C., 2010. Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing. *Anal. Bioanal. Chem.* 398:181–191.
- Gliozzi, T.M., Zaniboni, L., Cerolini, S., 2011. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology* 75, 1613–1622.
- Gottlieb, E., Armour, S.M., Harris, M.H. Thompson, C.B., 2003. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10, 709–717.
- Green, C.L., Brown, L., Stewart, J.J., Xu, Y., Litwin, V., Mc Closkey, T.W., 2011. Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: I instrumentation. *J. Immunol. Methods.* 363, 104–119.
- Hartwig, F.P., Papa, F.O., Dell’Aqua Junior, J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: Uma revisão. *212. Vet. e Zootec.* 19, 157-168.
- Hassan, A.M., Abdel-Aziem, S.H., El-Nekeety, A.A., Abdel-Wahhab, M.A., 2015. *Panax ginseng* extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1. *Cytotechnology.* 67,861–871.
- Hornstra, D., Andersson, M.A., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen, M.S., 2003. A new method for *in vitro* detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicol. In Vitro.* 17, 745–751.
- Hossain, M.S., Johannissona, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A.P., Rodriguez-Martinez, H., 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. *Asian J. Andrology.* 13, 406-419.
- Hossain, M.Z., Gilbert, S.F., Patel, K., Ghosh, S., Bhunia, A.K., Kern, S.E., 2013. Biological clues to potent DNA-damaging activities in food and flavoring. *Food Chem. Toxicol.* 55, 557–567.

- Jääskeläinen, E.L., Teplova, V., Andersson, M.A., Andersson, L.C., Tammela, P., Andersson, M.C., Pirhonen, T.I., Saris, N.-E., Vuorela, P., Salkinoja-Salonen, M.S., 2003. *In vitro* assay for human toxicity of cereulide, the emetic toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicol. In Vitro*. 17, 737–744.
- Jamalan, M., Ghaffari, M.A., Hoseinzadeh, P., Hashemitabar, M., Zeinali, M., 2016. Human Sperm Quality and Metal Toxicants: Protective Effects of some Flavonoids on Male Reproductive Function. *Int. J. Fertil. Steri.* 10, 215-222.
- Jellad, S., Kamoun, S., Mehdi, M., Zakri, S., Trabelsi, M., Saad, A., Ajina, M., 2011. Sperm immobilizing effect of leaves extracts of *Cestrum parqui*. *J. Gynecol. Obst. Biol. Reprod.* 40, 211-215.
- Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., Fujie, M., Suzuki, K., Hirata, S., Hoshi, K., 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl.* 4, 97–103.
- Kristián, T., 2004. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium.* 36, 221–233.
- Lenzi, M., Orth, A.I., 2004. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis-SC, Brasil. *Rev. Bras. Fruticultura.* 26, 198-201.
- Li, P., Hulak, M., Linhart, O., 2009. Spermproteins in teleostean and chondrosteian (sturgeon) fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 567–581.
- Liu, Z., Li, Z., Liu, X., 2002. Effect of ginsenoside Re on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax gene after ischemia and reperfusion in rats. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 22, 305–309.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Two ed. Plantarum, Nova Odessa.
- Martinez-Alborcia, M.J., Morrell, J.M., Gil, M.A., Barranco, I., Maside, C., Alkimin, D.V., Parrilla, I., Martinez, E.A., Roca, J., 2012. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.* 140, 173-179.
- Martinez-Pastor, F., Martínez, F., García-Macías, V., Estesó, M.C., Anel, E., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., de Paz, P., Garde, J., Anel, L., 2006. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology.* 66, 1165–1172.
- Mazurova, J., Kukla, R., Rozkot, M., Lustykova, A., Slehova, E., Sleha, R., Lipensky, J., Opletal, L., 2015. Use of natural substances for boar semen decontamination. *Veterinari Medicina*, 60, 235–247.

- Meamar, M., Nassira, Z., Cambi, M., Tamburrino, L., Marchiani, S., Filimberti, E., Fino, M.G., Biggeri, A., Menezo, Y., Forti, G., Baldi, E., Muratori, M., 2012. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertil. Steril.* 98, p.326-333.
- Mohan, S., Thiagarajan, K., Chandrasekaran, R., Arul, J., 2014. *In vitro* protection of biological macromolecules against oxidative stress and *in vivo* toxicity evaluation of *Acacia nilotica* (L.) and ethyl gallate in rats. *BMC Complem. Altern. Med.* 14:1-13.
- Nakagawa, K., Yamano, S., Kamada, M., Maegawa, M., Tokumura, A., Irahara, M., Saito, H., 2004. Sperm-immobilizing antibodies suppress an increase in the plasma membrane fluidity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 83, 1054-1058.
- Nakayama, T., Hashimoto, T., Kajiya, K., Kumazawa, S., 2000. Affinity of polyphenols for lipid bilayers. *BioFactors.* 13, 147–151.
- Nascimento, A.F., Camara, C.A., Moraes, M.M., Ramos, C.S., 2012. Essential Oil Composition and Acaricidal Activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil against *Tetranychus urticae*. *Nat. Prod. Commun.* 7,129-132.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development - Guidelines for the testing of chemicals. Section 4. Health effects. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788. (accessed 18.11. 17).
- O'Flaherty, C., Beorlegui, N., Beconi, M.T., 2003. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int. J. Andrology.* 26,109-114.
- Ogbuwu, L.P., Aladi, N.O., Etuk, I.F., Opara, M.N., Uchegbu, I.C., Okoli, M.U., 2010. Iloje. Relevance of Oxygen Free Radicals and Antioxidants in Sperm production and Function. *Res. J. Vet. Sci.* 3, 138-164.
- Oliveira, H., Spanò, M., Santos, C., Pereira, M.L., 2009. Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice - Lead affects mice sperm motility and acrosome reaction. *Cell Biol. Toxicol.* 25,341–353.
- Ortega-Ferrusola, C., Garcia, B.M., Gallardo-Bolaños, J.M., Gonzalez-Fernandes, L., Rodríguez-Martinez, H., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 393-403.
- Ortega-Ferrusola, C., Johannisson, A., Peña, F.J., Tapia, J.A., Rodríguez-Martínez, H., Dalin, A.M., Morrell, J.M., 2011. Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer centrifugation, through Androcoll-E. *J. Equine Vet. Sci.* 31, 411-416.
- Oyagbemi, T. O. Omobowale, A. B. Saba, I. A. Adedara, E. R. Olowu, A. S. Akinrinde, R. O. Dada. Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. *Andrologia* 2016, 48, 393–401.

- Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Baldi, E., Francavilla, S., Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L., 2011. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility*. 95, 2315-2319.
- Pereira, L.C., de Souza, A.O., Pazin, M., Dorta, D.J., 2012. Mitocôndria como Alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 25, 1-14.
- Purdy, P.H., Ericsson, S.A., Dodson, R.E., Sternes, K.L., Garner, D.L., 2004. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. *Small Ruminant Res*. 55, 239–243.
- Rangkadilok, N., Tongchusak, S., Boonhok, R., Chaiyaroj, S.C., Junyaprasert, V.B., Buajeeb, W., Akanimane, J., Raksasuk, T., Suddhasthira, T., Satayavivad, J., 2012. *In vitro* antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *Fitoterapia*. 83, 545–553.
- Rodriguez-Martinez, H., Wallgren, M., 2010. Advances in boar semen cryopreservation. *Vet. Med. Int.* 2011, 1-5.
- Rota, A., Bastianacci, V., Magelli, C., Panzani, D., Camillo, F., 2010. Evaluation of Plasma Membrane Integrity of Donkey Spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 45, 228–232.
- Santos, M.R.A., Lima, R.A., Silva, A.G., Lima, D.K.S., Sallet, L.A.P., Teixeira, C.A.D., Facundo, V.A, 2013. Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) Ferrari. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas. 15, 757-762.
- Schiedeck, G., Bevilaqua, G.A.P., Bachtigal, G.F., Bauer, M.V.L, 2008. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. Embrapa Clima Temperado, Comunicado técnico. 190, 1-4.
- Sergent, O., Pereira, M., Belhomme, C., Chevanne, M., Huc, L, Lagadic-Gossmann, D., 2005. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 104–111.
- Severin, I., Dahbi, L., Lhuguenot, J.-C., Andersson, M.A., Hoornstra, D., Salkinoja-Salonen, M.S., Turco, L., Zucco, F., Stamatii, A.-L., Savolainen, M., Weber, A., Honkalampi-Hämäläinen, U., Von Wright, A., 2005. Safety assessment of foodcontact paper and board using a battery of short term toxicity tests: European Union Biosafepaper Project. *Food Addit. Contam.* 22, 1032–1041.
- Shigapova, N., Torok, Z., Balogh, G., Goloubinoff, P., Vigh, L., Horvath, I., 2005. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1216–1223.
- Sierra-Valdez, F.J., Forero-Quintero, L.S., Zapata-Morin, P.A., Costas M., Chavez-Reyes A., Ruiz-Suárez, J.C., 2013. The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers. *PLOS ONE*. 8,1-6.

- Silva, E.F., Varela-Junior, A.S., Cardoso, T.F., Stefanello, F.M., Kalb, A.C., Martínez, P.E., Corcini, C.D., 2016. Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. *Toxicol. In Vitro.* 35, 31–35.
- Silva, P.F.N., Gadella, B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 65, 958 -978.
- Singh, R.P., Shafeeque, C.M., Sharma, S.K., Pandey, N.K., Singh, R., Kolluri, J.M.G., Saxena, M., Sharma, B., Sastry, K.V.H., Kataria, J.M., Azeez, P.A., 2015. Bisphenol a reduces fertilizing ability and motility by compromising mitochondrial function of sperm. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1617–1622.
- Soe, W.M., Myint, N.L., Sing, L.C., Sakharkar, M.K., Thean, T.H., Sakharkar, K.R., 2011. Ethyl gallate as a combination drug can overcome resistance in MRSA. *Lett. Drug Des. Discov.* 8, 65-68 .
- Souad, K., Ali, S., Mounir, A., Mounir, T.M., 2007. Spermicidal activity of extract from *Cestrum parqui*. *Contraception.* 75, 152–156.
- Spinosa, H.S., Górniak, S.L., Palermo-Neto, P., 2008. *Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária*, first ed. Manole, São Paulo.
- Techer, D., Milla, S., Fontaine, P., Viot, S., Thomas, M., 2015. Influence of Waterborne Gallic and Pelargonic Acid Exposures on Biochemical and Reproductive Parameters in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 32, 227-240.
- Teodoro, G.R., Ellepola, K., Seneviratne, C.J., Koga-Ito, C.Y., 2015. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: A review. *Front. Microbiol.* 6:1-11.
- Uliana, M.P., Fronza, M., Silva, A.G.D., Vargas, T.S., Andrade, T.U.D., Scherer, R., 2016. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind. Crop. Prod.* 83, 235–240.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2005. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57, 149-179.
- Vicente-Carrillo, A., Edebert, I., Garside, H., Cotgreave, I., Rigler, R., Loitto, V., Magnusson, K.E., Rodríguez-Martínez, H., 2015. Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles. *Toxicol. In Vitro.* 29, 582-591.
- Zribi, N., Chakroun, N.F., Abdallah, F.B., Elleuch, H., Sellami, A., Gargouri, J., Rebai, T., Fakhfakh, F., Keskes, L.A., 2012. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Cryobiology.* 65, 326-331.
- Wiswedel, I., Gardemann, A., Storch, A., Schild, L., 2010. Degradation of phospholipids by oxidative stress - Exceptional significance of cardiolipin. *Free Radical Res.* 44,135-145.

3.3 Artigo 3

Suscetibilidade de isolados bacterianos multirresistentes a extratos vegetais, composição química e toxicidade

Claudia Giordani; Karina Affedt Guterres, Cristine Cioato da Silva, Raulene Rodrigues Lobo, Bianca Carmargo Aranha, Fábio Clasen Chaves, Sílvia Regina Leal Ladeira, Gilberto D'Ávila Vargas, Marlete Bum Cleff

Será submetido à revista BMC Complementary and Alternative Medicine

Suscetibilidade de isolados bacterianos multirresistentes a extratos vegetais, composição química e toxicidade

Claudia Giordani^{1*}; Karina Affedlt Guterres¹, Cristine Cioato da Silva¹, Raulene Rodrigues Lobo², Bianca Carmargo Aranha³, Fábio Clasen Chaves³, Sílvia Regina Leal Ladeira⁴, Gilberto D'Ávila Vargas⁵, Marlete Bum Cleff¹

*Correspondência: claarte@hotmail.com

¹Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

Lista completa das informações dos autores no final do artigo

Resumo

Introdução

A resistência bacteriana é um problema crescente, onde a mutação ou aquisição de DNA exógeno é favorecida pela automedicação, dosagens errôneas e excesso de uso. Mediante isso, tem sido intensificada a pesquisa por novos bioativos oriundos de espécies vegetais, porém, a avaliação tóxica destes recursos se faz necessária. O objetivo do estudo foi avaliar a suscetibilidade de bactérias multirresistentes de animais frente aos extratos vegetais de *Eugenia uniflora*, *Schinus terebinthifolius*, *Polygonum hydropiperoides*, *Equisetum hyemale*, *Baccharis trimera* e *Solidago chilensis*, identificando sua composição química e toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Métodos

A identificação química dos extratos foi realizada através da cromatografia líquida de ultra eficiência e cromatografia gasosa, ambos com espectro de massas. Foram utilizadas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (n=71), sendo realizado antibiograma prévio (fármacos sintéticos). Para os testes de avaliação antimicrobiana *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU), *Polygonum hydropiperoides* (PH), *Baccharis trimera* (BT), *Equisetum hyemale* (EH) e *Solidago chilensis*

(SC), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, M07-A9). A avaliação de toxicidade *in vitro* (atividade hemolítica e hemaglutinante sobre eritrócitos caninos) e *in vivo* (toxicidade embrionária – *Coturnix coturnix japonica* – viabilidade embrionária e histopatologia de órgãos) foram realizadas nos extratos maior nº de inibições/eliminações bacterianas.

Resultados

Foram observados altos índices de resistência aos antibióticos tanto nas bactérias Gram-positivas como nas Gram-negativas, onde alguns isolados não apresentaram suscetibilidade a grande parte dos antibióticos testados. *Streptococcus intermedius* (n=2), *Enterococcus faecium* (n=1) e *Klebsiella pneumoniae* (n=1) foram resistentes a todos antibióticos. Os compostos majoritários identificados nos extratos por CLAE foram: Etil galato, miricitrina, ácido gálico – ST; ácido quínico, etil galato e ácido elágio – EU; quercetina e ácido quínico - PH, e por CG foram: Ácido butanodióico – ST; Ácido butanoico – PH; Ácido benzoico - EU. O extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* (0,06 a 7,5 mg.mL⁻¹) se destacou por apresentar atividade inibitória sobre 100% das bactérias Gram-negativas e positivas na maior concentração testada, seguido de *E. uniflora* sobre a 71,83%. No teste de atividade hemaglutinante, o extrato de *S. terebinthifolius* foi o que apresentou mais concentrações reagentes, e *P. hydropiperoides* apresentou efeito apenas na concentração de 15 mg.mL⁻¹, sendo semelhante os resultados de reação para o efeito hemolítico. Já os embriões desenvolveram-se normalmente e não apresentaram alterações macroscópicas e histopatológicas dos órgãos e/ou estruturas.

Conclusão

Os extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius*, *E. uniflora* e *P. hydropiperoides*, com composição majoritária de compostos fenólicos, apresentaram atividade antibacteriana em isolados multirresistentes sem demonstrar toxicidade embrionária, não apresentando atividade hemolítica e hemaglutinante nas concentrações ≤0,8 mg.mL⁻¹.

Palavras-chave: Fitoquímica, Antibacteriana, Hemólise, Hemaglutinante, Hidroalcoólico, Embrião

Abstract

Background

Bacterial resistance is a growing problem, where mutation or acquisition of exogenous DNA is favored by self-medication, erroneous dosages and overuse. Therefore, the research has been intensified by new bioactive from plant species, however, the toxic evaluation of these resources is necessary. The objective of the study was to evaluate the susceptibility of multiresistant bacteria from animals to *Eugenia uniflora*, *Schinus terebinthifolius*, *Polygonum hydropiperoides*, *Equisetum hyemale*, *Baccharis trimera* and *Solidago chilensis* isolates, identifying their chemical composition and toxicity in vitro and in vivo.

Methods

The chemical identification of the extracts was carried out through liquid chromatography of ultra efficiency and gas chromatography, both with mass spectrum. Gram-negative and Gram-positive bacteria (n = 71) were used, and previous antibiogram (synthetic drugs) was performed. For the *in vitro* antimicrobial evaluation tests of the hydroalcoholic extracts of *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU), *Polygonum hydropiperoides* (PH), *Baccharis trimera* (BT), *Equisetum hyemale* (EH) and *Solidago chilensis* the broth microdilution technique (CLSI, M07-A9). The evaluation of *in vitro* toxicity (hemolytic and hemagglutinating activity on canine erythrocytes) and *in vivo* (embryonic toxicity - *Coturnix coturnix japonica* - embryonic viability and organ histopathology) were performed in the highest number of bacterial inhibition / eliminations.

Results

High levels of antibiotic resistance were observed in both Gram-positive and Gram-negative bacteria, where some isolates did not show susceptibility to most of the antibiotics tested. *Streptococcus intermedius* (n = 2), *Enterococcus faecium* (n = 1) and *Klebsiella pneumoniae* (n = 1) were resistant to all antibiotics. The major compounds identified in the extracts by HPLC were: Ethyl gallate, myricitrin, gallic acid – ST; ethyl gallate and ellagic acid – EU; quercetin and quinic acid - PH, and by GC were: Butanedioic acid – ST; Butanoic acid – PH; benzoic

acid - EU. The hydroalcoholic extract of *S. terebinthifolius* (0.06 to 7.5 mg.mL⁻¹) was distinguished by its inhibitory activity on 100% Gram-negative and positive bacteria at the highest concentration tested, followed by *E. uniflora* on 71,83%. In the hemagglutination test, the extract of *S. terebinthifolius* was the one with the most reactive concentrations, and *P. hydropiperoides* showed only effect at the concentration of 15 mg.mL⁻¹, and the reaction results were similar for the hemolytic effect. Already the embryos developed normally and did not present macroscopic and histopathological alterations of the organs and / or structures.

Conclusion

The hydroalcoholic extracts of *S. terebinthifolius*, *E. uniflora* and *P. hydropiperoides*, with majority composition of phenolic compounds, showed antibacterial activity in multiresistant isolates without showing embryonic toxicity, showing no haemolytic and haemagglutinating activity at concentrations ≤ 0.8 mg.mL⁻¹.

Keywords: Phytochemistry, Antibacterial, Hemolysis, Hemagglutinating, Hydroalcoholic, Embryo

Introdução

Bactérias isoladas de feridas cutâneas de animais já vêm apresentando resistência, a um grande número de fármacos, com destaque para as Gram negativas [1]. Além disso, as taxas de resistência aos antibióticos estão em um nível crescente, juntamente com o uso de antimicrobianos de amplo espectro, que são utilizados de forma discriminada, sem avaliação prévia de sua real necessidade [2,3].

A problemática que envolve a resistência bacteriana é resultante da alteração genética por mutação ou aquisição de DNA exógeno, onde dosagens errôneas, excesso de utilizações e a automedicação com antimicrobianos favorecem sua ocorrência [4,5]. Para evitar a automedicação na medicina humana, foi implementada no Brasil a Resolução-RDC nº20/2011 que obriga a apresentação de receita médica para proceder com a venda de antimicrobianos [6]. Porém o mesmo não ocorre para as medicações veterinárias, onde ainda hoje os

antimicrobianos são vendidos sem receita, propiciando o uso indevido e em excesso, ocasionando uma maior velocidade de disseminação dos genes de resistência, sendo esta inversamente proporcional à capacidade de produção de novos fármacos efetivos [7].

As bactérias resistentes podem ser transmitidas através da cadeia alimentar aos humanos ou transferir genes de resistência para outras bactérias, o que representa um problema de saúde pública. O envolvimento de animais na manutenção e transmissão de isolados resistentes para humanos tem sido relatada com destaque para a origem alimentar, mas também através do contato direto com animais de produção e de estimação, além da transmissão ambiental, através das fezes de animais em contato com terra, água e sob partículas no ar [8].

Mediante isso, tem sido intensificada a pesquisa de novos princípios ativos para combater os microrganismos resistentes, onde espécies vegetais têm representado ser uma excelente opção [9-12]. No entanto, fazem-se necessários estudos de toxicidade para viabilizar a aplicação segura dos recursos vegetais. Dentre os fatores que podem determinar o efeito tóxico estão a potência dos metabólitos, quantidade ingerida, tempo de exposição e a parte da planta, fatores individuais do organismo, ambiente (solo e clima) e diferenças genéticas [13]. Sabe-se, que plantas utilizadas na medicina tradicional apresentam efeitos tóxicos diversos, como por exemplo, genotoxocidade, espermatoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, atividade hemolítica, podendo atingir também o pulmão, coração, baço e o trato gastrointestinal [14,15].

Diante desta realidade, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos de *Baccharis trimea*, *Equisetum hyemale*, *Eugenia uniflora*, *Polygonum hydropiperoides*, *Schinus terebinthifolius* e *Solidago chilensis* em isolados bacterianos multirresistentes, além de determinar a composição química e toxicidade dos extratos vegetais.

Material e métodos

Seis espécies vegetais com ampla distribuição na região de Pelotas-RS (31° 33' 02.0" S, 52° 16' 45.5" W) foram coletadas entre os meses de março e abril, estando amostras depositadas no Herbário PEL do Departamento de botânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As plantas foram registradas sob o número PEL 25934, *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira mansa), Anacardiaceae; número PEL 25934, *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira), Myrtaceae; número PEL 25931 *Polygonum hydropiperoides* Michx (Erva-de-bicho), Polygonaceae; número 25929 *Bacharris trimera* (Less.) (Carqueja), Asteraceae; número PEL 25932, *Solidago chilensis* Meyen (Lanceta); número PEL 25928 *Equisetum hyemale* L. (Rabo-de-lagarto), Equisetaceae.

As folhas das plantas foram coletadas, pesadas, separadas por espécie e secas a 35°-40°C em estufa com circulação de ar, obtendo-se o rendimento de matéria seca para cada espécie através da fórmula $MS(\%) = \text{Peso após secagem} / \text{Peso antes da secagem} \times 100$.

O extrato hidroalcoólico foi preparado a partir de folhas secas, moídas e misturadas ao álcool de cereais (200 g em 500 mL), e acondicionadas em um recipiente fechado, protegido da luz, em local seco e em temperatura ambiente. O material vegetal permaneceu em contato com o álcool por sete dias, sendo que durante este período foi agitado diariamente. Após esse procedimento, a tintura foi filtrada com gaze estéril e armazenada em um vidro âmbar estéril com tampa vedadora [16]. A partir da solução filtrada, utilizou-se um rotaevaporador (Heidolph/Laborota 4000) com banho de aquecimento a 50°C, para retirada do solvente, restituindo o volume inicial com água destilada estéril, que foi liofilizado (Liotop/L101) e mantido congelado (-70°C) até o momento dos testes *in vitro*. Para utilização nos ensaios biológicos, os extratos liofilizados foram restituídos em água destilada estéril conforme as concentrações utilizadas em cada teste.

Os extratos com melhores resultados de CIM e CBM foram analisados pela cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLAE) e gasosa (CG). Para análise em CLAE foram pesados 20 mg dos extratos e diluídos em 5 mL de metanol. Os extratos foram injetados na concentração de 300 µg.mL⁻¹.

Dez microlitros dos extratos foram injetados em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de vóo) (Impact HD). Os compostos fenólicos foram separados utilizando pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 x 150 mm, 100 Å, 3 µm) Phenomenex (Torrance, CA, USA), sendo solução de ácido fórmico em água (0,1% v/v, eluente A) e metanol (eluente B) usadas como fase móvel, com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna a 40°C. The elution gradient was: 0–2 min, 10% B; 2–15 min, 10–75% B; 15–30 min, 75% B; 30–32 min 75–10% B; 32–40 min, 10% B. O detector PDA foi calibrado para fazer a varredura na faixa de 210–800. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI negativo, com voltagem do capilar em 4000 V, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, gás de secagem em 8 L.min⁻¹ e temperatura da fonte de 180°C; usando os parâmetros padrão do equipamento. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM, cobrindo toda a faixa de aquisição (m/z 50 até 1200). Os compostos fenólicos foram caracterizados pelos seus espectros UV / Vis (220-800 nm), tempos de retenção em relação aos padrões externos, espectros de massa e padrões de fragmentação MSⁿ em comparação com os dados contidos na biblioteca de espectro de massa NIST 2011 e literatura de referência.

Para cromatografia gasosa com espectrofotômetro de massas (CG-MS) dissolveu-se o extrato liofilizado na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em metanol. A amostra foi preparada em balão de 5 mL ao qual adicionou-se 100 µL de adonitol como padrão interno na concentração de 0,2 mg.mL⁻¹ em metanol. Uma alíquota de 150 µL de amostra foi evaporada e derivatizada com 40 µL de cloridrato de metoxiamina (20 mg.mL⁻¹ em piridina) por 2 horas a 37°C em termomisturador e posteriormente adicionou-se 70 µL de MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) ao qual agitou-se durante 30 minutos nas mesmas condições. Ao final da reação transferiu-se para frascos com *inserts* de 250 µL e injetou-se imediatamente no CG-MS (Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra com autoinjeter AOC-20i), o qual continha biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Parâmetros de injeção para cromatografia e espectrometria de massas foram segundo Lisec et al. [17]. Injetou-se 1 µL de amostra com temperatura do injetor a 230°C, com razão de split para injeção de 1:40. Utilizou-se hélio como gás carreador

com fluxo de 2 mL.min⁻¹ e velocidade linear como modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com programação isotérmica por 2 minutos à 80°C, rampa de temperatura de 12°C/min até 200°C, passando para 10°C/min até 320°C permanecendo por 8 minutos. Para os parâmetros de espectrometria de massas, as temperaturas da fonte de íons e interface foram de 250°C, faixa de massa de 70-600 m/z e 0,2 varreduras/seg. O tempo de corte do solvente foi definido para 3,80 minutos. A determinação do índice de tempo de retenção ocorreu por padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME C8-24) e alcanos, calculado pelo software do equipamento.

Na avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas bactérias, isolados de casos clínicos de animais atendidos no Hospital Veterinário, Ambulatório Veterinário e Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre da UFPel. Os isolados foram identificados no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) - Laboratório de Bacteriologia da UFPel, sendo armazenados em botijões de nitrogênio líquido (-7°C).

Utilizou-se 58 bactérias isoladas de casos clínicos de animais (caninos, felinos, equinos, cunícula, bovinos e primatas) provenientes de lesões cutâneas e 13 cepas padrões provenientes da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), totalizando 34 bactérias Gram-negativas e 37 Gram-positivas. Para todos isolados, foram realizados antibiogramas com os antibióticos utilizados na rotina da clínica veterinária (Ampicilina 10 mcg, amoxicilina 30 mcg, cefalexina 30 mcg, ceftriaxona 30 mcg, enrofloxacina 5 mcg, neomicina 30 mcg, oxacilina 1 mcg e penicilina G 10 un) em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton com inóculo bacteriano (escala 0,5 de McFarland), sendo os resultados expressos em resistente ou sensível de acordo com a técnica de Bauer et al. [18].

O teste de microdiluição em caldo foi utilizado para avaliar a atividade antibacteriana de extratos vegetais foi o de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M07-A9 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [19] com modificações para fitoterápicos. Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens com crescimento de 18-24 horas a 35°C em ágar sangue e MacConkey. Posteriormente, sendo transferidas para 4mL de solução salina estéril permanecendo em repouso e ajustada na escala 0,5 de McFarland e após

procedendo com a diluição 1:10 em caldo infusão de cérebro e coração (BHI). O inóculo foi dispensado em alíquotas de 100 µL nos poços, contendo previamente 100 µL das concentrações dos extratos (0,01 a 7,5 mg.mL⁻¹).

As microplacas foram incubadas por período de 24 horas a 35°C, e após, realizada a leitura visual do crescimento do controle positivo, sendo assim determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram semeados 10 µL de cada poço em placas de Petri contendo ágar BHI e ágar sangue, temperatura de 35° C, por um período de 16 a 20 horas.

Para avaliação de toxicidade tanto *in vitro* como *in vivo*, foram selecionados os extratos mais eficazes contra as bactérias (maior n° de inibições/eliminações). As atividades hemolítica e hemaglutinante foram avaliadas em eritrócitos caninos, sendo a metodologia empregada baseada em Mebs et al. [20] e Pando et al. [21] com modificações. Os eritrócitos foram centrifugados e lavados com PBS (1000 rpm por 10 minutos), sendo o precipitado ressuspenso em solução fisiológica obtendo a concentração de 2%. Para o teste de atividade hemolítica inseriu-se 50 µL da concentração do extrato (15 a 0,03 mg.mL⁻¹, em diluição seriada utilizando PBS) e 50 µL da suspensão de eritrócitos, sendo incubados a 4°C durante 2 horas, sendo os resultados expressos em presença/ausência, sendo o controle positivo (água destilada) e negativo (PBS), sendo os resultados expressos em - = sem hemólise, + = hemólise leve, ++ = hemólise moderada e +++ = hemólise intensa. Para o teste de atividade hemaglutinante inseriu-se 50µL de solução fisiológica, 50µL da concentração do extrato (15 a 0,03 mg.mL⁻¹, em diluição seriada utilizando solução fisiológica) e 50µL da suspensão de eritrócitos incubados a 4°C por 16 horas, tendo como controle negativo a solução fisiológica, sendo os resultados foram expressos em - = sem hemaglutinação e + = hemaglutinação. A leitura de ambos os testes foi realizada a olho nu e através de microscopia óptica, fazendo uma comparação com os controles.

Nos testes de toxicidade *in vivo* (Comitê de ética: CEEA/UFPel 7044/2015) foram avaliados os efeitos das maiores concentrações dos extratos vegetais em ovos de codorna (*Coturnix coturnix japonica*). Os ovos foram incubados pelo período de 7 dias a 37°C em

incubadora com umidade controlada (55%), sendo avaliada a viabilidade embrionária diariamente através do método de ovoscopia e delimitada a câmara de ar para demarcação do local de administração dos extratos [22]. Foram inoculados 40µL de cada concentração do extrato na cavidade alantoide contralateralmente ao embrião, sendo os orifícios vedados, e incubados por sete dias nos mesmos padrões anteriormente citados (T° e umidade) [23-25]. Foram utilizados cinco ovos de codorna para cada concentração testada (7,5, 3,75, 1,88 e 0,94 mg.mL⁻¹) nos grupos extratos hidroalcoólicos: *Schinus terebinthifolius* (grupo ST, n=20), *Polygonum hydropiperoides* (grupo PH, n=20) e *Eugenia uniflora* (grupo EU, n=20), incluindo os controles com água destilada estéril (grupo H₂O, n=20). Após a inoculação era realizada a ovoscopia diária até o fim do experimento, para verificar a mortalidade embrionária. Nos ovos não viáveis (morte embrionária) ou ao final de sete dias era realizada a eutanásia [26], fazia-se a abertura destes observando macroscopicamente todas as estruturas (embrião, saco vitelínico, albumina, líquidos amniótico e alantoide, e casca). Após, os embriões eram coletados de forma asséptica, fixando-os em formol 10% e encaminhados histopatologia onde foram avaliados o fígado, intestino, Bursa de Fabricius, pulmão, rim e sistema nervoso central.

Resultados e Discussão

O rendimento de matéria seca das plantas variaram entre as espécies, onde a com maior rendimento foi a *S. terebinthifolius* (43,49%), seguida de *Eugenia uniflora* (41,78%), *Solidago chilensis* (35,20%), *Baccharis trimera* (34,77%), *Polygonum hydropiperoides* (30,15%) e a menor foi a *Equisetum hyemale* (22,18%). O conhecimento do rendimento de matéria seca é de grande importância, para determinar a quantidade necessária de cada planta para a produção dos extratos vegetais.

Os resultados da avaliação da suscetibilidade dos isolados clínicos aos antibióticos utilizados na rotina veterinária demonstram a presença de bactérias resistentes a pelo menos um fármaco. Ao comparar os isolados clínicos com as cepas padrões ou quanto ao gênero, o único caso, em que tivemos exceção foi de *Klebsiella pneumoniae*, onde a cepa padrão era resistente a todos antibióticos, enquanto que o isolado clínico apresentou 50% de resistência.

Dentre os isolados clínicos de bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* e *Proteus vulgaris* demonstraram resistência aos Beta-lactâmicos testados, em pelo menos um caso, sendo sensíveis em 100% dos casos apenas à enrofloxacina. Já *Proteus mirabilis* apresentou resistência a maioria dos antibióticos e suscetibilidade de 100% apenas à ceftriaxona. Parte dos isolados clínicos de *Escherichia coli* (n=5) foram resistentes a maioria dos antibióticos testados, apresentando um percentual de resistência de 62,5 a 87,5%. Nas bactérias Gram-positivas isoladas de casos clínicos, houve duas espécies bacterianas que apresentaram resistência a todos antibióticos, sendo o *Streptococcus intermedius* (n=2) e *Enterococcus faecium* (n=1). No caso do *Enterococcus faecalis*, os isolados apresentaram 100% de suscetibilidade apenas para amoxicilina e ampicilina, e o *Staphylococcus aureus* para a enrofloxacina (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de resistência das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas de lesões cutâneas de animais e cepas padrões através do teste de antibiograma com fármacos utilizados na rotina veterinária

Espécie bacteriana	AMP	AMO	CEF	CEX	ENR	NEO	OXA	PEN
Gram-Negativas								
<i>P.a</i> (n=9)	R	R	R	R(3) S(6)	S	R(3) S(6)	R	R
<i>P.a</i> *	R	R	R	S	S	S	R	R
<i>P.p</i>	R	R	R	R	S	R	R	R
<i>E.c</i> (n=6)	R(5) S(1)	R	R(4) S(2)	R(3) S(3)	R(2) S(4)	R(1) S(5)	R	R
<i>E.c</i> *	S	R	S	S	S	S	R	R
<i>A.h</i>	R	R	S	S	S	S	R	R
<i>A.h</i> *	R	R	R	R	S	S	R	R
<i>E.clo</i> (n=2)	R	R	R	S	S	R(1) S(1)	S	R
<i>E.clo</i> *	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>E.a</i>	R	R	R	S	S	S	R	R
<i>E.a</i> *	R	R	R	S	S	S	R	R
<i>K.p</i>	R	R	S	S	S	S	R	R
<i>K.p</i> *	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>P.v</i> (n=3)	R	R	R	R(1) S(1)	S	R(1) S(1)	R	R
<i>P.v</i> *	R	S	S	S	S	S	R	S
<i>P.m</i> (n=2)	R	R	R	S	R	R(1) S(1)	R	R
<i>P.m</i> *	S	S	S	S	S	S	R	S
Gram-Positivas								
<i>A.o</i>	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>S.sp</i>	S	S	S	S	R	R	S	S
<i>S.ag</i> *	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>S.d</i>	R	S	S	R	S	R	S	S
<i>S.p</i> (n=3)	S	S	S	S	R(1) S(2)	R(2) S(1)	S	S
<i>S.a</i> (n=5)		R(3)					R(1)	R(3)
	R(3) S(2)	S(2)	R(1) S(4)	R(1) S(4)	S	R(1) S(4)	S(4)	S(2)
<i>S.a</i> *	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S.h</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S.x</i> (n=5)		R(1)					R(1)	
	S	S(4)	R(1) S(4)	R(1) S(4)	S	S	S(4)	R
<i>S.x</i> *	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S.ho</i>	R	R	S	S	S	S	R	R
<i>S.ho</i> *	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>S.i</i> (n=9)		R(4)					R(3)	R(3)
	R(3) S(6)	S(5)	R(2) S(7)	R(3) S(6)	R(3) S(6)	R(4) S(5)	S(6)	S(6)
<i>E.fl</i> (n=2)	S	S	R	R	R(1) S(1)	R	R	R
<i>E.fl</i> *	S	S	R	R	S	R	R	S
<i>E.fa</i> (n=2)		R(1)						
	R(1) S(1)	S(1)	R	R(1) S(1)	R	R	R	R
<i>E.fa</i> *	R	R	R	R	S	R	R	R

*Cepas padrão; R: Resistente; S: Suscetível; AMP: Ampicilina; AMO: Amoxicilina; CEF: Cefalexina; CEX: Ceftriaxona; ENR: Enrofloxacina; NEO: Neomicina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; *P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*; *P.p*: *Pseudomonas putida*; *E.c*: *Escherichia coli*; *A.h*: *Aeromonas hydrophila*; *E.clo*: *Enterobacter cloacae*; *E.a*: *Enterobacter aerogenes*; *P.m*: *Proteus mirabilis*; *K.p*: *Klebsiella pneumoniae*; *P.v*: *Proteus vulgaris*; *A.o*: *Alloiococcus otitis*; *S.ag*: *Streptococcus agalactiae*; *S.sp*: *Streptococcus spp.*; *S.d*: *Streptococcus dysgalactiae*; *S.p*: *Streptococcus pluranimalium*; *S.a*: *Staphylococcus aureus*; *S.h*: *Staphylococcus hyicus*; *S.x*: *Staphylococcus xylosus*; *S.ho*: *Staphylococcus hominis*; *S.i*: *Staphylococcus intermedius*; *E.fl*: *Enterococcus faecalis*; *E.fa*: *Enterococcus faecium*.

A enrofloxacina foi o antibiótico com maior eficácia sobre as bactérias Gram-negativas (85,3%) e Gram-positivas (70,3%). Enquanto que o antibacteriano menos eficiente foi a oxacilina para as bactérias Gram-negativas (2,9%) e a penicilina para as Gram-positivas (48%).

Conforme *World Health Organization* (WHO) [27], as bactérias *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* demonstraram uma resistência acima de 50% em proporção aos fármacos comumente utilizados em muitos cenários ao redor do mundo, dados esses fornecidos através de publicações, dados nacionais e de hospitais. Além disso, no Brasil os problemas com a resistência bacteriana também estão presentes, principalmente nos estados do sul e sudeste [4, 28, 29]. Nesse âmbito, existe a necessidade de desenvolvimento de novos antibacterianos, onde o foco se destaca para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp., pois estão envolvidas em grande parte das infecções [30].

Em relação a avaliação da ação dos extratos vegetais, observou-se que o extrato de *S. terebinthifolius* e de *E. uniflora* destacaram-se pela atividade frente aos isolados bacterianos Gram-negativos. *S. terebinthifolius* apresentou atividade inibitória sobre todos isolados, em concentrações que variaram de 1,88 a 7,5 mg.mL⁻¹ (média 6,79 mg.mL⁻¹), porém com menor atividade bactericida, nas mesmas concentrações (média 6,02 mg.mL⁻¹). *E. uniflora* apresentou resultados inibitórios em 26 bactérias com CIM de 0,03 a 7,5 mg.mL⁻¹ (média 3,80 mg.mL⁻¹), e atividade bactericida apenas sobre dois isolados (7,5 mg.mL⁻¹). *P. hydropiperoides* apresentou atividade inibitória apenas em 10 isolados com CIM 3,75 a 7,5 mg.mL⁻¹ (média 5,62 mg.mL⁻¹) enquanto as outras três plantas (*S. chilensis*, *B. trimera* e *W. hyemale*) apresentaram atividade apenas sobre ≤ 5 isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações inibitórias (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) através do teste de microdiluição em caldo utilizando os extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius*, *S. chilensis*, *P. hydro Piperoides*, *E. uniflora* e *B. trimera* frente às bactérias Gram-negativas

Espécie bacteriana	ST		SC		PH		EH		EU		BT	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>P.a</i> (n=9)	7,5 (8) 1,88(1)	7,5(2)	7,5(2)	-	3,75(1) 7,5(1)	-	-	-	7,5(2) 3,75(4) 0,94(2)	-	-	-
<i>P.a</i> *	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.p</i>	7,5	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-	-	-
<i>E.c</i> (n=6)	7,5(6)	7,5(3)	7,5(1) 3,75(1) 0,12(1)	-	7,5(3) 3,75(1)	-	7,5(1) 0,06(2)	-	7,5(1) 1,88(2) 0,94(1) 0,03(2)	-	3,75(1) 0,94(1) 0,47(2)	-
<i>E.c</i> *	7,5	-	-	-	3,75	-	-	-	-	-	-	-
<i>A.h</i>	3,75	3,75	-	-	3,75	-	7,5	-	7,5	7,5	-	-
<i>A.h</i> *	7,5	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-	-	-
<i>E.clo</i> (n=2)	7,5	7,5(1)	-	-	-	-	-	-	1,88(1) 3,75(1)	-	7,5(1)	-
<i>E.clo</i> *	7,5	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.a</i>	7,5	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-	-	-
<i>E.a</i> *	7,5	-	-	-	3,75	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.m</i> (n=2)	7,5(2)	-	-	-	-	-	-	-	7,5(2)	-	-	-
<i>P.m</i> *	3,75	3,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K.p</i> *	1,88	1,88	-	-	-	-	-	-	1,88	-	-	-
<i>K.p</i>	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7,5(1)	7,5(1)	-	-	-	-	-	-	0,94(2)	-	-	-
<i>P.v</i> (n=3)	3,75(2)	3,75(2)	-	-	7,5	-	-	-	0,47(1)	7,5(1)	-	-
<i>P.v</i>	7,5	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Cepas padrão; -Sem atividade nas concentrações testadas; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; ST:*Schinus terebinthifolius*; EH:*Equisetum hyemale*; PH:*Polygonum hydro Piperoides*; SC:*Solidago chilensis*; BT:*Baccharis trimera*; EU:*Eugenia uniflora*; *P.a*:*Pseudomonas aeruginosa*; *P.p*:*Pseudomonas putida*; *E.c*:*Escherichia coli*; *A.h*:*Aeromonas hydrophila*; *E.clo*:*Enterobacter cloacae*; *E.a*:*Enterobacter aerogenes*; *P.m*:*Proteus mirabilis*; *K.p*:*Klebsiella pneumoniae*; *P.v*:*Proteus vulgaris*

Em relação as bactérias Gram-positivas, destacaram-se os extratos de *S. terebinthifolius*, *Polygonum hydro Piperoides* e *E. uniflora*. O extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* inibiu todos isolados testados com CIM de 0,06 a 7,5 mg.mL⁻¹ (média 3,73 mg.mL⁻¹), apresentando maior número de bactérias eliminadas (CBM) nas mesmas concentrações, quando comparado aos outros extratos (média 4,00 mg.mL⁻¹). *P. hydro Piperoides* foi efetivo sobre 32 isolados, com CIM de 0,01 a 7,5 mg.mL⁻¹ (média 5,07 mg.mL⁻¹) e CBM de 0,03 a 7,5mg/mL (média 5,25mg/mL), e *E. uniflora* também apresentou resultados satisfatórios sobre 25 bactérias com CIM de 0,01 a 7,5 mg.mL⁻¹ (média 3,05 mg.mL⁻¹) e CBM de 0,23 a 7,5 mg.mL⁻¹ (média 3,85 mg.mL⁻¹). Os isolados de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* apresentaram-se resistentes aos extratos, somente *S. terebinthifolius* apresentou valores de CIM e CBM de 7,5 mg.mL⁻¹ em 83,3% destas espécies, enquanto que *P. hydro Piperoides* apresentou apenas CIM de 7,5 mg/mL sobre os isolados de *Enterococcus*

facecium, *E. hyemale*, *B. trimera* e *S. chilensis* apresentaram atividade sobre ≤ 13 bactérias, com CIM 0,01 a 7,5 mg.mL⁻¹ e CBM 0,23 a 3,75 mg.mL⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações inibitórias (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) através do teste de microdiluição utilizando os extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius*, *S. chilensis*, *P. hydropiperoides*, *E. uniflora* e *B. trimera* frente às bactérias Gram-positivas

Espécie bacteriana	ST		SC		PH		EH		EU		BT	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
A.o	0,94	0,94	-	-	0,94	-	-	-	0,94	7,5	-	-
S.sp.	3,75	3,75	7,5	-	7,5	7,5	3,75	3,75	-	-	7,5	7,5
S.ag*	0,23	0,23	7,5	-	3,75	3,75	-	3,75	0,01	0,23	3,75	7,5
S.d	7,5	7,5	-	-	7,5	7,5	3,75	3,75	-	-	7,5	7,5
S.p(n=3)	7,5(1)	7,5(1)	-	-	7,5(2)	-	3,75(1)	3,75(1)	7,5(1)	-	-	-
	3,75(1)	3,75(1)	-	-	0,01(1)	-	-	-	-	-	-	-
	1,88(1)	1,88(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.a (n=5)	7,5(1)	3,75(2)	-	-	1,88(1)	-	7,5(1)	-	-	-	-	-
	3,75(1)	1,88(1)	-	-	0,94(2)	-	3,75(2)	3,75(1)	7,5(2)	7,5(1)	-	-
	1,88(1)	0,47(1)	-	-	0,23(1)	-	-	-	0,94(1)	-	-	-
	0,12(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.a*	7,5	7,5	-	-	7,5	7,5	-	3,75	7,5	-	-	-
S.h	0,12	3,75	-	-	-	-	7,5	-	1,88	1,88	-	-
	7,5(3)	3,75(1)	-	-	7,5(1)	-	3,75(3)	-	7,5(2)	-	-	-
S.x(n=5)	3,75(1)	0,12(1)	1,88(1)	-	3,75(2)	0,03(1)	-	-	3,75(1)	0,47(1)	0,01(1)	0,03(1)
	0,06(1)	-	-	-	1,88(1)	-	-	-	0,47(1)	-	-	-
	-	-	-	-	0,01(1)	-	-	-	0,03(1)	-	-	-
S.x	7,5	7,5	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-	-
S.ho	3,75	3,75	-	-	7,5	-	-	-	7,5	7,5	3,75	3,75
S.ho*	7,5	7,5	-	-	7,5	-	-	-	3,75	-	-	-
	0,12(4)	0,12(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,23(4)	0,47(3)	-	-	0,94(2)	-	3,75(1)	-	0,94(6)	1,88	3,75(1)	-
S.i.(n=9)	0,47(1)	0,94(1)	-	-	7,5(7)	-	7,5(2)	-	1,88(3)	-	7,5(3)	-
	-	3,75(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	7,5(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.fl (n=2)	7,5(2)	7,5(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.fl*	7,5	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.fa(n=2)	7,5(2)	7,5(1)	-	-	7,5(2)	-	-	-	0,94(1)	-	-	-
E.fa*	7,5	7,5	-	-	7,5	-	-	-	-	-	7,5	7,5

*Cepas padrão; -Sem atividade nas concentrações testadas; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; ST:*Schinus terebinthifolius*; EH:*Equisetum hyemale*; PH:*Polygonum hydropiperoides*; SC:*Solidago chilensis*; BT:*Baccharis trimera*; EU:*Eugenia uniflora*; A.o:*Alloiococcus otitis*; S.ag:*Streptococcus agalactiae*; S.sp:*Streptococcus spp.*; S.d:*Streptococcus dysgalactiae*; S.p:*Streptococcus plurimalium*; S.a:*Staphylococcus aureus*; S.h:*Staphylococcus hyicus*; S.x:*Staphylococcus xylosus*; S.ho:*Staphylococcus hominis*; S.i:*Staphylococcus intermedius*; E.fl: *Enterococcus faecalis*; E.fa:*Enterococcus faecium*

Em uma análise geral, observando as figuras 1 e 2, percebe-se que as bactérias Gram-positivas se apresentaram mais sensíveis aos extratos do que as Gram-negativas, onde os extratos com menor percentual de inibição foram os extratos de *S. chilensis*, *E. hyemale* e *B. trimera*. Na maior concentração testada (7,5 mg.mL⁻¹), o extrato de *S. terebinthifolius* apresentou ação inibitória sobre 100% das bactérias, enquanto que *E. uniflora* em 71,83%, e *P. hydropiperoides* em 57,74%. Dentre as bactérias que apresentaram algum grau de suscetibilidade a todos extratos, destacam-se *E. coli*, entre as Gram-negativas, *Staphylococcus xylosus* e *Streptococcus agalactiae*, entre as Gram-positivas. Essa diferença

na suscetibilidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas frente aos extratos está provavelmente relacionada com a estrutura da parede celular destes microrganismos, onde as Gram-negativas apresentam menor rigidez e maior complexidade química, além de ter um teor lipídico maior, atuando como uma barreira de permeabilidade, sendo reduzida a absorção de substâncias [31-33], enquanto que, nas gram-positivas, os compostos possam ter uma eficaz ancoragem e permeabilidade na parede celular, com maior exposição da camada de peptidoglicano [34].

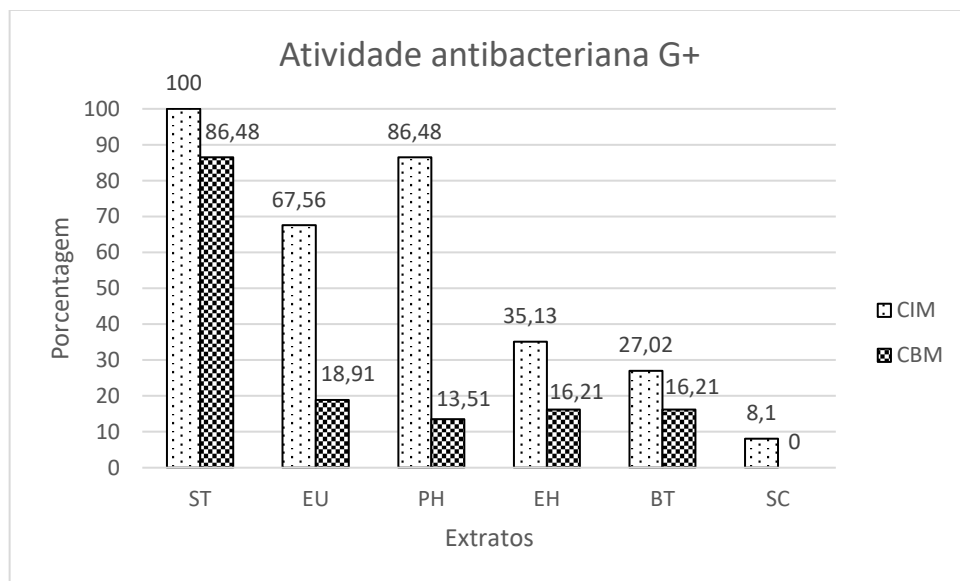


Figura 1. Porcentagem de bactérias Gram-positivas inibidos (Concentração Inibitória Mínima = CIM) e eliminados (Concentração Bactericida Mínima = CBM) pelos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* (ST), *E. uniflora* (EU), *P. hydropiperoides* (PH), *E. hyemale* (EH), *B. trimera* (BT) e *S. chilensis* (SC) nas concentrações testadas.

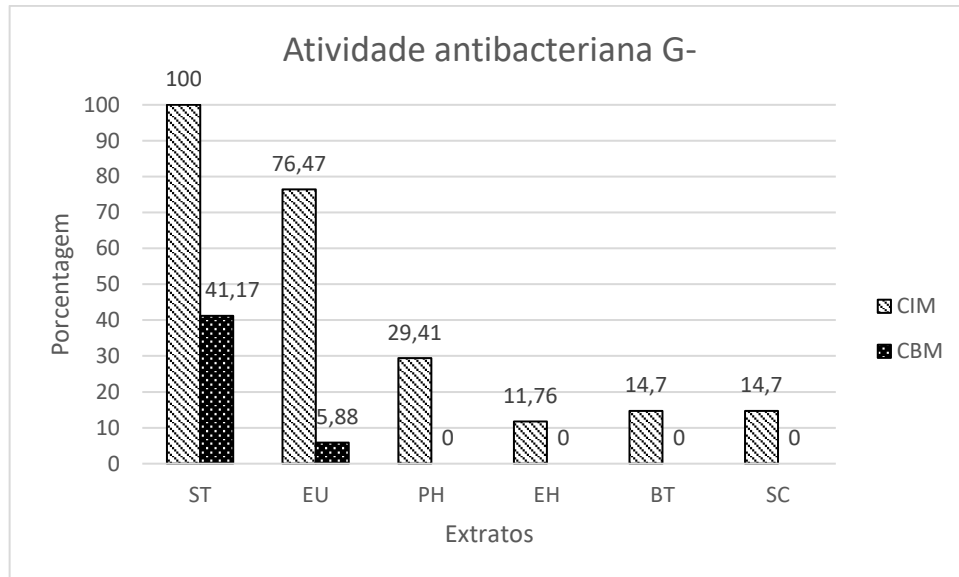


Figura 2. Porcentagem de bactérias Gram-negativas inibidas (Concentração Inibitória Mínima = CIM) e eliminadas (Concentração Bactericida Mínima = CBM) pelos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* (ST), *E. uniflora* (EU), *P. hydropiperoides* (PH), *E. hyemale* (EH), *B. trimera* (BT) e *S. chilensis* (SC) nas concentrações testadas.

Os resultados demonstraram atividade antimicrobiana em pelo menos um dos extratos testados em bactérias consideradas importantes devido a presença de resistência [4, 27-29]. Mesmo havendo alguns isolados bacterianos onde os extratos apresentaram baixo percentual de inibição com valores maiores de CIM e CBM, não podemos desconsiderar os resultados, pois outras concentrações podem demonstrar atividade ou até mesmo os compostos de forma isolada, apresentarem menores CIM e CBM, quando comparadas ao extrato bruto, ou apresentarem atividade sobre outros microorganismos patogênicos [35].

O extrato etanólico de *E. uniflora* tem apresentado ação sobre bactérias com CIM entre 1,09 a 35 mg/mL (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus roseus*, *M. luteus*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*) [36]. Porém estudos avaliando a atividade antibacteriana utilizando o extrato hidroalcoólico tanto de *E. uniflora* como de *P. hydropiperoides* não foram encontrados. Já o extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* tem apresentado atividade sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* com CIM de 250 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [37]. No entanto, ainda existem estudos que não fazem a identificação química dos extratos vegetais, dificultando

assim, a associação da atividade antimicrobiana com seus componentes majoritários de forma isolada ou associada.

Na identificação química dos extratos hidroalcoólicos através da cromatografia líquida pode-se observar a presença de compostos fenólicos, entre eles os flavonoides (Tabela 4), que já são relatados por suas atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e cicatrizante [38]. Esses compostos químicos já demonstraram que podem até potencializar a ação de antimicrobianos, atuando de forma sinérgica com antibióticos em espécies resistentes, como o *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina [39]. Tanto os compostos fenólicos como o potencial antioxidante dos flavonoides tem sido bem relacionados com o aumento da atividade antibacteriana [40], no entanto, sabe-se que diversos fatores influenciam na presença e concentração desses constituintes, entre eles estão a parte da planta, metodologia de extração e o tipo de extrato [9, 41].

Tabela 4. Compostos químicos identificados através de cromatografia líquida de ultra-eficiência dos extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU) e *Polygonum hydropiperoides* (PH)

TR	Identificação	EU (mg.g ⁻¹)	ST (mg.g ⁻¹)	PH (mg.g ⁻¹)
2.83	Ácido quínico ²	5.08	0.06	3.83
5.49	Ácido gálico ¹	0.13	1.12	0.07
10.28	(+)-Catequina ¹	0.04	0.09	0.20
11.27	Ácido clorogênico ¹	0.22	-	0.38
12.05	Ácido cafeico ¹	0.01	0.05	0.04
13.24	Etil galato ²	1.70	29.60	0.24
13.67	Ácido cumárico ¹	0.01	0.01	0.02
14.01	Ácido ferrúlico ¹	-	-	0.04
14.41	Miricitrina ²	1.18	1.47	0.38
15.08	Quercetina 3-arabinose ²	0.67	0.25	1.34
15.21	Ácido elágico ¹	1.61	0.22	0.07
15.58	Miricetina ¹	0.05	0.08	0.13
15.90	Quercetina ¹	0.43	0.11	4.12
16.89	Kaempferol ¹	0.12	0.01	0.03
18.00	Apigenina ¹	0.70	-	-
18.35	Pinocebrina ¹	0.58	0.02	0.02
19.41	3',5-Dihydroxy-3,4',5',7-tetramethoxyflavone ²	-	-	0.52
19.62	Chrisina ¹	0.01	0.01	0.01

*TR:Tempo de retenção (min); ¹Confirmado com padrão; ²Confirmado com MS/MS; *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU) e *Polygonum hydropiperoides* (PH).

O etil galato, o composto em maior concentração no extrato de ST, já tem demonstrado atividade antibacteriana em outros trabalhos sobre isolados de *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus* sp., *S. Aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, além de redução das CIM quando associados a outros compostos como o timol e carvacrol [42,43]. Além disso, associado a antibióticos também demonstrou ação sinérgica e superação da resistência de *S. aureus* MRSA sobre tetraciclina, muporicina e ácido fusídico [39, 44]. Outro composto majoritário, o ácido gálico, demonstrou atividade sobre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus* sp., *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, *E. subtilis*, *E. faecium*, *L. plantarum*, *S. typhimurium*, *H. pylori*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. epidermidis*, *E. cloacae*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. diphtheriticum*, *Micrococcus flavus*, *M. ysodieticus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonneie* e *S. flexneriae* [45-49], além de conferir sinergismo em associação com antibióticos (norfloxacino e gentamicina) e também a outros compostos (timol, carvacrol) [43,50].

Já o extrato de EU apresentou uma maior concentração de ácido quínico, que já vem sendo relatado, juntamente com seus derivados, com ação sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, além de apresentar sinergismo quando associado a antibiótico (oxacilina) sobre *S. aureus* MRSA [47, 51-53]. Outros dois compostos em maior concentração foram o etil galato e o ácido elágico, este último, vem sendo descrito tendo ação e também possível adjuvante para aumentar a ação de antibióticos sobre espécies de *Aeromonas hydrophila* resistentes [54].

O extrato de PH, apresenta em maior concentração a quercetina que já tem apresentado atividade sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *L. plantarum*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. diphtheriticum*, *Micrococcus flavus*, *M. ysodieticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*,

Salmonella typhimurium, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonneie*, *S. flexneriae* [46, 45, 49]. Além disso, sua associação com o antibiótico norfloxacino resultou em modulação do efeito antimicrobiano reduzindo a MIC sobre *Staphylococcus aureus* resistentes [55].

Alguns autores tem demonstrado que compostos presentes nesses extratos, em menor concentração, também possuem atividade antibacteriana: apigenina (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*) [56], catequina (*H. pylori*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*) [48, 57], ácido cafeico (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. subtilis*) [47], pinocembrina [58], ácido ferrúlico (*Cronobacter sakazakii*, *Acetobacter aceti*, *A. oeni*, *A. Pasteurians*) [59,60], crisina (*B. subtilis*, *B. sphaericus*, *S. aureus*, *K. aerogenes*, *Chromobacterium violaceum*) [61], kaempferol (*H. pylori*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) [62-64], miricetina (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. diphtheriticum*, *Micrococcus flavus*, *M. ysodieticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonneie*, *S. flexneriae*) [46,49,62].

Mediante as observações do estudo e da literatura, pode-se perceber que existem compostos que possuem ação antibacteriana de maneira isolada, enquanto outros apresentam efeito ou redução na concentração inibitória/bactericida apenas na forma associada com outros compostos ou antibióticos, ou atuam de forma a inibir os mecanismos de resistência das bactérias. Esses resultados são muito promissores, já que abrem uma gama de possibilidades para a pesquisa científica e também para prospecção de novos antimicrobianos ou aditivos às substâncias já existentes.

Precisamente não se conhece os mecanismos de ação dos compostos fenólicos, mas tem sido relatada a diminuição do pH intracelular, alterações na permeabilidade celular, no transporte de elétrons, absorção de nutrientes, proteína, síntese de ácido nucleico e atividade enzimática, perturbação da membrana (formação de poros e bolhas), formação de septo prévio à divisão celular causando inibição da síntese de proteínas, dano à membrana

plasmática e conseqüentemente perda de potássio, interação com proteínas de membrana (deformação estrutural e funcional), ligação a camada de peptidoglicanos com perda da integridade celular e exsudação de seu conteúdo, inativação de enzimas extracelulares, diminuição intracelular e, simultaneamente, o aumento extracelular de ATP [34,60,65,66].

Através da cromatografia gasosa foram encontrados outros componentes químicos nos extratos vegetais: ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e alcanos. Dentre os ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos graxos encontrados nos extratos, os compostos majoritários foram: ST – Ácido butanodióico, PH - Ácido butanoico e EU – Ácido benzoico (Tabela 5).

Tabela 5. Compostos químicos identificados através de cromatografia gasosa dos extratos hidrolacoólicos de *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU) e *Polygonum hydropiperoides* (PH)

TR	TR index**	Identificação	EU (mg.g ⁻¹)	ST (mg.g ⁻¹)	PH (mg.g ⁻¹)
4.380	748	Ácido acético	0,20	0,21	-
6.341	909	Ácido etilfosfórico	-	-	0,22
9.366	1177	Ácido butanodióico	0,99	1,20	1,82
9.762	1215	Ácido butanoico	0,61	0,67	3,11
10.167	1257	Ácido treônico	0,66	-	0,50
12.286	1483	Ácido ribônico	-	-	0,21
12.574	1515	Ácido propanotricarboxílico	0,68	0,86	1,10
13.602	1631	Ácido trihidroxibenzóico	1,36	-	-
13.603	1631	Éster etílico do ácido 3,4,5-Trihidroxibenzóico	-	0,88	-
13.756	1649	Ácido benzoico	2,66	-	1,79
14.278	1709	Ácido glucônico	0,51	0,46	1,09
20.152	2458	Ácido octadecanoico	0,61	-	-

*TR:Tempo de retenção (min); **FAME´s C8-C24; *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU) e *Polygonum hydropiperoides* (PH).

Apesar dos ácidos orgânicos estarem em pequena concentração, eles podem atuar em algum grau ou por efeito sinérgico, na atividade antimicrobiana, se fazendo necessários mais estudos acerca destes compostos. Dentre os compostos orgânicos encontrados no presente estudo alguns já foram identificados em extratos ou óleos vegetais com atividade antibacteriana, o ácido butanoico, ácido octadecanoico e ácido benzoico [67-70]. Outros ácidos orgânicos, como os ácidos caprílico, fumárico, málico, láctico e pirúvico, avaliados de

forma isolada em alimentos, já apresentaram atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e *L. monocytogenes* [71,72].

No teste de atividade hemaglutinante, o extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* foi o que apresentou mais concentrações reagentes, seguido do extrato de *E. uniflora*; enquanto que o extrato de *P. hydropiperoides* apresentou apenas na concentração de 15 mg.mL⁻¹. Em relação ao efeito hemolítico, foram observados resultados semelhantes ao teste de atividade hemaglutinante, onde o extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* foi o que apresentou mais concentrações reagentes, seguido do extrato de *E. uniflora*, e o extrato de *P. hydropiperoides* com apenas a concentração de 15 mg.mL⁻¹ reagente. A reação positiva, e mais intensa, na maior concentração pode ser explicada pela concentração de água destilada presente nos extratos, que é a substância que provoca a reação hemolítica (controle positivo), ou seja, as diluições dos extratos foram realizadas de forma seriada em PBS ou solução fisiológica, determinando assim, uma concentração de água destilada inversamente proporcional a diluição (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade hemaglutinante e hemolítica em eritrócitos caninos a 2% dos extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius*, *Eugenia uniflora* e *Polygonum hydropiperoides*

Extrato	Hemaglutinante - Concentrações (mg.mL ⁻¹)									
	15	7,5	3,75	1,88	0,94	0,47	0,23	0,12	0,06	0,03
ST	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
EU	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
PH	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato	Hemolítica - Concentrações (mg.mL ⁻¹)									
	15	7,5	3,75	1,88	0,94	0,47	0,23	0,12	0,06	0,03
ST	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-
EU	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
PH	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*ST: *Schinus terebinthifolius*; EU: *Eugenia uniflora*; PH: *Polygonum hydropiperoides*; + = Hemaglutinação; - = sem hemaglutinação; Controle - : Cloreto de sódio 0,9% = sem hemaglutinação/sem hemólise; PBS (tampão fosfato) = sem hemaglutinação/sem hemólise; - = sem hemólise; + = hemólise leve; ++ = hemólise moderada; +++ = hemólise intensa; Controle + : Água destilada = hemólise total.

Os testes de avaliação hematológica frente a plantas, seus extratos e outros componentes da natureza têm sido empregados como forma de triagem toxicológica [73-75]. É de grande importância avaliar os diversos parâmetros de toxicidade dos extratos vegetais, pois em suas composições existem diversas substâncias que podem acarretar em efeitos adversos/tóxicos aos seres vivos, onde na circulação sanguínea, por exemplo, um efeito indesejável seria a anemia hemolítica, provocada pela ruptura direta dos eritrócitos ou por sua aglutinação e posterior hemólise [76,77]. Além disso, a hemoglobina livre (proveniente das hemácias rompidas) pode acarretar efeitos sobre o sistema renal e cardiovascular, causando nefrotoxicidade e efeito vasomotor, respectivamente [78].

Através dos testes de atividades hemolítica e hemaglutinante pode-se perceber a limitação do extrato de *Schinus terebinthifolius*, em relação a um possível uso intravenoso, pois apresentou-se reagente na maioria das concentrações e o extrato de *Eugenia uniflora* na metade das concentrações testadas. No entanto, o extrato de *Polygonum hydropiperoides* apresentou-se promissor, por ser reagente apenas na maior concentração, abrindo a possibilidade de mais estudos para seu emprego em mais de uma via de administração. No âmbito geral, os compostos dos extratos vegetais podem ser estudados de forma isolada, vindo talvez, a diminuir ou eliminar sua toxicidade eritrocitária. Tanto a avaliação da atividade hemolítica como hemaglutinante não foram encontrados trabalhos utilizando os extratos vegetais de *Eugenia uniflora*, *Schinus terebinthifolius* e *Polygonum hydropiperoides*. Em relação aos possíveis mecanismos que provocam o efeito hemolítico dos extratos vegetais estudados, apesar de serem inespecíficos, podem citar a solubilização da membrana do eritrócito, alteração da permeabilidade ou oxidação da hemoglobina [79-82].

Na ovoscopia, após as inoculações dos extratos, os embriões desenvolveram-se normalmente durante os sete dias de observação, apresentando boa vascularização e mobilidade. Na análise macroscópica, após a necropsia, não foram observadas alterações de odor, formato ou coloração das estruturas, assim como, na análise histopatológica, não houve alterações em nenhum dos órgãos avaliados. Isso demonstra a ausência de toxicidade nas concentrações e extratos avaliados quando administrados na cavidade alantoide, sendo

necessários mais estudos *in vivo* para viabilizar e certificar o uso desses extratos como alternativa terapêutica. Os ovos embrionados são utilizados em estudos com vírus, bactérias [83,84] e já foram utilizados em estudos para avaliar antibióticos residuais e toxicidade como demonstra Shaw et al. [85] e Lemus et al. [86]. Isso reflete na importância dos resultados, pois através da via alantoide podemos determinar substâncias que alterem as estruturas embrionárias e ou ocasionem morte, o que não foi observado no presente estudo, sendo um resultado positivo para a continuidade dos testes de eficácia e toxicidade, além de ser uma maneira de evitar o uso de animais de laboratório nas etapas de triagem toxicológicas dos extratos vegetais.

Conclusão

Os extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius*, *Eugenia uniflora* e *Polygonum hydropiperoides*, com composição majoritária de compostos fenólicos, apresentaram atividade antibacteriana em isolados multirresistentes sem demonstrar toxicidade embrionária. Concentrações $\leq 0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ não ocasionaram hemaglutinação e hemólise em todos extratos, sendo o menos tóxico o extrato de *Polygonum hydropiperoides*.

Agradecimentos

ReproPel, Labvir, LRD, HCV, Capes, CNPq, Fapergs e UFPel.

Detalhes dos autores

¹Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

²Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

³Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil

⁴Laboratório de Bacteriologia, Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil

Referências bibliográficas

1. Ishii JB, Freitas JC, Arias MVB. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). *Pesq Vet Bras*. 2011;31:533-537.
2. Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL, Schwarz S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res*. 2001;32:341-62.
3. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemoth*. 2004;54:321-332.
4. Rossi F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. *Clin Infect Dis*. 2011;52:1138-1143.
5. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock Biology of Microorganisms*, 13th ed. San Francisco: Pearson Education; 2012.
6. BRASIL 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. *Diário Oficial da União*, n.87, 9 de maio de 2011, seção 1, p.39- 41. <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf> (Acessado em 15 dez 2016).
7. Araújo JG, Alves EMG, Bechtluft MP. Perfil de DNA plasmidal em bactérias resistentes a antibióticos isoladas do Ribeirão Paciência – Pará de Minas – MG. *SynThesis*. 2009;1:282-292.
8. Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. *Guia de antimicrobianos em veterinária*. 1st ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
9. Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím Nova*. 1998;21:99-105.
10. Barbosa-Filho JM, Nascimento Júnior FA, Tomaz ACA, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Souza MFV, Batista LM, Diniz MFFM. Natural products with antileprotic activity. *Rev Bras Farmacog*. 2007;17:141-148.
11. Duarte MCT. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *Muticiência*. 2006;7:1-16.
12. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42:222-224.
13. Tülay AC. Potential Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plant Extracts. In: Bhattacharya A, editor. *A Compendium of Essays on Alternative Therapy*. Intech. 2012. DOI: 10.5772/1053.

14. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, Dubose D, Ruiz D, Saleda J, Martinez M, Carillo L, Walker K, Kuhlman A, Townesmith A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol.*2011;137:121–140.
15. Mounanga MB, Mewono L, Angone SA. Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. *J Ethnopharmacol.*2015;174:618–627.
16. Schiedeck G, Bevilaqua GAP, Bachtigal GF, Bauer MVL. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. Embrapa Clima Temperado, 2008. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31389/1/comunicado-190.pdf>. Acessado em 11 Nov 2016.
17. Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc.* 2006;1:387-396.
18. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 1966; 45:493-496.
19. CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07-A9; Approved Standard - Ninth Edition, 2012.
20. Mebs D, Weiler I, Heinke HF. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. *Toxicon.* 1985;23: 955-962.
21. Pando SC, Macedo MLR, Freire MGM, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S. Biochemical Characterization of a Lectin from *Delonix regia* Seeds. *J Protein Chem.* 2002;21: 279-285.
22. Nunes CF. Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde contra o vírus da doença de Newcastle. 2011. http://www2.ufpel.edu.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=936. Acessado 10 Dez 2016.
23. Quinn PJ, Markey BK, Cater ME, Donnely WJ, Leonard FC. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 1st ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
24. Sadighara P, Amoli JS, Ashrafihelan J, Ahesfahani T, Farkhondeh T. The developmental toxicity of cottonseed extraction on chicken embryo. *Rev Bras Farmacog.* 2011;21:560-563.
25. Lobo RR. Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos embrionados de codorna como modelo biológico. 2015. <http://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2015/05/Raulene-Rodrigues-Lobo.pdf>. Acessado 10 Dez 2016.
26. CFMV. Guia Brasileiro de Boas Práticas de Eutanásia em Animais – Conceitos e procedimentos recomendados. Brasília: CFMV; 2012. p. 1-62.
27. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. France: WHO, 2014. http://who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf?ua=1. Acessado em 20 Dez 2016.

28. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis.* 2009;13:90-98.
29. Furtado G, Perdiz L, Onita J, Wey S, Medeiros E. Correlation between rates of carbapenem consumption and the prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in Brazil: a 4-year study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:664–666.
30. Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ, Boucher HW, Bradley JS, Eisenstein BI, Gerding D, Lynfield R. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. *Clin Infect Dis.* 2011;52:397-428.
31. Russell AD, Chopra I. *Understanding Antibacterial Action and Resistance.* 2nd ed. London: Ellis Horwood; 1996.
32. Russell AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:750–763.
33. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural.* 2004;34:159-163.
34. Dinesh Kumar V, Verma PRP, Singh SK. Morphological and *in vitro* antibacterial efficacy of quercetin loaded nanoparticles against food-borne microorganisms. *LWT - Food Sci Technol.* 2016;66:638-650.
35. Gomes FS, Procópio TF, Napoleão TH, Coelho LCBB, Paiva PMG. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J Appl Microbiol.* 2012;114:672-679.
36. Fiúza TS, Sabóia-Morais SMT, Paula JR, Tresvenzol LMF, Pimenta FC. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2008; 29:245-250.
37. Moura-Costa GF, Nocchi SR, Ceole LF, de Mello JCP, Nakamura CV, Dias Filho BP, Temponi LG, Ueda-Nakamura T. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on na indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2012;143:631–638.
38. Simões MO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrvick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5th ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ UFSC, 2004.
39. Soe WM, Myint NL, Sing LC, Sakharkar MK, Tang TH, Sakharkar KR. Ethyl Gallate as a Combination Drug Can Overcome Resistance in MRSA. *Lett Drug Des Discov.* 2011; 8:65-68.
40. Vatten DA, Lin YT, Labbe RG, Shetty K. Antimicrobial activity against selected foodborne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochem.* 2004; 39:1939-1946.

41. Martinez-Correa HA, Magalhães PM, Queiroga CL, Peixoto CA, Oliveira AL, Cabral FA. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. *J Supercrit Fluid.*2011;55: 998–1006.
42. Cueva C, Mingo S, Muñoz-González I, Bustos I, Requena T, del Campo R, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B; Moreno-Arribas MV. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2012;54:557–563.
43. Mazurova J, Kukla R, Rozkot M, Lustykova A, Slehova E, Sleha R, Lipensky J, Opletal L. Use of natural substances for boar semen decontamination. *Veterinari Medicina.* 2015;60:235–247.
44. Soe WM, Lin RTP, Lim LCS, Sakharkar M. *In vitro* drug interactions of gallates with antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Front Biosci.* 2010;2:668-72.
45. Manríquez-Torres JJ, Zúñiga-Estrada A, González-Ledesma M, Torres-Valencia JM. The Antibacterial Metabolites and Proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. *J Mex Chem Soc.* 2007;51:228-231.
46. Naz R, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool SA, Sayeed SA. Antibacterial Activity Directed Isolation of Compounds from *Punica granatum*. *J Food Science.* 2007;72:341-345.
47. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology.* 2011; 49:396-402.
48. Díaz-Gómez R, López-Solís R, Obreque-Slier E, Toledo-Araya H. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;54:331-335.
49. Rashed K, Ćirić A, Glamočlija J, Soković M. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. *Ind Crop Prod.* 2014;59:210–215.
50. Lima VN, Oliveira-Tintino CDM, Santos ES, Morais LP, Tintino SR, Freitas TS, Geraldo YS, Pereira RLS, Cruz RP, Menezes IRA, Coutinho HDM. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb Pathog.* 2016;99:56-61.
51. Kondo K, Takaishi Y, Shibata H, Higuti T. ILSMRs (intensifier of b-lactam-susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) from Tara [*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze]. *Phytomedicine.*2006;13:209–212.
52. Karar MGE, Pletzer D, Jaiswal R, Weingart H, Kuhnert N. Identification, characterization, isolation and activity against *Escherichia coli* of quince (*Cydonia oblonga*) fruit polyphenols. *Food Res Int.* 2014;65:121–129.

53. Harich M, Maherani B, Salmieri S, Lacroix M. Antibacterial activity of cranberry juice concentrate on freshness and sensory quality of ready to eat (RTE) foods. *Food Control*. 2017; 75:134-144.
54. Abuelsaad ASA, Mohamed I, Allam G, Al-Soluman AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *Life Sci*. 2013;93:714–722.
55. Diniz-Silva HT, Magnani M, de Siqueira S, de Souza EL, de Siqueira-Júnior JP. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses *norA*. *LWT - Food Sci Technol*. 2016;1-3.
56. Banerjee K, Banerjee S, Das S, Mandal M. Probing the potential of apigenin liposomes in enhancing bacterial membrane perturbation and integrity loss. *J Colloid Interf Sci*. 2015; 453:48–59.
57. Masika PJ, Sultana N, Afolayan AJ. Antibacterial Activity of Two Flavonoids Isolated from *Schotia latifolia*. *Pharm Biol*. 2004;42:105–108.
58. Massaro CF, Katouli M, Grkovic T, Vub H, Quinn RJ, Heard TA, Carvalho C, Manley-Harris M, Wallace HM, Brooks P. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia*. 2014;95:247–257.
59. Pastorkova E, Zakova T, Landa P, Novakova J, Vadlejch J, Kokoska L. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2013;161:209–213.
60. Shi C, Zhang X, Sun Y, Yang M, Song K, Zheng Z, Chen Y, Liu X, Jia Z, Dong R, Cui L, Xia X. Antimicrobial Activity of Ferulic Acid Against *Cronobacter sakazakii* and Possible Mechanism of Action. *Foodborne Pathog Dis*. 2016; 13:196-204.
61. Suresh Babu K, Babu TH, Srinivas PV, Kishore KH, Murthy USN, Rao JM. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agentes. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:221–224.
62. Wu T, Zang X, He M, Pan S, Xu X. Structure–Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-*Escherichia coli* Activity and Inhibition of DNA Gyrase. *J Agric Food Chem*. 2013;61:8185–8190.
63. Teffo LS, Aderogba MA, Eloff JN. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. *S Afr J Bot*. 2010; 76:25–29.
64. Escandón RA, del Campo M, López-Solis R, Obreque-Slier E, Toledo H. Antibacterial effect of kaempferol and (-)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. *Eur Food Res Technol*. 2016;242:1495–1502.

65. Eumkeba G, Sakdaratb S, Siritwong S. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine*. 2010;18:40–45.
66. Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen PJ. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Agric Food Chem*. 2009; 57:5987–6000.
67. Santoyo S, Rodríguez-Meizoso I, Cifuentes A, Jaime L, García-Blairsy Reina G, Señorans FJ, Ibáñez E. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potente antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Sci Technol*. 2009;42:1213–1218.
68. El Semary NA. The antimicrobial profile of extracts of a Phormidium-like cyanobacterium changes with phosphate levels. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012;28:585–593.
69. Ma Y, Ma J, Yang T, Cheng W, Lu Y, Cao Y, Wang J, Feng S. Components, Antioxidant and Antibacterial Activity of Tomato Seed Oil. *Food Sci Technol Res*. 2014;20:1-6.
70. Lee H, Ahn J, Kwon A, Lee ES, Kwak J, Min Y. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Apricot Seed. *Phytother Res*. 2014;28:1867–1872.
71. Greer GG, Dilts BD. Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork *Int J Food Microbiol*. 1995; 25:141–151.
72. Mohan A, Pohlman FW. Role of organic acids and peroxyacetic acid as antimicrobial intervention for controlling *Escherichia coli* O157:H7 on beef trimmings. *LWT - Food Sci Technol*. 2016; 65:868–873.
73. Dresch RR, Haeser AS, Lerner C, Mothes B, Vozári-Hampe MM, Henriques AT. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2005;15:16-22.
74. Pequeno NF, Soto-Blanco B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. *Acta Sci Vet*. 2006;34:45-48.
75. Paula CS, Canteli VCD, Verdham MCS, Kalegari M, Campos R, Hirota BCK, Miguel OGM, Miguel MD. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Rev Bras PI Med*. 2014; 16:189-195.
76. Figuera RA. Anemia hemolítica em cães e gatos. *Acta Sci Vet*. 2007; 35 Suppl 2:264-266.
77. Gertz MA. Management of cold haemolytic syndrome. *Brit J Haematol*. 2007;138:422–429.
78. Savitsky JP, Doczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobina. *Clin Pharmacol Ther*. 1978; 23: 73-80.
79. Eyer P, Hestle H, Kiese M, Klein G. Kinetics of ferrihaemoglobin formation by some reducing agents and the role of hydrogen peroxide. *Molec Pharmacol*. 1975;11:326-334.

80. Hägerstrand H, Isomaa B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem-Biol Interact.* 1991;79:335-347.
81. Bukowska B, Kowalska S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicol Lett.* 2004;152:73-84.
82. Aparicio RM, García-Celma MJ, Vinardell MP, Mitjans M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39:1063-1067.
83. Lang V, Marjuki H, Krauss SL, Webby RJ, Webster RG. Different incubation temperatures affect viral polymerase activity and yields of low-pathogenic avian influenza viruses in embryonated chicken eggs. *Arch Virol.* 2011;156:987–994.
84. Yamawaki RA, Milbradt EL, Coppola MP, Rodrigues JCZ, Andreatti Filho RL, Padovani CR, Okamoto AS. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella Enteritidis* after hatch. *Poult Sci.* 2013;92:1560–1563.
85. Shaw M, Brown R, Martin AG. Polypeptide Antibiotic 4205 from a Soil Bacillus. *Appl Microbiol.* 1966;14:79-85.
86. Lemus JÁ, Blanco G, Arroyo B, Martínez F, Grande J. Fatal embryo chondral damage associated with fluoroquinolones in eggs of threatened avian scavengers. *Environ Pollut.* 2009;157:2421–2427.

3.4 Artigo 4

Efeito do extrato hidroalcolico de *Polygonum hydropiperoides* em células espermáticas de *Sus scrofa domesticus*

Claudia Giordani, Cristine Cioato da Silva, Nathália Wacholz Knabah; Rafael Mielke Barbosa, Diego Martins Pires, Jéssica Fernanda Hoffmann, Fábio Clasen Chaves, Carine Dahl Corcini, Antônio Sérgio Varela Júnior, Marlete Brum Cleff

Aceito para publicação na revista Science and Animal Health

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *Polygonum hydropperoides* EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Sus scrofa domesticus*

GIORDANI, Claudia¹;
SILVA, Cristine Cioato da¹;
PERERA, Soliane Carra²;
BARBOSA, Rafael Mielke²;
PIRES, Diego Martins³;
CORCINI, Carine Dahl³
VARELA JÚNIOR, Antônio Sérgio⁵
CLEFF, Marlete Brum¹

¹Programa Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil; ²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil; ³Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil; ⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil; ⁵Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

RESUMO

Polygonum hydropperoides é uma das plantas utilizadas como medicinal e que apresenta atividades biológicas confirmadas na dependência da composição química. Desta forma, estudos sobre a toxicidade e interação desta planta com as células são necessários, sendo os espermatozoides uma opção inovadora para a avaliação. Assim, o objetivo do estudo foi determinar a composição química do extrato hidroalcoólico de *P. hydropperoides* (PH) e a toxicidade em células espermáticas. Para a determinação da composição química do extrato foi utilizada a análise cromatográfica líquida de ultra eficiência. A toxicidade foi avaliada através da análise computadorizada da motilidade espermática de sêmen suíno doméstico (*Sus scrofa domesticus*), enquanto as alterações celulares foram analisadas por citometria de fluxo. Foram identificados no extrato vegetal um total de 17 compostos fenólicos destacando-se o ácido quínico e quercetina. Os parâmetros avaliados não sofreram alterações significativas nas concentrações de 1,5 até 6,2 mg.mL⁻¹ independente do tempo de exposição ao extrato, sendo que a redução dos parâmetros ocorreu de forma progressiva ao aumento das concentrações (6,2 mg.mL⁻¹ ≤ 12 mg.mL⁻¹ ≤ 50 mg.mL⁻¹ ≤ 100 mg.mL⁻¹). Através da citometria de fluxo pode-se observar que em nível de estrutura celular, não foram observadas alterações significativas. O extrato hidroalcoólico de *P. hydropperoides*, abundante em ácido quínico e quercetina, acarretou apenas em alterações na motilidade espermática, a partir de

12 mg.mL⁻¹. As alterações provocadas pelo extrato podem sugerir os possíveis mecanismos de ação a serem explorados para aplicação clínica.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. CASA. Toxicidade. Motilidade. Plantas.

INTRODUÇÃO

Produtos provenientes de plantas podem ser tóxicos, mesmo quando obtidos de espécies utilizadas popularmente como medicinais, sendo necessários estudos para elucidação da composição, qualidade, eficácia e segurança destes recursos (ZÖLLNER; SCHWARZ, 2013). A pesquisa científica com espécies vegetais tem sido incentivada e intensificada devido a importância da utilização das plantas medicinais e a possibilidade de obtenção de compostos bioativos para tratamentos de enfermidades e combate de microrganismos resistentes (BARBOSA-FILHO et al., 2007; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as plantas medicinais como a melhor fonte para o desenvolvimento de uma variedade de fármacos (PRASHAR et al., 2003). Dada sua importância, no Brasil, o Ministério da Saúde criou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), com objetivos de ampliar ações terapêuticas e melhorias à atenção básica no SUS, incentivar o uso sustentável da biodiversidade nacional, valorizar e preservar o conhecimento tradicional, além da listagem das plantas com potencial para geração de produtos e da orientação às pesquisas para elaboração de fitoterápicos eficazes e seguros (BRASIL, 2009a, 2009b).

Dentre as plantas citadas na lista do RENISUS, está *Polygonum hydropiperoides* Michaux (Erva-de-bicho; Polygonaceae), considerada como planta invasora, tendo uso popular no tratamento de feridas, além de ação antiinflamatória, antiparasitária, antidiarreica, anti-hemorroidal, adstringente e diurética (BRANDÃO et al., 2012; BUSSMANN et al., 2010; LORENZI; MATOS, 2008). Estudos científicos são escassos, mas demonstram atividade antifúngica e antibacteriana (BUSSMANN et al., 2008; FREIXA et al., 1998).

Apesar da indicação popular e de comprovação científica da atividade, pesquisas que avaliem toxicidade e o local de ação de extratos vegetais, especialmente para *P. hydropiperoides*, ainda são incipientes (BIANCHI et al., 1993; CUNHA et al., 2016). Assim, a fim de viabilizar a aplicação dos extratos, a triagem de toxicidade e determinação do mecanismo de ação devem ser

considerados, o que inicialmente pode ser feito através da utilização de técnicas simples de avaliação celular, dispensando o uso de animais de laboratório. Neste contexto, se destacam as células espermáticas, por possuírem semelhança com células somáticas e demonstrarem grande sensibilidade a toxinas (ANDERSSON et al., 2006, 2010; HOORNSTRA et al., 2003; JÄÄSKELÄINEN et al., 2003; SEVERIN et al., 2005). Como vantagem, também pode ser destacada a facilidade de obtenção de dados e avaliação através de técnicas computadorizadas/automatizadas, como o CASA (*Computer-Assited Sperm Analysis*) e a citometria de fluxo, na qual é possível verificar alterações de parâmetros espermáticos. Mediante o exposto, o objetivo desse estudo foi determinar a composição química e a citotoxicidade, em diferentes tempos de exposição, do extrato hidroalcoólico de *P. hydropiperoides* em células espermáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal obtido (Pelotas-RS, 31°33'02.0''S, 52°16'45.5''W) e depositado no Herbário do Departamento de botânica da Universidade Federal de Pelotas, sendo registrado sob o número 25931 – *P. hydropiperoides* Michx (Erva-de-bicho). Para preparação do extrato hidroalcoólico, misturou-se 100g de folhas secas, trituradas, com 500mL de álcool de cereais a 70%. Após, foi realizada a rotaevaporação à vácuo com banho de aquecimento (50°C), sendo o volume inicial restituído com água destilada estéril (SCHIEDECK et al., 2008).

Para avaliar a composição química dos extratos foram injetados (cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência - Shimadzu, Prominence, acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução - Impact HD) 10 µL da amostra (300 µg.mL⁻¹) diluída em metanol. A separação dos compostos fenólicos ocorreu através da utilização de pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 x 150 mm, 100 Å, 3 µm) Phenomenex (Torrance, CA, USA). Os compostos fenólicos foram identificados através da comparação do tempo de retenção com os padrões externos, espectro de massa e perfil de fragmentação (dados internos e de literatura).

Para avaliação da toxicidade celular, utilizou-se fração rica de sêmen suíno doméstico (*Sus scrofa domesticus*) com motilidade espermática >70%, diluída (1:1) em Beltsville Thawing Solution (BTS). Para os tratamentos, foi adicionado ao sêmen o extrato hidroalcoólico de *P. hydropiperoides* (previamente aferindo o pH da solução de estoque – SE), diluídos em BTS até

obtenção das concentrações finais de 0 (controle negativo: apenas BTS), 1,5; 6,2; 12,5; 50 e 100 mg.mL⁻¹. O efeito do extrato foi observado nos tempos 0, 24 e 48 horas de contato com o sêmen, armazenados sob refrigeração (17°C). A cinética espermática foi avaliada através da análise computadorizada de espermatozoides (CASA) no equipamento Axio Scope A1 Ax10 (Zeiss), com o programa Sperm Vision®, em condições isotérmicas de 37°C, sendo realizada a média de leitura em 10 campos (≥ 1000 células/campo). Os parâmetros avaliados foram motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), distância média percorrida (DAP-mm), distância curvilínea (DCL), distância linear (DSL-mm), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL-mm/s), velocidade linear progressiva (VSL-mm/s), frequência do batimento flagelar cruzado (BCF-Hz), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH-mm), oscilação (WOB-Hz), linearidade (LIN-%) e retilinearidade (STR-%).

Os parâmetros acrossoma não reagido (ANR), integridade de membrana (IM), fluidez da membrana (F), potencial de membrana mitocondrial (PMM), índice de fragmentação de DNA (DFI), espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica (LPO) foram avaliados por citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing - Life Technologies) no dia 0 (toxicidade aguda). Foi utilizado laser violeta ($\lambda = 405$ nm), e as foram células coradas com Hoechst 33342, exceto para a avaliação de DNA (concentração de 16,2 mM), sendo eliminados efeitos não-espermáticos (MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012). Para as leituras foram adicionados 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) sem cálcio (80g NaCl, 11,5g KCl, 24g Na₂HPO₄, 2g KH₂PO₄ e 1L água Mili-Q), apresentando 20.000 eventos/análise com fluxo de 200 células. Foram utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada parâmetro avaliado, permanecendo a amostra por cinco minutos, em ausência de luz a 37°C e após adicionado 500 μ l de PBS sem cálcio.

Na avaliação de acrossoma, foram utilizados os corantes de lectina de amendoim (PNA) associado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1 μ g.mL⁻¹) (FITC-PNA), e o iodeto de propídio (IP) (7,3 μ M). Os resultados foram expressos em % de células com o acrossoma não reagido (FITC-PNA - e a IP -) (MARTINEZ-PASTOR et al., 2010).

A integridade de membrana espermática foi avaliada através da inserção dos corantes 27 mM carboxifluoresceína diacetato (DFC) e 7,5 mM de IP, sendo os resultados expressos em % de células não danificadas (DFC+IP-) (FERNANDEZ-GAGO et al., 2013).

A avaliação do DNA foi realizada com o corante acridina laranja, onde em 10 μ L de sêmen foi adicionado 5 μ l de tampão TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 7,2) por 30 segundos, 10 μ l de Triton (0,1% Triton X-100) por 30 segundos, e 5 μ l de acridina laranja (ácido

cítrico 0,037 M, Na₂HPO₄ 0,126 M, 0,0011 M de EDTA dissódico, NaCl 0,15 M, pH 6,0) (EVENSON; JOST, 1994). As leituras foram realizadas em até cinco minutos, sendo os resultados expressos em índice de DNA fragmentado.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) foram avaliadas com 2'7'diclorofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) (1 uM) e 7,3 μM de IP, sendo os resultados expressos em intensidade da fluorescência verde de espermatozoides não danificados (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010).

A função mitocondrial foi avaliada através da sonda rodamina 123 (Rh123) (13 uM) e IP (7,3 uM). Os resultados foram expressos em % de espermatozoides intactos com alta funcionalidade mitocondrial (alta fluorescência e alto acúmulo Rh123) (SILVA et al., 2016).

A lipoperoxidação (LPO) foi medida utilizando 0,002 mM C11 BODIPY 581/591, sendo os resultados expressos através das fluorescências verde e vermelha após duas horas, considerando a % de presença de LPO (SILVA et al., 2013).

Para a análise estatística foi utilizado o software Statistix 9.0®, sendo dados com normalidade, foi utilizado o teste ANOVA e as médias foram comparadas através do teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da cromatografia líquida, identificou-se 17 compostos fenólicos no extrato de *Polygonum hydropiperoides*, sendo os majoritários o ácido quínico e quercetina (Tabela 1).

Tabela 1 - Compostos químicos identificados por cromatografia líquida de ultra-eficiência do extrato hidrolacóico de *P. hydropiperoides* (PH).

Nº	RT (min)	Identificação	PH (mg/g)
1	2.83	Ácido quínico	3.83
2	5.49	Ácido gálico	0.07
3	10.28	Catequina	0.20
4	11.27	Ácido Clorogênico	0.38
5	12.05	Ácido cafeico	0.04
6	13.24	Etil galato	0.24
7	13.67	Ácido cumárico	0.02
8	14.01	Ácido Ferrúlico	0.04
9	14.41	Miricitrina	0.38
10	15.08	Quercetina 3-Arabinose ²	1.34
11	15.21	Ácido Elágico	0.07
12	15.58	Miricetina	0.13
13	16.89	Quercetina	4.12
14	18.00	Kaempferol ¹	0.03
15	19.41	Pinocembrina ¹	0.02
16	19.62	3',5-Di-hidroxi-3,4',5',7-tetrametoxiflavona ²	0.52
17	20.12	Crisina	0.01

*N:Número; TR:Tempo de retenção (min); ¹Confirmado com padrão; ²Confirmado com MS/MS.

Na avaliação da motilidade espermática, após contato com o extrato de *P. hydropiperoides* (SE = pH 4.59), observou-se no momento 0 horas, alterações somente a partir da concentração 12,5 mg.mL⁻¹, com redução somente da motilidade progressiva das células. A redução na motilidade total foi observada a partir da concentração 50 mg.mL⁻¹, em todos os tempos de exposição, porém com maior intensidade em 100 mg.mL⁻¹ (Figura 1).

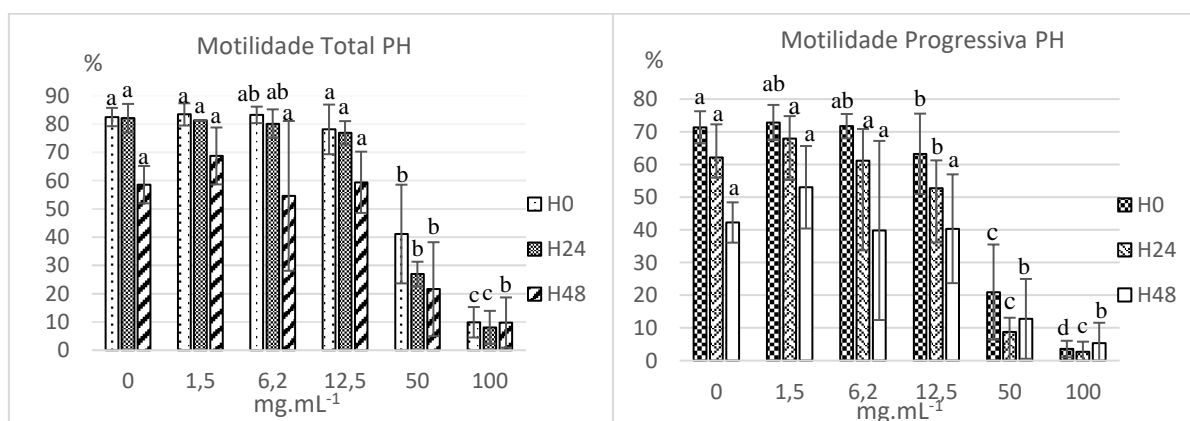


Figura 1 - Motilidade total e progressiva média (%) (\pm Desvio Padrão) de espermatozoides suínos frente a diferentes concentrações e tempos de exposição ao extrato de *P. hydropiperoides* (PH). ^{abc}Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$).

De modo geral, todos os parâmetros espermáticos avaliados não sofreram alterações significativas na concentração de 1,5 mg.mL⁻¹ independente do tempo de exposição, sendo que a redução dos parâmetros avaliados ocorreu de forma progressiva ao aumento das concentrações (6,2 mg.mL⁻¹ ≤ 12 mg.mL⁻¹ ≤ 50 mg.mL⁻¹ ≤ 100 mg.mL⁻¹).

No momento 0, houve redução de parâmetros nas concentrações 50 e 100 mg.mL⁻¹, exceto com relação a oscilação, linearidade e retilinearidade que não foram alterados. Em 24 horas, observou-se redução da distância média percorrida e linear (DAP e DSL) a partir de 6,2 mg.mL⁻¹, enquanto que com 12,5 mg.mL⁻¹ observou-se alteração em mais quatro parâmetros de distância e velocidade (DAP, DSL, VSL, DCL, VAP e VCL), e em 50 mg.mL⁻¹ a frequência dos batimentos também foi alterada (DAP, DSL, VSL, DCL, VAP, VCL e BCF), enquanto na concentração 100 mg.mL⁻¹ somente a oscilação (WOB) não sofreu alteração. Entretanto em 48 horas, as alterações iniciaram em 50 mg.mL⁻¹ (apenas em VAP) e em 100 mg.mL⁻¹ houve reduções em quase totalidade dos parâmetros espermáticos (Tabela 2). O STR, em todos os momentos e nas concentrações testadas, não apresentou mudanças significativas.

Tabela 2 - Parâmetros de motilidade espermática (média±desvio padrão) frente ao extrato hidroalcoólico de *P. hydropiperoides* (PH) nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas.

Parâmetros	PH Concentração (mg.mL ⁻¹) 0 Horas					
	0 (BTS)	1,5	6,2	12,5	50	100
DAP (µm/s)	27,20±3,48 ^A	27,84±0,15 ^A	28,20±0,14 ^A	27,18±4,60 ^A	18,96±2,64 ^B	16,67±8,55 ^B
DCL (µm/s)	53,30±7,08 ^A	53,88±3,65 ^A	54,24±7,32 ^A	51,84±8,87 ^A	36,61±5,82 ^B	29,48±18,36 ^B
DSL (µm/s)	19,44±2,02 ^A	20,17±1,37 ^A	20,44±2,64 ^A	19,97±2,78 ^A	13,87±2,03 ^B	13,26±7,33 ^B
VAP (µm/s)	59,89±8,42 ^A	60,69±3,82 ^A	61,95±7,27 ^A	59,29±9,63 ^A	41,34±4,58 ^B	39,23±18,07 ^B
VCL (µm/s)	116,86±16,87 ^A	117,58±7,57 ^A	118,89±15,30 ^A	112,79±18,46 ^A	79,56±10,47 ^B	68,09±38,59 ^B
VSL (µm/s)	43,03±4,99 ^A	44,30±2,80 ^A	45,07±5,47 ^A	43,61±5,72 ^A	30,29±3,51 ^B	31,00±15,48 ^B
STR (%)	0,71±0,03 ^A	0,72±0,01 ^A	0,71±0,01 ^A	0,73±0,03 ^A	0,73±0,07 ^A	0,72±0,23 ^A
LIN (%)	0,36±0,02 ^A	0,37±0,00 ^A	0,37±0,01 ^A	0,38±0,02 ^A	0,38±0,05 ^A	0,45±0,19 ^A
WOB (µm/s)	0,50±0,01 ^A	0,51±0,00 ^A	0,51±0,00 ^A	0,52±0,01 ^A	0,51±0,02 ^A	0,57±0,20 ^A
ALH (µm/s)	2,86±0,35 ^A	2,85±0,15 ^{AB}	2,91±0,14 ^A	2,81±0,32 ^{AB}	2,28±0,44 ^{BC}	2,21±1,07 ^C
BCF (Hz)	39,27±0,35 ^A	39,80±1,03 ^A	39,25±1,84 ^A	38,02±1,18 ^{AB}	32,52±3,72 ^B	31,81±12,96 ^B
24 Horas						
DAP (µm/s)	21,83±1,30 ^{AB}	24,53±1,50 ^A	20,76±1,46 ^B	18,71±1,73 ^B	14,92±2,48 ^C	6,54±5,96 ^D
DCL (µm/s)	41,15±2,36 ^A	43,38±2,14 ^A	37,14±2,10 ^{AB}	32,83±3,32 ^{BC}	27,62±5,95 ^C	12,75±12,05 ^D
DSL (µm/s)	16,64±1,46 ^{AB}	18,17±1,15 ^A	15,00±1,03 ^{BC}	13,71±1,38 ^C	10,90±2,59 ^D	4,28±4,00 ^E
VAP (µm/s)	48,27±2,97 ^A	55,00±3,67 ^{AB}	47,09±3,69 ^{AB}	42,80±4,34 ^B	34,00±4,85 ^C	16,64±15,30 ^D
VCL (µm/s)	90,67±5,46 ^A	97,06±5,24 ^A	83,92±4,96 ^{AB}	74,75±8,47 ^{BC}	62,19±10,59 ^C	32,58±31,19 ^D

VSL ($\mu\text{m/s}$)	36,79 \pm 3,24 ^A	40,80 \pm 2,82 ^{AB}	34,05 \pm 2,54 ^A	31,33 \pm 2,94 ^B	24,98 \pm 4,97 ^C	11,05 \pm 10,57 ^D
STR (%)	0,75 \pm 0,03 ^A	0,73 \pm 0,01 ^A	0,71 \pm 0,01 ^A	0,72 \pm 0,05 ^A	0,72 \pm 0,07 ^A	0,37 \pm 0,34 ^B
LIN (%)	0,40 \pm 0,02 ^A	0,41 \pm 0,01 ^A	0,40 \pm 0,01 ^A	0,41 \pm 0,04 ^A	0,40 \pm 0,07 ^A	0,20 \pm 0,21 ^B
WOB ($\mu\text{m/s}$)	0,52 \pm 0,01 ^A	0,56 \pm 0,01 ^A	0,55 \pm 0,02 ^A	0,56 \pm 0,02 ^A	0,55 \pm 0,08 ^A	0,30 \pm 0,30 ^A
ALH ($\mu\text{m/s}$)	2,89 \pm 0,29 ^A	3,24 \pm 0,15 ^A	3,17 \pm 0,17 ^A	2,98 \pm 0,36 ^A	2,70 \pm 0,54 ^A	1,61 \pm 1,50 ^B
BCF (Hz)	36,61 \pm 2,42 ^A	35,36 \pm 1,42 ^A	33,55 \pm 1,01 ^{AB}	32,17 \pm 2,26 ^{AB}	27,55 \pm 5,04 ^B	14,34 \pm 13,83 ^C
48 Horas						
DAP ($\mu\text{m/s}$)	22,37 \pm 3,32 ^A	24,22 \pm 1,37 ^A	20,71 \pm 7,24 ^A	22,25 \pm 0,29 ^A	18,66 \pm 4,06 ^A	9,31 \pm 9,73 ^B
DCL ($\mu\text{m/s}$)	44,50 \pm 5,25 ^A	46,86 \pm 1,61 ^A	41,02 \pm 14,84 ^A	43,09 \pm 6,81 ^A	36,44 \pm 11,12 ^A	19,03 \pm 20,00 ^B
DSL ($\mu\text{m/s}$)	16,13 \pm 1,68 ^A	18,60 \pm 1,22 ^A	15,24 \pm 6,00 ^A	17,32 \pm 2,97 ^A	15,02 \pm 4,15 ^A	7,07 \pm 7,41 ^B
VAP ($\mu\text{m/s}$)	49,36 \pm 8,75 ^{AB}	53,11 \pm 3,37 ^A	45,26 \pm 15,95 ^{AB}	48,86 \pm 6,68 ^{AB}	39,67 \pm 7,85 ^B	19,89 \pm 20,86 ^C
VCL ($\mu\text{m/s}$)	97,65 \pm 13,90 ^A	102,46 \pm 4,14 ^A	89,42 \pm 32,57 ^A	94,14 \pm 14,45 ^A	76,98 \pm 22,03 ^A	40,74 \pm 42,97 ^B
VSL ($\mu\text{m/s}$)	35,50 \pm 3,93 ^A	40,77 \pm 2,75 ^A	33,35 \pm 13,18 ^A	38,03 \pm 6,25 ^A	31,92 \pm 8,23 ^A	15,02 \pm 15,77 ^B
STR (%)	0,72 \pm 0,08 ^A	0,76 \pm 0,02 ^A	0,67 \pm 0,21 ^A	0,77 \pm 0,03 ^A	0,79 \pm 0,05 ^A	0,37 \pm 0,39 ^A
LIN (%)	0,36 \pm 0,03 ^A	0,39 \pm 0,02 ^A	0,33 \pm 0,11 ^A	0,39 \pm 0,02 ^A	0,41 \pm 0,06 ^A	0,18 \pm 0,19 ^B
WOB ($\mu\text{m/s}$)	0,49 \pm 0,02 ^A	0,51 \pm 0,02 ^A	0,46 \pm 0,13 ^A	0,51 \pm 0,02 ^A	0,52 \pm 0,08 ^A	0,24 \pm 0,25 ^B
ALH ($\mu\text{m/s}$)	2,76 \pm 0,71 ^A	2,70 \pm 0,12 ^A	2,60 \pm 0,86 ^A	2,57 \pm 0,29 ^A	2,48 \pm 0,77 ^A	1,07 \pm 1,13 ^B
BCF (Hz)	34,63 \pm 4,35 ^A	36,58 \pm 1,36 ^A	32,56 \pm 10,71 ^A	35,94 \pm 3,47 ^A	33,43 \pm 8,81 ^A	18,02 \pm 18,76 ^B

^{ABCD}Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre as concentrações em um mesmo parâmetro de motilidade ($p < 0,05$). PH: Extrato hidrolacóico *Polygonum hydropiperoides*; MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, DAP: Distância média percorrida, DCL: Distância curvilínea, DSL: distância linear, VAP: Velocidade média da trajetória, VCL: Velocidade curvilínea, VSL: Velocidade linear progressiva, BCF: Frequência do batimento flagelar cruzado, ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, STR: Retilinearidade.

Através da análise por citometria de fluxo, observou-se que o extrato hidroalcoólico de *P. hydropiperoides* nas concentrações de 1,5 até 12,5 mg.mL⁻¹, não causou alterações nos parâmetros avaliados nas células espermáticas quando comparados ao controle ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da citometria de fluxo das células espermáticas de suínos (média±erro padrão) frente às diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *P. hydro Piperoides* (PH).

Avaliação	Concentração PH (mg.mL ⁻¹)			
	0 (BTS)	1,5	6,2	12,5
ANR (%)	79,61±1,24 ^A	73,52±6,54 ^A	75,43±2,93 ^A	77,80±2,19 ^A
IM (%)	79,91±2,72 ^A	80,47±2,18 ^A	78,30±2,99 ^A	77,60±3,39 ^A
DFI	5,59±0,01 ^A	5,18±0,18 ^A	5,72±0,04 ^A	5,78±0,02 ^A
F (%)	41,42±11,71 ^A	18,80±5,28 ^A	26,30±3,72 ^A	31,26±3,42 ^A
ROS	26,55±7,82 ^A	49,44±13,30 ^A	43,35±1,59 ^A	51,91±2,07 ^A
PMM (%)	54,20±10,89 ^A	45,88±13,17 ^A	49,10±14,18 ^A	41,23±16,77 ^A
LPO (%)	74,91±3,67 ^A	75,15±1,28 ^A	75,70±2,02 ^A	76,91±5,52 ^A

^ASem diferença estatística ($p > 0,05$) entre as concentrações. PH: Extrato hidroalcoólico de *Polygonum hydro Piperoides*; ANR: Acrossoma Não Reagido; IM: Integridade de Membrana; DFI: Índice de fragmentação de DNA; F: Fluidez; ROS: Espécies Reativas de Oxigênio; PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial; LPO: Lipoperoxidação.

Alguns dos compostos identificados no extrato já têm sido relatados com atividade sobre células espermáticas. Anderson et al. (1997) demonstraram efeito antígenotóxico de miricetina e quercetina em linfócitos e espermatozoides humanos, quando combinadas com mutagênicos alimentares. Purdy et al. (2004) avaliando catequina (25-100 μ M) na motilidade espermática, relataram efeitos benéficos em todas concentrações testadas quando comparados ao controle negativo. Em relação à motilidade progressiva e vigor, a quercetina (5-20 μ g.mL⁻¹) adicionada em espermatozoides de carneiros, antes da criopreservação, não causou efeitos significativos nos parâmetros (SILVA et al., 2012). Entretanto, Zribi et al. (2012) ao avaliarem a quercetina juntamente com meio de criopreservação em sêmen humano, observou efeitos benéficos ao descongelamento na motilidade e viabilidade espermática, e integridade de DNA. Entretanto, recentemente, Jamalan e colaboradores (2016) demonstraram que o uso de catequina e quercetina em espermatozoides expostos a metais tóxicos ocasionaram uma diminuição mais intensa da motilidade espermática quando comparado ao controle. Porém, em nosso estudo pode-se observar diferença nos parâmetros de motilidade, provavelmente decorrente da concentração utilizada e dos outros compostos presentes no extrato.

Alterações relacionadas com o tempo, nas 24 e 48 horas (CASA), podem ser provenientes de uma maior produção de ROS pelas mitocôndrias dos espermatozoides, observado na

citometria, já que estes necessitam de um maior consumo de oxigênio, por tratarem-se de células com alta motilidade (>70%), sendo uma pequena parte deste convertido em ROS (ANDRADE et al., 2010). Além disso, as alterações espermáticas podem ser causadas pelo tempo de contato com os compostos químicos presentes nos extratos e suas concentrações, danificando ou sobrecarregando a célula e/ou disparando algum mecanismo intrínseco, como por exemplo, a reação do acrossoma, além da queda na quantidade de espermatozoides móveis que é considerada proporcional ao tempo de refrigeração (BUCAK; TEKIN, 2007).

Parte das alterações dos parâmetros de motilidade espermática podem estar associadas pela mudança no pH do meio e adaptação das células espermáticas, já que o extrato de *P. hydropiperoides*, apresentava pH ácido (4.59), o que está de acordo com estudo que descrevem queda nos parâmetros de motilidade em pH <6,5 e redução extrema em valores <5,0 (CONTRI et al., 2013; ST-PIERRE; MOREAU, 1987). Em determinados momentos, as células regulam seu pH utilizando mecanismos para equilibrar a produção, eliminação, transporte e tamponamento de H⁺ (NISHIGAKI et al., 2014). Sabe-se que em pH mais ácidos (5,2 e 6,2) ocorre uma redução na atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, a qual participa do equilíbrio intracelular de Ca₂⁺, levando a alterações no influxo de cálcio e conseqüentemente, a alterações no balanço flagelar, velocidade de natação, capacitação espermática e reação do acrossoma, e na motilidade espermática que depende de concentrações de Ca₂⁺ livre (ZHOU et al., 2015). Nas concentrações de 50 e 100 mg.mL⁻¹, houve redução exacerbada na motilidade, sugerindo alta mortalidade dos espermatozoides, o que também acarretaria na produção de ROS, como principal fonte, pela ativação de um sistema enzimático de aminoácidos oxidase (UPRETI et al., 1998). Estudos já relatam que a redução da motilidade espermática *in vitro* pode ser proveniente de substâncias contidas nos extratos vegetais brutos, entre elas, os polifenóis, flavonoides e ácidos fenólicos (SHEHAB; ABU-GHARBIH, 2014; TAITZOGLU et al., 2001). De acordo com alguns autores, os flavonoides, como a catequina, por exemplo, alteram a cascata de fosforilação, interferindo na regulação, sinalização, capacitação e reação acrossomal (PARRISH et al., 1999; PURDY et al., 2004; VISCONTI; KOPF, 1998).

Na avaliação das células espermáticas por citometria de fluxo, pode-se observar um aumento dos níveis de ROS e na fluidez, mesmo não havendo diferença estatística, diferentemente do que foi observado por outros autores que relataram atividade antioxidante, redução da lipoperoxidação e de danos ao DNA com a utilização de extratos contendo o composto ácido quínico ou, quando este foi usado de forma isolada (ALLAI et al., 2016; SENGH et al., 2000,

2005), resultados semelhantes também observados com a quercetina (MCNIVEN; RICHARDSON, 2003, 2006).

A membrana do espermatozóide tem em sua composição grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, e estes são os mais atingidos pelos ROS, levando a alterações estruturais e de permeabilidade, que podem provocar a morte celular ou alterar a fluidez, motilidade e viabilidade espermática (AHLUWALIA; HOLMAN, 1969; AM-IN et al., 2011; MAIA; BICUDO, 2009; MILLER et al., 2004). Isso demonstra a importância da diminuição/equilíbrio de ROS, já que estes danificam moléculas de DNA, proteínas e lipídios, e também provocam um esgotamento do ATP, necessário para sua motilidade (DE LAMIRANDE et al., 1998; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992). O aumento da fluidez, em processos fisiológicos, é essencial para capacitação espermática ou alteração da membrana, porém, do ponto de vista tóxico, tem sido sugerido como responsável pela diminuição da motilidade espermática devido ao enfraquecimento das ligações de Van der Waals presentes entre as regiões hidrofóbicas dos lipídios, ou pode acarretar em alterações de permeabilidade, permitindo a entrada de íons e pequenas moléculas, vindo a desestabilizar a membrana e provocar danos, levando até mesmo a morte celular (BORGES et al., 2011; SERGENT et al., 2005; SIERRA-VALDEZ et al., 2013).

CONCLUSÃO

O trabalho é pioneiro na avaliação dos efeitos do extrato hidroalcoólico de *P. hydropiperoides* em células espermáticas, demonstrando que o extrato, com composição majoritária de ácido quínico e quercetina, ocasionou alterações somente na motilidade espermática, observadas a partir de 12 mg.mL⁻¹. As alterações provocadas pelo extrato podem sugerir os possíveis mecanismos de ação a serem explorados para aplicação clínica, sendo elucidados através da continuidade dos estudos.

EFFECT OF HYDROALCOLIC EXTRACT OF *Polygonum hydropiperoides* IN SPERMATIC CELLS OF *Sus scrofa domesticus*

ABSTRACT

Polygonum hydropiperoides is one of the plants used as medicinal and has biological activities confirmed depending on the chemical composition. In this way, studies on the toxicity and interaction of this plant with the cells are necessary, being spermatozoa an innovative option for the evaluation. Thus, the objective of the study was to determine the chemical composition of the hydroalcoholic extract of *P. hydropiperoides* (PH) and the toxicity in sperm cells. For the determination of the chemical composition of the extract, the ultra-high performance liquid chromatographic analysis was used. Toxicity was assessed through computerized analysis of sperm motility of domestic swine semen, while cellular changes were analyzed by flow cytometry. A total of 17 phenolic compounds were identified in the plant extract, with emphasis quinic acid and quercetin. The parameters evaluated did not change significantly from 1.5 to 6.2 mg.mL⁻¹ regardless of the time of exposure to the extract, and the reduction of the parameters occurred progressively to increase the concentrations (6.2 mg.mL⁻¹ ≤ 12 mg.mL⁻¹ ≤ 50 mg.mL⁻¹ ≤ 100 mg.mL⁻¹). Through flow cytometry it can be observed that at the cellular structure level, no significant changes were observed. The hydroalcoholic extract of *P. hydropiperoides*, rich in quinic acid and quercetin, only resulted in changes in sperm motility, from 12 mg.mL⁻¹. The alterations caused by the extract may suggest the possible mechanisms of action to be explored for clinical application.

Keywords: Flow cytometry. CASA. Toxicity. Motility. Plants.

EFFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCÓOLICO DE *Polygonum hydropiperoides* EN CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Sus scrofa domesticus*

RESUMEN

Polygonum hydropiperoides es una de las plantas utilizadas como medicinal y que presenta actividades biológicas confirmadas en la dependencia de la composición química. De esta forma, estudios sobre la toxicidad e interacción de esta planta con las células son necesarios, siendo los espermatozoides una opción innovadora para la evaluación. Así, el objetivo del estudio fue determinar la composición química del extracto hidroalcohólico de *P. hydropiperoides* (PH) y la toxicidad en células espermáticas. Para la determinación de la composición química del extracto se utilizó el análisis cromatográfico líquido de ultra eficiencia. La toxicidad fue evaluada a través del análisis computarizado de la motilidad espermática de semen porcino doméstico (*Sus scrofa domesticus*), mientras que las alteraciones celulares fueron analizadas por citometría de flujo. Se identificaron en el extracto vegetal un total de 17 compuestos fenólicos destacándose el ácido quínico y la quercetina.

Los parámetros evaluados no sufrieron cambios significativos en las concentraciones de 1,5 a 6,2 mg.mL⁻¹ independientemente del tiempo de exposición al extracto, siendo que la reducción de los parámetros ocurrió de forma progresiva al aumento de las concentraciones (6,2 mg.mL⁻¹ ≤ 12 mg.mL⁻¹ ≤ 50 mg.mL⁻¹ ≤ 100 mg.mL⁻¹). A través de la citometría de flujo se puede observar que a nivel de estructura celular, no se observaron cambios significativos. El extracto hidroalcoólico de *P. hydropiperoides*, abundante en ácido quínico y quercetina, acarreó sólo cambios en la motilidad espermática a partir de 12 mg.mL⁻¹. Las alteraciones provocadas por el extracto pueden sugerir los posibles mecanismos de acción a ser explorados para aplicación clínica.

Palabras clave: Citometría de flujo. CASA. Toxicidad. Motilidad. Plantas.

REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, B.; HOLMAN, R. T. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, n. 3, p. 431-437, 1969.
- ALLAI, L.; DRUART, X.; ÖZTÜRK, M.; et al. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 175, p. 1-9, 2016.
- AM-IN, N.; KIRKWOOD, R. N.; TECHAKUMPHUA, M.; et al. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 897-903, 2011.
- ANDERSON, D.; BASARAN, N.; DOBRZYŃSKA, M. M.; et al. Modulating effects of flavonoids on food mutagens in human blood and sperm samples in the comet assay. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 45-58, 1997.
- ANDERSSON, M. C.; MIKKOLA, R.; KOTIAHO, M.; et al. Boar spermatozoa as a tool in toxicological research, a novel application for extended boar semen commercially produced by AI stations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 303-303, 2006.
- ANDERSSON, M. A.; MIKKOLA, R.; RASIMUS, S.; et al. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosol. **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 7, p. 2041-2052, 2010.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; et al. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 141-148, 2007.

BIANCHI, N. R.; SILVA, M. O.; SPIASSI, L.; et al. Ensaio de toxicidade excessiva e “screening” fitoquímico de plantas usadas popularmente no tratamento de afecções gastro-intestinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p. 50-51, 1993.

BORGES, C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J. P.; GAVILANES, M. L. Plantas palustres e aquáticas que se comportam como invasoras, no estado de Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 2, n. 1, p. 255-265, 2012.

BRASIL. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, 2009a. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: 21 jan. 2017.

BRASIL. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, 2009b. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso em 01 dez. 2016.

BUCAK, M. N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 73, n. 1-3, p. 103-108, 2007.

BUSSMANN, R. W.; MALCA-GARCÍA, G.; GLENN, A.; et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 101-108, 2010.

BUSSMANN, R. W.; SHARON, D.; PEREZ F. A.; et al. Antibacterial activity of northern-peruvian medicinal plants. **Arndoa**, v. 15, n. 1, p. 127-148, 2008.

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**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CONTRI, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D.; et al. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 4, p. 252-259, 2013.

CUNHA, F. A. B.; WACZUK, E. P.; DUARTE, A. E.; et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614-621, 2016.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 379-386, 1992.

DE LAMIRANDE E.; TSAI, C.; HAKAKAT, A.; et al. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultra filtrates. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 585-594, 1998.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A. F.; et al. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogenperoxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 393-403, 2010.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. **Methods in Cell Biology**, v. 42, p. 159-176, 1994.

FERNANDEZ-GAGO, R.; DOMINGUEZ, J. C.; MARTINEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 400-410, 2013.

FREIXA, B.; VILA, R.; VARGAS, L.; et al. Screening for antifungal activity of nineteen latin american plants. **Phytotherapy research**, v. 12, n. 6, p. 427-430, 1998.

HOORNSTRA, D.; ANDERSSON, M. A.; MIKKOLA, R.; et al. A new method for *in vitro* detection of microbially produced mitochondrial toxins. **Toxicology In Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 745-751, 2003.

JÄÄSKELÄINEN, E. L.; TEPLOVA, V.; ANDERSSON, M. A.; et al. *In vitro* assay for human toxicity of cereulide, the emetic toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. **Toxicology In Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 737-744, 2003.

JAMALAN, M.; GHAFARI, M. A.; HOSEINZADEH, P.; et al. Human sperm quality and metal toxicants: Protective effects of some flavonoids on male reproductive function. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.10, n.2, p.215-222, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 512p.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MARTINEZ-ALBORCIA, M. J.; MORRELL, J. M.; GIL, M. A.; et al. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 3-4, p. 173-179, 2012.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; et al. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1165-1172, 2010.

MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. **Cell Preservation Technology**, v. 1, n. 3, p. 165-174, 2003.

MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Effect of Quercetin on Capacitation Status and Lipid Peroxidation of Stallion Spermatozoa. **Cell Preservation Technology**, v. 4, n. 3, p. 169-177, 2006.

MILLER, R. R.; SHEFFER, C. J.; CORNETT, C. L.; et al. Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 137-148, 2004.

NISHIGAKI, T.; JOSÉ, O.; GONZÁLEZ-COTA, A. L.; et al. Intracellular pH in sperm physiology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 3, p. 1149-1158, 2014.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; GRAHAM, J.K. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 461-472, 1999.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 569-575, 2003.

PURDY, P. H.; ERICSSON, S. A.; DODSON, R. E.; et al. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. **Small Ruminant Research**, v. 55, n. 1-3, p. 239-243, 2004.

SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G. A. P.; BACHTIGAL, G. F.; et al. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. Embrapa Clima Temperado, Comunicado Técnico n. 190, p. 1-4, 2008.

SENGH, Y.; ÅKESSON, C.; HOLMGREN, K.; et al. An active ingredient of Cat's Claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 577-584, 2005.

SENGH, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R. W. Enhanced DNA repair immune function and reduced toxicity of C-MED100TM, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p. 115-126, 2000.

SERAGENT, O.; PEREIRA, M.; BELHOMME, C.; et al. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 104-111, 2005.

SEVERIN, I.; DAHBI, L.; LHUGUENOT, J. C.; et al. Safety assessment of foodcontact paper and board using a battery of short term toxicity tests: European Union Biosafepaper Project. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 10, p. 1032-1041, 2005.

- SHEHAB, N. G.; ABU-GHARBIEH, E. Phenolic Profiling and Evaluation of Contraceptive Effect of the Ethanolic Extract of *Salsola imbricata* Forssk. In Male Albino Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- SIERRA-VALDEZ, F. J.; FORERO-QUINTERO, L. S.; ZAPATA-MORIN, P. A.; et al. The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-6, 2013.
- SILVA, C. M. B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; et al. Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 241-251, 2013.
- SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; et al. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1722-1726, 2012.
- SILVA, E. F.; VARELA-JUNIOR, A. S.; CARDOSO, T.F.; et al. Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. **Toxicology In Vitro**, v. 35, p. 31-35, 2016.
- ST-PIERRE, M.; MOREAU, G. Résistance et viabilité des gamètes d'Omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, à différents pH. **Hydrobiologia**, v. 153, n. 2, p. 139-148, 1987.
- TAITZOGLOU, I. A.; TSANTARLIOTOU, M.; ZERVOS, I.; et al. Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid *in vitro*. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 131-137, 2001.
- UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, n. 4, p. 275-287, 1998.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 1, p. 1-6, 1998.
- ZHOU, J.; CHEN, L.; LI, J. et al. The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-15, 2015.
- ZRIBI, N.; CHAKROUN, N. F.; ABDALLAH, F. B.; et al. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 326-331, 2012.
- ZÖLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2013.

Autor para correspondência:

Claudia Giordani.

*Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus Universitário S/N, Capão do Leão (RS),
CEP 96010-900, Brasil.*

claarte@hotmail.com

4 Considerações Finais

Através desta pesquisa, pode-se identificar extratos vegetais com atividade antifúngica e antibacteriana, com destaque para os extratos hidroalcóolicos de *Schinus terebinthifolius* (ST), *Eugenia uniflora* (EU) e *Polygonum hydropiperoides* (PH), com atividade em isolados resistentes aos fármacos rotineiramente utilizados.

Na avaliação química foram identificados principalmente compostos fenólicos, flavonoides e ácidos orgânicos, com destaque para o etil galato, quercetina, ácido gálico, ácido elágico, miricitrina e ácido quínico. Em relação a toxicidade *in vitro*, houve a presença de citotoxicidade nas concentrações mais altas, principalmente nos extratos de *E. uniflora* e *S. terebinthifolius*.

No ensaio de toxicidade nas células espermáticas observou-se a redução na viabilidade celular e motilidade, reação no acrossoma, aumento da fluidez de membrana, redução no potencial de membrana mitocondrial em concentrações nos diferentes extratos.

Em concentrações $\leq 0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ os extratos de ST, EU e PH não ocasionaram hemaglutinação e hemólise, e na avaliação *in vivo*, nenhum destes extratos demonstraram sinal de embriotoxicidade.

Os extratos de *S. terebinthifolius*, *E. uniflora* e *P. hydropiperoides*, apresentaram-se promissores para a continuação dos estudos, com a possibilidade de isolamento de substâncias antimicrobianas e antioxidantes.

Referências

ABUELSAAD, A.S.A.; MOHAMED I, ALLAM G, AL-SOLUMAN AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. **Life Sciences**, v.93, p.714–722, 2013.

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reproductive Biomedicine Online**, v.9, n.3, p.338–347, 2004.

AGÜERO, M.B.; SVETAZ, L.; BARONI, V.; LIMA, B.; ZACCHINO, S.; SAAVEDRA, P.; WUNDERLIN, D.; FERESIN, G.E.; TAPIA, A. Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and *dermatophytes*. **Industrial Crops and Products**, v.57, p.166-173, 2014.

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.

AGRA M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.472-508, 2008.

AHLUWALIA, B.; HOLMAN, R.T. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.18, n.3, p.431–437, 1969.

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.30, n.1, p.41-50, 2011.

AITKEN, R.J.; KOPPERS, A.J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.36–42, 2011.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de

novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.678-689, 2006.

ALEIXO, A.A.; HERRERA, K.M.S.; RIBEIRO, R.I.M.A.; LIMA, L.A.R.S.; FERREIRA, J.M.S. Antibacterial activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) against bacteria of medical interest. **Revista Ceres**, v.60, n.5, p.731-734, 2013.

ALLAI, L.; DRUART, X.; ÖZTÜRK, M.; BENMOULA, A.; NASSER, B.; EL AMIRI, B. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.175, p.1–9, 2016.

ALVES, P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.222-224, 2009.

ALVES, C.T.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUE, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from north eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v.9, n.2, p.139-146, 2014.

ALVIM, N.A.T.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, I.E.; ALMEIDA FILHO, A.J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.14, n.3, p.316-323, 2006.

AM-IN, N.; KIRKWOOD, R.N.; TECHAKUMPHUA, M.; TANTASUPARUK, W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v.75, n.5, p.897–903, 2011.

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; DOBRZYŃSKA, M.M.; BASARAN, A.A.; YU, T. Modulating effects of flavonoids on food mutagens in human blood and sperm samples in the comet assay. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v.17, n.2, p.45–58, 1997.

ANDERSSON, M.A.; JAASKELAINEN, E.L.; SHAHEEN, R.; PIRHONEN, T.; WIJNANDS, L.M.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.2, p.175–183, 2004.

ANDERSSON, M.C.; MIKKOLA, R.; KOTIAHO, M.; HOORNSTRA, D.; ANDERSSON, M.A.; SALKINOJA- SALONEN, M. Boar spermatozoa as a tool in toxicological research, a novel application for extended boar semen commercially produced by AI stations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.4, p.303-303, 2006.

ANDERSSON, M.A.; MIKKOLA, R.; RASIMUS, S.; HOORNSTRA, D.; SALIN, P.; RAHKILA, R.; HEIKKINEN, M.; MATTILA, S.; PELTOLA, J.; KALSO, S.; SALKINOJA-SALONEN, M. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosol. **Toxicology In Vitro**, v.24, n.7, p.2041–2052, 2010.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388p.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-85, 2010.

APARICIO, R.M.; GARCÍA-CELMA, M.J.; VINARDELL, M.P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.5, p.1063-1067, 2005.

ARAÚJO, J.G.; ALVES, E.M.G.; BECHTLUFFT, M.P. Perfil de DNA plasmidial em bactérias resistentes a antibióticos isoladas do Ribeirão Paciência – Pará de Minas – MG. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, v.1, n.1, p.282-292, 2009.

ATES, A.; ILKIT, M.; OZDEMIR, R.; OZCAN, K. Dermatophytes isolated from asymptomatic dogs in Adana, Turkey: A preliminary study. **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, n.3, p.154-157, 2008.

BAGLA, V.P.; MCGAW, L.J.; ELGORASHI, E.E.; ELOFF, J.N. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n.383, p.1-6, 2014.

BALAO DA SILVA, C.M.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; GALLARDO BOLAÑOS, J.M.; PLAZA DÁVILA, M.; MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; APARICIO, I.M.; PEÑA, F.J. Sex sorting increases the

permeability of the membrane of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.138, n.3-4, p.241-251, 2013.

BALOGH, G.; HORVATH, I.; NAGY, E.; HOYK, Z.; BENKO, S.; BENSUADE, O.; VIGH, L. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. **Febs Journal**, v.272, n.23, p.6077–6086, 2005.

BANERJEE, K.; BANERJEE, S.; DAS, S.; MANDAL, M. Probing the potential of apigenin liposomes in enhancing bacterial membrane perturbation and integrity loss. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.453, p.48–59, 2015.

BARBOSA-FILHO, J.M.; NASCIMENTO JÚNIOR, F.A.; TOMAZ, A.C.A.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.141-8, 2007.

BARROS, L.O.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; SILVA, E.C.B.; CARNEIRO, G.F.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.430-438, 2013.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; JÚNIOR, A.F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.4, p.387-390, 2006.

BIANCHI, N.R.; SILVA, M.O.; SPIASSI, L.; MACHADO, C.A.; BERGONCI, J.I. Ensaio de toxicidade excessiva e “screening” fitoquímico de plantas usadas popularmente no tratamento de afecções gastro-intestinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.74, p.50-51, 1993.

BORBA-SANTOS, L.P.; GAGINI, T.; ISHIDA, K.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with *in vitro* low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, n.4, p.415–422, 2015.

BORGES, C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.303-314, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J.P.; GAVILANES, M.L. Plantas palustres e aquáticas que se comportam como invasoras, no estado de Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v.2, n.1, p.255-265, 1989.

BRASIL. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf> Acesso em: 21 dez. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. Diário Oficial da União, n.87, 9 de maio de 2011, seção 1, p.39- 41. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf> . Acesso em: 15 dez. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BUCAK, M.N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. **Small Ruminant Research**, v.73, n.1-3, p.103–108, 2007.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**, v.152, n.1, p.73-84, 2004.

BUSSMANN, R.W.; SHARON, D.; PEREZ F.A.; DÍAZ D.P.; FORD, T.; RASHEED, T.; BAROCIO, Y.; SILVA, R. Antibacterial activity of northern-peruvian medicinal plants. **Arnaldoa**, v.15, p.127-148, 2008.

BUSSMANN, R.W.; MALCA-GARCÍA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; CHAIT, G.; DÍAZ, D.; POURMAND, K.; JONAT, B.; SOMOGY, S.; GUARDADO, G.; AGUIRRE, C.; CHAN, R.; MEYER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A.; EFFIO-CARBAJAL, J.; FRÍAS-FERNANDEZ, F.; BENITO, M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, n.1, p.101-108, 2010.

BUSSMANN, R.W.; MALCA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; NILSEN, B.; PARRIS, B.; DUBOSE, D.; RUIZ, D.; SALEDA, J.; MARTINEZ, M.; CARILLO, L.; WALKER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.121–140, 2011.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURTA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.158-169, 2013.

CAZARIN, K.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n. 3, p.289-298, 2004.

CESÁRIO, L.F.; GAGLIANONE, M.C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botanica Brasilica**, v.22 n.3, p.828-833, 2008.

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**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

ÇERIBASI, A.O.; SAKIN, F.; TÜRK, G.; SONMEZ, M.; ATESSAHIN, A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. **Experimental and Toxicology Pathology**, v.64, n.7-8, p.717–724, 2012.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia Brasileiro de Boas Práticas de Eutanásia em Animais** – Conceitos e procedimentos recomendados. Brasília: CFMV; 2012. 62p.

CHANG, H.J.; MILLER, H.L.; WATKINS, N.; ARDUINO, M.J.; ASHFORD, D.A.; MIDGLEY, G.; AGUERO, S.M.; PINTO-POWELL, R. VON REYN, F.; EDWARDS W.; MCNEIL, M.M.; JARVIS, W.R.; PRUITT, R. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **New England Journal of Medicine**, v.338, n.11, p.706-711, 1998.

CIFTCI, O.; OZDEMIR, I.; AYDIN, M.; BEYTUR, A. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. **Andrologia**, v.44, n.1, p.181-186, 2012.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; SALLIS, E.S.; ANTUNES, T.A.; MATTEI, A.; ROGRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.5, p.704-709, 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. **Reference Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A3 Guideline**. Approved Standard. 3.ed. 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi M38-A2 Guideline**. Approved Standard. 2.ed. 2008.

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07-A9**; Approved Standard. 9.ed. 2012.

CONTRI, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D.; VALORZ, C.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. **Animal Reproduction Science**, v.136, p.252-259, 2013.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.197, n.1, p.40-45, 1993.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Reproductive Physiology of Fishes**, v.76, n.1, p.240–279, 2010.

CRUZ, A.R.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.4, p.601-610, 2012.

CUEVA, C.; MINGO, S.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; BUSTOS, I.; REQUENA, T.; DEL CAMPO, R.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.54, n.6, p.557–563, 2012.

CUNHA, F.A.B.; WACZUK, E.P.; DUARTE, A.E.; BARROS, L.M.; ELEKOFEHINTI, O.O.; MATIAS, E.F.F.; DA COSTA, J.G.M.; SANMI, A.A.; BOLIGON, A.A.; DA ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O.; POSSER, T.; COUTINHO, H.D.M.; FRANCO, J.L.; KAMDEM, J.P. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.84, p.614–621, 2016.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v.13, n.5, p.379–386, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultra filtrates. **Journal of Andrology**, v.19, n.5, p.585–594, 1998.

DE VITA, D.; FRIGGERI, L.; D'AURIA, F.D.; PANDOLFI, F.; PICCOLI, F.; PANELLA, S.; PALAMARA, A.T.; SIMONETTI, G.; SCIPIONE, L.; DI SANTO, R.; COSTI, R.; TORTORELLA, S. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. **Bioorg Med Chem Lett**, v.24, n.6, p.1502-1505, 2014.

DI SANTO, M.; TAROZZI, N.; NADALINI, M.; BORINI, A. Human sperm cryopreservation: update on techniques. Effect on DNA integrity, and implications for ART. **Advances in Urology**, p.1–12, 2012.

DÍAZ-GÓMEZ, R.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; OBREQUE-SLIER, E.; TOLEDO-ARAYA, H. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, n.2, p.331-335, 2013.

DINESH KUMAR, V.; VERMA, P.R.P.; SINGH, S.K. Morphological and *in vitro* antibacterial efficacy of quercetin loaded nanoparticles against food-borne microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**, v.66, p.638-650, 2016.

DINIZ-SILVA, H.T.; MAGNANI, M.; DE SIQUEIRA, S.; DE SOUZA, E.L.; DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses *norA*. **LWT - Food Science and Technology**, p.1-3, 2016.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogenperoxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, n.3, p.393-403, 2011.

DRESCH, R.R.; HAESER, A.S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; VOZÁRI-HAMPE, M.M.; HENRIQUES, A.T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.16-22, 2015.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência**. v.7, p.1-16, 2006.

EL SEMARY, N.A. The antimicrobial profile of extracts of a Phormidium-like cyanobacterium changes with phosphate levels. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.2, p.585–593, 2012.

EUMKEBA, G.; SAKDARATB, S.; SIRIWONG, S. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. **Phytomedicine**, v.18, n.1, p.40–45, 2010.

ESCANDÓN, R.A.; DEL CAMPO, M.; LÓPEZ-SOLIS, R.; OBREQUE-SLIER, E.; TOLEDO, H. Antibacterial effect of kaempferol and (–)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. **European Food Research and Technology**, v.242, n.9, p.1495–1502, 2016.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. **Methods in Cell Biology**, v.42, p.159-176, 1994.

EYER, P.; HESTLE, H.; KIESE, M.; KLEIN, G. Kinetics of ferrihaemoglobin formation by some reducing agents and the role of hydrogen peroxide. **Molecular Pharmacology**, v.11, n.3, p.326-334, 1975.

FARIA, N.C.G.; KIM, J.H.; GONÇALVES, L.A.P.; MARTINS, M.L.; CHAN, K.L.; CAMPBELL, B.C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.52, n.5, p.506-513, 2011.

FERA, M.T.; LA CAMERA, E.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance. **Expert Review of Anti-Infective Thereray**, v.7, n.8, p.981-998, 2009.

FERNANDES, C.P.; FÉLIX, S.R.; NOBRE, M.O. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: Uma revisão. **Semina**, v.37, n.1, p.83-96, 2016.

FERNANDEZ-GAGO, R.; DOMINGUEZ, J.C.; MARTINEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v.80, n.4, p.400-410, 2013.

FIGHERA, R.A. Anemia hemolítica em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, supl.2, p.264-266, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.480, n.6809, p.239-247, 2000.

FIÚZA, T.S.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; PIMENTA, F.C. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.3, p.245-250, 2008.

FREIRES, I.A.; ALVES, L.A.; JOVITO, V.C.; ALMEIDA, L.F.D.; CASTRO, R.D.; PADILHA, W.W.N. Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras de biofilme dentário. **Odontologia Clínico-Científica**, v.9, n.2, p.139-143, 2010.

FREIXA, B.; VILA, R.; VARGAS, L.; LOZANO, N.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Screening for antifungal activity of nineteen latin american plants. **Phytotherapy Research**, v.12, n.6, p.427-430, 1998.

FRITZSCHE, M.; MANDENIUS C. Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, n.1, p.181-191, 2010.

FUJISAWA, S.; KADOMA Y. A Calorimetric Study on the Interaction of Phenol Derivatives with Phospholipid Liposomes as a Model for Biological Membranes. **Dental Materials Journal**, v.5, n.1, p.1-9, 1986.

FURTADO, G.; PERDIZ, L.; ONITA, J.; WEY, S.; MEDEIROS, E. Correlation between rates of carbapenem consumption and the prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in Brazil: a 4-year study. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.31, n.6, p.664–666, 2010.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n.2, p.90-98, 2009.

GERTZ, M.A. Management of cold haemolytic syndrome. **British Journal of Haematology**, v.138, n.4, p.422–429, 2007.

GIORDANI, C. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente a *Malassezia pachydermatis***. 2013. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

GLIOZZI, T.M.; ZANIBONI, L.; CEROLINI, S. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v.75, n.9, p.1613–1622, 2011.

GOMES; F.S.; PROCÓPIO, T.F.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, n.3, p.672-679, 2012.

GOTTLIEB, E.; ARMOUR, S.M.; HARRIS, M.H.; THOMPSON, C.B. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v.10, p.709–717, 2003.

GREEN, C.L.; BROWN, L.; STEWART, J.J.; XU, Y.; LITWIN, V.; MC CLOSKEY, T.W. Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug

development: I instrumentation. **Journal of Immunological Methods**, v.363, n.2, p.104–119, 2011.

GREER, G.G.; DILTS, B.D. Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.141–151, 1995.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.2, p.321-332, 2004.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 268p.

GUPTA, A.K.; FOLEY, K.A.; VERSTEEG, S.G. New antifungal agents and new formulations against dermatophytes. **Mycopathologia**, v.182, n.1-2, p.127-141, 2017.

GUTERRES, K.A.; MATOS, C.B.; OSÓRIO, L.G.; SCHUCH, I.D.; CLEFF, M.B. The use of (1-3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. **Mycopathologia**, v.177, n.3-4, p.217-221, 2014.

HÄGERSTRAND, H.; ISOMAA, B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. **Chemico-Biological Interactions**, v.79, n.3, p.335-347, 1991.

HARICH, M.; MAHERANI, B.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antibacterial activity of cranberry juice concentrate on freshness and sensory quality of ready to eat (RTE) foods. **Food Control**, v.75, p.134-144, 2017.

HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: Uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.157-168, 2012.

HASSAN, A.M.; ABDEL-AZIEM, S.H.; EL-NEKEETY, A.A.; ABDEL-WAHAB, M.A. *Panax ginseng* extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1. **Cytotechnology**, v.67, n.5, p.861-871, 2015.

HOFFMANN, J.F.; ZANDONÁ, G.P.; SANTOS, P.S.; DALLMANN, C.M.; MADRUGA, F.B.; ROMBALDI, C.V.; CHAVES, F.C. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, v.237, p.638-644, 2017.

HOORNSTRA, D.; ANDERSSON, M.A.; MIKKOLA, R.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. A new method for *in vitro* detection of microbially produced mitochondrial toxins. **Toxicology In Vitro**, v.17, n.5-6, p.745–751, 2003.

HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSONA, A.; WALLGRENA, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A.P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.3, p.406-419, 2011.

HOSSAIN, M.Z.; GILBERT, S.F.; PATEL, K.; GHOSH, S.; BHUNIA, A.K.; KERN, S.E. Biological clues to potent DNA-damaging activities in food and flavoring. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.557–567, 2013.

HUDSON, M.M.T. Antifungal resistance and over-the-counter availability in the UK: A current perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, n.3, p.345-350, 2001.

INOUE, S.; TAKAHASHI, M.; ABE, S. Composition, antifungal and radical scavenging activities of 4 propolis. **Medical Mycology Journal**, v.52, n.4, p.305-313, 2011.

ISHII, J.B.; FREITAS, J.C.; ARIAS, M.V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.6, p.533-537, 2011.

JÄÄSKELÄINEN, E.L.; TEPLOVA, V.; ANDERSSON, M.A.; ANDERSSON, L.C.; TAMMELA, P.; ANDERSSON, M.C.; PIRHONEN, T.I.; SARIS, N.E.; VUORELA, P.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. *In vitro* assay for human toxicity of cereulide, the emetic toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. **Toxicology In Vitro**, v.17, n.5-6, 737–744, 2003.

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 Farmacognosia**, v.14, n.1, p.21-27, 2004.

JAMALAN, M.; GHAFARI, M.A.; HOSEINZADEH, P.; HASHEMITABAR, M.; ZEINALI, M. Human sperm quality and metal toxicants: Protective effects of some flavonoids on male reproductive function. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.10, n.2, p.215-222, 2016.

JELLAD, S.; KAMOUN, S.; MEHDI, M.; ZAKRI, S.; TRABELSI, M.; SAAD, A.; AJINA, M. Sperm immobilizing effect of leaves extracts of *Cestrum parqui*. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v.40, n.3, p.211-215, 2011.

JESUS, F.P.K.; LAUTERT, C.; ZANETTE, R.A.; MAHL, D.L.; MACHADO, M.L.S.; DUTRA, V.; BOTTON, S.A.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Veterinary Microbiology**, v.152, n.1-2, p.161-164, 2011.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M.G.; DONNICI, C.L.; RESENDE, M.A. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.632-637, 2007.

KARAR, M.G.E.; PLETZER, D.; JAISWAL, R.; WEINGART, H.; KUHNERT, N. Identification, characterization, isolation and activity against *Escherichia coli* of quince (*Cydonia oblonga*) fruit polyphenols. **Food Research International**, v.65, p.121–129, 2014.

KASAI, T.; OGAWA, K.; MIZUNO, K.; NAGAI, S.; UCHIDA, Y.; OHTA, S.; FUJIE, M.; SUZUKI, K.; HIRATA, S.; HOSHI, K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. **Asian Journal of Andrology**, v.4, n.2, p.97–103, 2002.

KENNY, O.; T.J. SMYTH, D. WALSH, C.T. KELLEHER, C.M. HEWAGE, N.P. BRUNTON. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. **Food Chemistry**, 161, n.15, p.79–86, 2014.

KONDO, K.; TAKAISHI, Y.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T. ILSMRs (intensifier of β -lactam-susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) from Tara [*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze]. **Phytomedicine**, v.13, p.209–212, 2006.

KRISTIÁN, T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. **Cell Calcium**, v.36, n.3-4, p.221–233, 2004.

LANG, V.; MARJUKI, H.; KRAUSS, S.L.; WEBBY, R.J.; WEBSTER, R.G. Different incubation temperatures affect viral polymerase activity and yields of low-pathogenic avian influenza viroses in embryonated chicken eggs. **Archives of Virology**, v.156, n.6, p.987–994, 2011.

LARA, V.M.; DONADELI, M.P.; CRUZ, F.S.F.; CARREGARO, A.B. Multirresistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cadelas com piometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.4, p.1032-1034, 2008.

LEE, H.; AHN, J.; KWON, A.; LEE, E.S.; KWAK, J.; MIN, Y. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of apricot seed. **Phytotherapy Research**, v.28, n.12, p.1867–1872, 2014.

LEMUS, J.A.; BLANCO, G.; ARROYO, B.; MARTÍNEZ, F.; GRANDE, J. Fatal embryo chondral damage associated with fluoroquinolones in eggs of threatened avian scavengers. **Environmental Pollution**, v.157, n.8-9, p.2421–2427, 2009.

LENZI, M.; ORTH, A.I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v.17, n.2, p.67-89, 2004.

LENZI, M.; ORTH, A.I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.2, p.198-201, 2004.

LI, P.; HULAK, M.; LINHART, O. Spermproteins in teleostean and chondrosteian (sturgeon) fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, n.4, p.567–581, 2009.

LI, Z.; GUO, X.; DAWUTI, G.; AIBAI, S. Antifungal activity of ellagic acid *in vitro* and *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v.29, n.7, p.1019-1025, 2015.

LIMA, V.N.; OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.; SANTOS, E.S.; MORAIS, L.P.; TINTINO, S.R.; FREITAS, T.S.; GERALDO, Y.S.; PEREIRA, R.L.S.; CRUZ, R.P.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v.99, p.56-61, 2016.

LISBOA-NETO, J.A.; MACHADO, J.L.; MELO JÚNIOR, E.J.M.; RAPOSO, M.J. Avaliação do efeito cicatrizante da Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e do mastruço

(*Chenopodium ambrosioides*) em feridas de extração dental em ratos: estudo histológico. **Revista ABO Nacional**, v.6, n.3, p.173-175, 1998.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v.1, p.387-396, 2006.

LIU, Z.; LI, Z., LIU, X. Effect of ginsenoside Re on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax gene after ischemia and reperfusion in rats. **J. Huazhong University of Science and Technology**, v.22, n.4, p.305–309, 2002.

LOBO, Raulene Rodrigues. **Padronização de técnicas de diagnóstico em virologia utilizando ovos embrionados de codorna como modelo biológico**. 2015. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LOPES, G.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Natural products: an alternative to conventional therapy for dermatophytosis? **Mycopathologia**, v.182, n.1-2, p.143-167, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

MA, Y.; MA, J.; YANG, T.; CHENG, W.; LU, Y.; CAO, Y.; WANG, J.; FENG, S. Components, antioxidant and antibacterial activity of tomato seed oil. **Food Science and Technology Research**, v.20, n.1, p.1-6, 2014.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Brock Biology of Microorganisms**. 13.ed. San Francisco: Pearson Education; 2012. 1032p.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MANRÍQUEZ-TORRES, J.J.; ZÚÑIGA-ESTRADA, A.; GONZÁLEZ-LEDESMA, M.; TORRES-VALENCIA, J.M. The antibacterial metabolites and proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. **Journal of Mexican Chemical Society**, v.51, n.4, p.228-231, 2007.

MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; MORRELL, J.M.; GIL, M.A.; BARRANCO, I.; MASIDE, C.; ALKMIN, D.V.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.140, n.3-4, p.173-179, 2012.

MARTINEZ-CORREA, H.A.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L.; PEIXOTO, C.A.; OLIVEIRA, A.L.; CABRAL, F.A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.55, n.3, p.998-1006, 2011.

MARTÍNEZ-HIDALGO, M.P.V. Alternativas a la experimentación animal em toxicología: situación actual. **Acta Bioethica**, v.13, n.1, p.42-52, 2007.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; ESTESO, M.C.; ANEL, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; DE PAZ, P.; GARDE, J.; ANEL, L. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. **Theriogenology**, v.66, n.5, p.1165–1172, 2006.

MASIKA, P.J.; SULTANA, N.; AFOLAYAN, A.J. Antibacterial Activity of Two Flavonoids Isolated from *Schotia latifolia*. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n.2, p.105–108, 2004.

MASSARO, C.F.; KATOULI, M.; GRKOVIC, T.; VUB, H.; QUINN, R.J.; HEARD, T.A.; CARVALHO, C.; MANLEY-HARRIS, M.; WALLACE, H.M.; BROOKS, P. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). **Fitoterapia**, v.95, p.247-257, 2014.

MAZUROVA, J.; KUKLA, R.; ROZKOT, M.; LUSTYKOVA, A.; SLEHOVA, E.; SLEHA, R.; LIPENSKY, J.; OPLETAL, L. Use of natural substances for boar semen decontamination. **Veterinarni Medicina**, v.60, n.5, p.235–247, 2015.

MCNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. **Cell Preservation Technology**, v.1, n.3, p.165-174, 2003.

MCNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. **Cell Preservation Technology**, v.4, n.3, p.169-177, 2006.

MEAMAR, M.; NASSIRA, Z.; CAMBI, M.; TAMBURRINO, L.; MARCHIANI, S.; FILIMBERTI, E.; FINO, M.G.; BIGGERI, A.; MENEZO, Y.; FORTI, G.; BALDI, E.; MURATORI, M. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. **Fertility and Sterility**, v.98, n.2, p.326-333, 2012.

MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H.F. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, v.23, n.6, p.955-962, 1985.

MILLER, R.R.; SHEFFER, C.J.; CORNETT, C.L.; MCCLEAN, R.; MACCALLUM, C.; JOHNSTON, S.D. Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. **Cryobiology**, v.49, n.2, p.137–148, 2004.

MOHAN, S.; THIAGARAJAN, K.; CHANDRASEKARAN, R.; ARUL, J. *In vitro* protection of biological macromolecules against oxidative stress and *in vivo* toxicity evaluation of *Acacia nilotica* (L.) and ethyl gallate in rats. **BMC Complementary Alternative and Medicine**, v.14, p.1-13, 2014.

MOHAN, A.; POHLMAN, F.W. Role of organic acids and peroxyacetic acid as antimicrobial intervention for controlling *Escherichia coli* O157:H7 on beef trimmings. **LWT - Food Science and Technology**, v.65, p.868–873, 2016.

MORAES, L.A.; PEREIRA, J.M.M.; SILVA, S.P.; MOREIRA, V.M.T.S.; CASSEB, A.R. Diagnóstico microbiológico e multirresistência bacteriana *in vitro* de otite externa de cães – comunicação curta. **Veterinária e Zootecnia**, v.21, n.1, p.98-101, 2014.

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

MOUNANGA, M.B.; MEWONO, L.; ANGONE, S.A. Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p.618-627, 2015.

MOURA-COSTA, G.F.; NOCCHI, S.R.; CEOLE, L.F.; DE MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; TEMPONI, L.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on na indigenous reserve in Rio

das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, n.2, p.631–638, 2012.

NAKAGAWA, K.; YAMANO, S.; KAMADA, M.; MAEGAWA, M.; TOKUMURA, A.; IRAHARA, M.; SAITO, H. Sperm-immobilizing antibodies suppress an increase in the plasma membrane fluidity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.83, p.1054-1058, 2004.

NAKAYAMA, T.; HASHIMOTO, T.; KAJIYA, K.; KUMAZAWA, S. Affinity of polyphenols for lipid bilayers. **BioFactors**, v.13, n.1-4, p.147–151, 2000.

NASCIMENTO, A.F.; CAMARA, C.A.; MORAES, M.M.; RAMOS, C.S. Essential oil composition and acaricidal activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil against *Tetranychus urticae*. **Natural Product Communications**, v.7, n.1, p.129-132, 2012.

NAZ, R.; SIDDIQI, R.; AHMAD, S.; RASOOL, S.A.; SAYEED, S.A. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.341-345, 2007.

NISHIGAKI, T.; JOSÉ, O.; GONZÁLEZ-COTA, A.L.; ROMERO, F.; TREVIÑO, C.L.; DARSZON, A. Intracellular pH in sperm physiology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.450, n.3, p.1149–1158, 2014.

NUNES, Cristina Freitas. **Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde contra o vírus da doença de Newcastle**. 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M.T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**, v.26, n.2, p.109-114, 2003.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development - Guidelines for the testing of chemicals. Section 4. Health effects. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788>. Acesso em: 18 nov 2017.

OGBUEWU, L.P.; ALADI, N.O.; ETUK, I.F.; OPARA, M.N.; UCHEGBU, I.C.; OKOLI, M.U. Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. **Research in Veterinary Science**, v.3, n.3, p.138-164, 2010.

OLIVEIRA, C.B.; SOARES, D.G.S.; PAULO, M.Q.; PADILHA, W.W.N. Atividade antimicrobiana *in vitro* da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre bactérias cariogênicas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.12, n.3, p.239-250, 2008.

OLIVEIRA, H.; SPANÒ, M.; SANTOS, C.; PEREIRA, M.L. Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice - Lead affects mice sperm motility and acrosome reaction. **Cell Biology and Toxicology**, v.25, p.341–353, 2009.

OLIVEIRA, M.M.; PAES, R.A.; MUNIZ, M.M.; GALHARDO, M.C.G.; OLIVEIRA, R.M.Z. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v.172, n.4, p.257-267, 2011.

OLIVEIRA, L.S.T.; SILVA, S.L.C.; TAVARES, D.C.; SANTOS, A.V. OLIVEIRA, G.C.B. Uso de plantas medicinais no tratamento de animais. **Centro Científico Conhecer – Enciclopédia Biosfera**, v.5, n.8, p.1-8, 2009.

ORHAN, D.D.; OZÇELIK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v.165, n.6, p.496-504, 2010.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GARCIA, B.M.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.; GONZALEZ-FERNANDES, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.393-403, 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; JOHANNISSON, A.; PEÑA, F.J.; TAPIA, J.A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; DALIN, A.M.; MORRELL, J.M. Effect of diferente extenders and seminal plasma on the suscetibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer centrifugation, through Androcoll-E. **J. Equine Veterinary Science**, v.31, p.411-416, 2011.

OYAGBEMI, A.A.; OMOBOWALE, T.O.; SABA, A.B.; ADEDARA, I.A.; OLOWU, E.R.; AKINRINDE, A.S.; DADA, R.O. Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. **Andrologia**, v.48, n.4, p.393–401, 2016.

ÖZÇELIK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v.49, n.4, p.396-402, 2011.

PANDO, S.C.; MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Biochemical characterization of a lectin from *Delonix regia* seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v.21, p.279-285, 2002.

PAOLI, D.; GALLO, M.; RIZZO, F.; BALDI, E.; FRANCAVILLA, S.; LENZI, A.; LOMBARDO, F.; GANDINI, L. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.95, n.7, p.2315-2319, 2011.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; GRAHAM, J.K. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v.51, n.2, p.461-472, 1999.

PASTORKOVA, E.; ZAKOVA, T.; LANDA, P.; NOVAKOVA, J.; VADLEJCH, J.; KOKOSKA, L. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.161, n.3, p.209-213, 2013.

PAULA, C.S.; CANTELI, V.C.D.; VERDAM, M.C.S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B.C.K.; MIGUEL, O.G.M.; MIGUEL, M.D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.189-195, 2014.

PEQUENO, N.F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.1, p.45-48, 2006.

PEREIRA, L.C.; DE SOUZA, A.O.; PAZIN, M.; DORTA, D.J. Mitocôndria como Alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.25, n.1-2, p.1-14, 2012.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R.G.; EVANS, C.S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v.63, n.5, p. 569-575, 2003.

PURDY, P.H.; ERICSSON, S.A.; DODSON, R.E.; STERNES, K.L.; GARNER, D.L. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. **Small Ruminant Research**, v.55, n.1-3, p.239-243, 2004.

QUEIROZ, G.M.; POLITI, F.A.S.; RODRIGUES, E.R.; SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; CARDOSO, C.R.P.; SANTOS, L.C.; PIETRO, R.C.L.R. Phytochemical characterization, antimicrobial activity, and antioxidant potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) extracts. **Journal of Medicinal Food**, v.18, n.7, p.1–5, 2015.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CATER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. 512p.

RANGKADILOK, N.; TONGCHUSAK, S.; BOONHOK, R.; CHAIYAROJ, S.C.; JUNYAPRASERT, V.B.; BUAJEEB, W.; AKANIMANEE, J.; RAKSASUK, T.; SUDDHASTHIRA, T.; SATAYAVIVAD, J. *In vitro* antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. **Fitoterapia**, v.83, n.3, p.545–553, 2012.

RAO, A.; ZHANG, Y.Q.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.12, p.5062-5069, 2010.

RASHED, K.; ĆIRIĆ, A.; GLAMOĆLIJA, J.; SOKOVIĆ, M. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.210–215, 2014.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; WALLGREN, M. Advances in boar semen cryopreservation. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p.1-5, 2011.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Disease**, v.52, n.9, p.1138-1143, 2011.

ROTA, A.; BASTIANACCI, V.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Evaluation of plasma membrane integrity of donkey spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.228–232, 2010.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2007.

RUSSELL, A.D.; CHOPRA, I. **Understanding Antibacterial Action and Resistance**. 2.ed. London: Ellis Horwood; 1996. 231p.

RUSSELL, A.D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.5, p.750–763, 2003.

SADIGHARA, P.; AMOLI, J.S.; ASHRAFIHELAN, J.; AHESFAHANI, T.; FARKHONDEH, T. The developmental toxicity of cottonseed extraction on chicken embryo. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.21, n.3, p.560-563, 2011.

SALAZAR-ARANDA, R.; GRANADOS-GUZMÁN, G.; PÉREZ-MESEGUER, J.; GONZÁLEZ, G.M.; TORRES, N.W. Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. **Molecules**, v.20, n.10, p.17903-17912, 2015.

SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E.F.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.S.; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES, G.M.M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; DE ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v.131, n.1, p.130-132, 2012.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; SILVA, A.G.; LIMA, D.K.S.; SALLET, L.A.P.; TEIXEIRA, C.A.D.; FACUNDO, V.A. Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, p.757-762, 2013.

SANTOYO, S.; RODRÍGUEZ-MEIZOSO, I.; CIFUENTES, A.; JAIME, L.; GARCÍA-BLAIRSY, G.; REINA G.G.; SEÑORANS FJ, IBÁÑEZ E. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potente antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food and Science Technology**, v.42, n.7, p.1213–1218, 2009.

SAVITSKY, J.P.; DOCZI, J.; BLACK, J.; ARNOLD, J.D. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobina. **Clinical Pharmacology Therapy**, v.23, n.1, p.73-80, 1978.

SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; BACHTIGAL, G.F.; BAUER, M.V.L. **Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas**. Embrapa Clima Temperado, Comunicado Técnico 190, p.1-4, 2008.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.L.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P.C., REIS, R.S.; PEREZ, M.A.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases

(1998-2001). **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.224, n.10, p.1623-1629, 2004.

SENGH, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R.W. Enhanced DNA repair immune function and reduced toxicity of C-MED100TM, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, n.2, p.115–126, 2000.

SENGH, Y.; ÅKESSON, C.; HOLMGREN, K.; BRYNGELSSON, C.; GIAMAPA, V.; PERO, R.W. An active ingredient of Cat's Claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.577-584, 2005.

SERGEANT, O.; PEREIRA, M.; BELHOMME, C.; CHEVANNE, M.; HUC, L.; LAGADIC-GOSSMANN, D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, p.104–111, 2005.

SEVERIN, I.; DAHBI, L.; LHUGUENOT, J.C.; ANDERSSON, M.A.; HOORNSTRA, D.; SALKINOJA-SALONEN, M.S.; TURCO, L.; ZUCCO, F.; STAMMATI, A.L.; SAVOLAINEN, M.; WEBER, A.; HONKALAMPI-HÄMÄLÄINEN, U.; VON WRIGHT, A. Safety assessment of foodcontact paper and board using a battery of short term toxicity tests: European Union Biosafepaper Project. **Food Additives & Contaminants**, v.22, n.10, p.1032–1041, 2005.

SHAW, M.; BROWN, R.; MARTIN, A.G. Polypeptide Antibiotic 4205 from a Soil Bacillus. **Applied Microbiology**, v.14, n.1, p.79-85, 1966.

SHEHAB, N.G.; ABU-GHARBIEH, E. Phenolic Profiling and Evaluation of Contraceptive Effect of the Ethanolic Extract of *Salsola imbricata* Forssk. In Male Albino Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-8, 2014.

SHI, C.; ZHANG, X.; SUN, Y.; YANG, M.; SONG, K.; ZHENG, Z.; CHEN, Y.; LIU, X.; JIA, Z.; DONG, R.; CUI, L.; XIA, X. Antimicrobial Activity of Ferulic Acid Against *Cronobacter sakazakii* and Possible Mechanism of Action. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.13, n.4, p.196-204, 2016.

SHIGAPOVA, N.; TOROK, Z.; BALOGH, G.; GOLOUBINOFF, P.; VIGH, L.; HORVATH, I. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.328, p.1216–1223, 2005.

SIERRA-VALDEZ, F.J.; FORERO-QUINTERO, L.S.; ZAPATA-MORIN, P.A.; COSTAS, M.; CHAVEZ-REYES, A.; RUIZ-SUÁREZ, J.C. The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers. **PLOS ONE**, v.8, p.1-6, 2013.

SILLEY, P. Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? **Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)**, v.31, n.1, p.33-41, 2012.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, n.5, p.958 -978, 2006.

SILVA, F.M.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v.52, n.6, p.511–517, 2009.

SILVA, E.C.B.; CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, S.V.; SOARES, P.C.; GUERRA, M.M.P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v.77, n.8, p.1722-1726, 2012.

SILVA, C.R.; ANDRADE NETO, J.B.; CAMPOS, R.S.; FIGUEIREDO, N.S.; SAMPAIO, L.S.; MAGALHÃES, H.I.F.; CAVALCANTI, B.C.; GASPAR, D.M.; ANDRADE, G.M.; LIMA, I.S.P.; VIANA, G.S.B.; MORAES, M.O.; LOBO, M.D.P.; GRANGEIRO, T.B.; NOBRE JÚNIOR, H.V. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.58, n.3, p.1468-1478, 2014.

SILVA, E.F.; VARELA-JUNIOR, A.S.; CARDOSO, T.F.; STEFANELLO, F.M.; KALB, A.C.; MARTÍNEZ, P.E.; CORCINI, C.D. Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. **Toxicology In Vitro**, v.35, p.31–35, 2016.

SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETRVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ UFSC, 2004. 1102p.

SINGH, R.P.; SHAFEEQUE, C.M.; SHARMA, S.K.; PANDEY, N.K.; SINGH, R.; KOLLURI, J.M.G.; SAXENA, M.; SHARMA, B.; SASTRY, K.V.H.; KATARIA, J.M.; AZEEZ, P.A. Bisphenol a reduces fertilizing ability and motility by compromising mitochondrial function of sperm. **Environmental Toxicology and Chemical**, v.34, n.7, p.1617–1622, 2015.

SINGH, G.; KUMAR, P.; JOSHI, S.C. Treatment of dermatophytosis by a new antifungal agente 'apigenin'. **Mycoses**, v.57, n.8, p.497-506, 2014.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SOE, W.M.; LIN, R.T.P.; LIM, L.C.S.; SAKHARKAR, M. *In vitro* drug interactions of gallates with antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Bioscience**, v.2, n.2, p.668-672, 2010.

SOE, W.M.; MYINT, N.L.; SING, L.C.; SAKHARKAR, M.K.; TANG, T.H.; SAKHARKAR, K.R. Ethyl Gallate as a Combination Drug Can Overcome Resistance in MRSA. **Letters in Drug Desing & Discovery**, v.8, p.65-68, 2011.

SOUAD, K.; ALI, S.; MOUNIR, A.; MOUNIR, T.M. Spermicidal activity of extract from *Cestrum parqui*. **Contraception**, v.75, n.2, p.152–156, 2007.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.G.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L.M.; SILVA, M.R.R. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, p.247-249, 2002.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VEIRA-JÚNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SPELLBERG, B.; BLASER, M.; GUIDOS, R.J.; BOUCHER, H.W.; BRADLEY, J.S.; EISENSTEIN, B.I.; GERDING, D.; LYNFIELD, R. Combating antimicrobial resistance: Policy recommendations to save lives. **Clinical Infectious Disease**, v.52, p.397-428, 2011.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, P. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2008. 942p.

ST-PIERRE, M.; MOREAU, G. Résistance et viabilité des gamètes d'Omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, à différents pH. **Hydrobiologia**, v.153, n.2, p.139-148, 1987.

STOPPA, M.A.; CASEMIRO, L.A.; VINHOLIS, A.H.C.; CUNHAS, W.R.; ANDRADE E SILVA, M.L.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p.498-502, 2009.

STOPIGLIA, C.D.O.; MAGAGNIN, C.M.; CASTRILLÓN, M.R.; MENDES, S.D.C.; HEIDRICH, D.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M.L. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Micology**, v.52, n.1, p.56-64, 2014.

SURESH BABU, K.; BABU, T.H.; SRINIVAS, P.V.; KISHORE, K.H.; MURTHY, U.S.N.; RAO, J.M. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, n.1, p.221–224, 2006.

TAITZOGLOU, I.A.; TSANTARLIOTOU, M.; ZERVOS, I.; KOURETAS, D.; KOKOLIS, N.A. Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid *in vitro*. **Reproduction**, v.121, p.131–137, 2001.

TECHER, D.; MILLA, S.; FONTAINE, P.; VIOT, S.; THOMAS, M. Influence of waterborne gallic and pelargonic acid exposures on biochemical and reproductive parameters in the Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, v.32, p.227-240, 2015.

TEFFO, L.S.; ADEROGBA, M.A.; ELOFF, J.N. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **South African Journal of Botany**, v.76, n.1, p.25–29, 2010.

TEODORO, G.R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C.J.; KOGA-ITO, C.Y. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: A review. **Frontiers Microbiology**, v.6, n.1420, p.1-11, 2015.

TIWARI, B.K.; VALDRAMIDIS, V.P.; O'DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P.J. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.14, p.5987–6000, 2009.

TÜLAY, A.C. Potential genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. In: **A Compendium of Essays on Alternative Therapy**. Intech. 2012. p.233-250.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v.42, n.2, p.289-306, 2006.

ULIANA, M.P.; FRONZA, M.; SILVA, A.G.D.; VARGAS, T.S.; ANDRADE, T.U.D.; SCHERER, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v.83, p.235–240, 2016.

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D.M.; VISHWANATH, R.; SMITH, J.F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v.51, n.4, p.275-287, 1998.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & cell biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

VATTEN, D.A.; LIN, Y.T.; LABBE, R.G.; SHETTY, K. Antimicrobial activity against selected foodborne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v.39, n.12, p.1939-1946, 2004.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2005.

VICENTE-CARRILLO, A.; EDEBERT, I.; GARSIDE, H.; COTGREAVE, I.; RIGLER, R.; LOITTO, V.; MAGNUSSON, K.E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles. **Toxicology In Vitro**, v.29, n.3, p.582-591, 2015.

VILA, R.; MUNDINA, M.; TOMI, F.; FURLÁN, R.; ZACCHINO, S.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. **Planta Medica**, v.68, n.2, p.164-167, 2002.

VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, n.1, p.1-6, 1998.

ZHAN, P.; LIU, W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. **Mycopathologia**, v.182, n.1-2, p.77-86, 2017.

WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; FERRAZ, V.; PICOLI, T.; CLEFF, M.B.; FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Cytotoxicity and anti-Sporothrix brasiliensis activity of the *Origanum majorana* Linn. Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.4, p.896-901, 2016.

WERCKENTHIN, C.; CARDOSO, M.; MARTEL, J.L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Reserach**, v.32, n.3-4, p.341-62, 2001.

WHITE, P.D. Medical management of chronic otitis in dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v.21, n.8, p.716-727, 1999.

WISWEDEL, I.; GARDEMANN, A.; STORCH, A.; SCHILD, L. Degradation of phospholipids by oxidative stress - Exceptional significance of cardiolipin. **Free Radical Research**, v.44, n.2, p.135-145, 2010.

WHO. World Health Organization. **Report on infectious diseases**. Geneva: WHO, 2002.

WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. France: WHO, 2014. Disponível em: <http://who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf?ua=1> Acesso em: 20 dez 2016.

WU, T.; ZANG, X.; HE, M.; PAN, S.; XU, X. Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.34, p.8185-8190, 2013.

YAMAWAKI, R.A.; MILBRADT, E.L.; COPPOLA, M.P.; RODRIGUES, J.C.Z.; ANDREATTI FILHO, R.L.; PADOVANI, C.R.; OKAMOTO, A.S. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the

prevention of *Salmonella enteritidis* after hatch. **Poultry Science**, v.92, n.6, p.1560–1563, 2013.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, n.4, p.555–559, 1999.

ZHOU, J.; CHEN, L.; LI, J.; LI, H.; HONG, X.; XIE, M.; CHEN, S.; YAO, B. The semen pH affects sperm motility and capacitation. **PLOS ONE**, v.10, p.1-15, 2015.

ZÖLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n.1, p.1-21, 2013.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N.F.; ABDALLAH, F.B.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F.; KESKES, L.A. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v.65, p.326-331, 2012.

Anexos

Anexo I – Documento da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 26 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profa. Marlete Brum Cleff

Departamento de Clínicas Veterinárias – Faculdade de Veterinária

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Testes com modelos alternativos na avaliação de toxicidade de extratos vegetais**”, processo nº23110.007044/2015-11, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 7044-2015).

Vigência do Projeto: 26/11/2015 a 06/03/2019

Espécie/Linhagem: *Canis lupus familiaris* e *Coturnix coturnix japonica*

Nº de animais: 01 canino e 325 ovos embrionados

Idade: Adulto (cão) e embriões

Sexo: Machos e fêmeas

Origem: Hospital de Clínicas Veterinárias – UFPeI (cão) e Granja Fujikura, Suzano-SP

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:

Ciente em: 01/12/2015

Anexo II – Documento da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Sub área-

5.05.04 00-2



Pelotas, 22 de março de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professora Carine Dahl Corcini

Faculdade de Veterinária

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “Efeitos da adição de extrato natural em diluente para a criopreservação de sêmen de mamíferos”, processo nº23110.001946/2012-93, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 1946).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 26/03/2012

Assinatura da Professora Responsável: