

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E QUÍMICA

CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

ALINE FÉBOLI

ESTUDOS *IN VITRO* SOBRE A ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE LIGNANAS
EXTRAÍDAS DA *PIPER CUBEBA* E *IN SÍLICO* COM AS PROTEÍNAS β -TUBULINA E
FOSFOETANOLAMINA METIL TRANSFERASE DO *HAEMONCHUS CONTORTUS*.

Ilha Solteira

2020

ALINE FÉBOLI

ESTUDOS *IN VITRO* SOBRE A ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE LIGNANAS
EXTRAÍDAS DA *PIPER CUBEBA* E *IN SÍLICO* COM AS PROTEÍNAS β -TUBULINA E
FOSFOETANOLAMINA METIL TRANSFERASE DO *HAEMONCHUS CONTORTUS*.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia
do Câmpus de Ilha Solteira – UNESP como parte do requisito
para obtenção do título de doutora em Ciência dos Materiais.
Área de concentração: Química dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela da Silva de Laurentiz,
Coorientador: Dr. Alexandre Borges.

Ilha Solteira

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

F289e Féboli, Aline.
Estudos *in vitro* sobre a atividade anti-helmíntica de lignanas extraídas da piper cubeba e *in silico* com as proteínas β -tubulina e fosfoetanolamina metil transferase do *haemonchus contortus* / Aline Féboli. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2020
81 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais, 2020

Orientador: Rosangela da Silva de Laurentiz

Coorientador: Alexandre Borges

Inclui bibliografia

1. Anti-helmínticos naturais. 2. Hinoquinina. 3. Albendazol. 4. *Docking* consensual.



Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudos *in vitro* sobre a atividade anti-helmíntica de lignanas extraídas da Piper cubeba e *in silico* com as proteínas fosfoetanolamina metil transferase e -tubulina do *haemonchus contortus*

AUTORA: ALINE FÉBOLI

ORIENTADORA: ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

COORIENTADOR: ALEXANDRE BORGES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA DOS MATERIAIS, área: Química dos Materiais pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Profa. Dra. MARIA ANGELA DE MORAES CORDEIRO
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. GLAUCO GARRIDO ALMEIDA
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. RENATO LUIS TAME PARREIRA
Universidade de Franca - UNIFRAN

Prof. Dr. DANIEL FABIO KAWANO
Instituto de Química / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Ilha Solteira, 04 de abril de 2020

Dedico este trabalho à minha família.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Agradeço a minha família pelo apoio e incentivo.

Agradeço aos meus amigos pelo companheirismo durante esses 7 anos em Ilha Solteira.

Agradeço a minha orientadora Rosangela Laurentiz e ao meu coorientador Alexandre Borges pela paciência, dedicação, ensinamento e amizade.

Agradeço aos alunos de IC que muito contribuíram com meu trabalho (Suelen, Jéferson, Marina e Matheus).

Agradeço ao meu marido por sempre estar ao meu lado, por todo amor e apoio.

Agradeço novamente a Deus por estar gerando o bem mais precioso da minha vida João Antônio.

Resumo

O estudo sobre o uso de plantas e metabolitos secundários tem sido uma das alternativas mais estudadas nos últimos anos como forma de controlar a parasitose em ovinos provocada principalmente pelo nematoide *Haemonchus contortus*. A *Piper cubeba* é uma pimenta asiática que apresenta uma série de propriedades biológicas, incluindo atividade antiparasitária, sendo essa atividade, muitas vezes atribuída às lignanas cubebina, hinoquinina e diidrocubebina, que estão presentes na planta em maior concentração. Estudos *in vitro* com o extrato da *Piper cubeba* e com as lignanas cubebina, diidrocubebina e hinoquinina demonstraram que esses compostos apresentam importante ação contra os vários estágios do desenvolvimento de vida do nematoide *Haemonchus contortus*, sendo a hinoquinina a mais eficaz ($CE_{50} = 68 \mu\text{g} / \text{mL}$ contra ovos, $CE_{50} < 35 \mu\text{g} / \text{mL}$ contra o estágio L1 e $CE_{50} = 0.34 \mu\text{g} / \text{mL}$ contra o estágio L3). Devido à relevância desses resultados foram então realizados estudos de *docking* molecular com essas lignanas com o objetivo de avaliar a ação desses compostos com as proteínas fosfoetanolamina metil transferase (FMT) e a proteína tubulina do *H. contortus* usando o albendazol como fármaco de referência. O estudo de *docking* consensual utilizou os softwares Maestro 10.1, GOLD 5.3 e Autodock 4.2. Os resultados *in silico* quando comparados aos resultados *in vitro*, demonstraram que o mecanismo de ação da hinoquinina, que se mostrou mais ativa, pode estar relacionado à inibição, tanto da β -tubulina como da FMT-2. Embora sejam necessárias mais pesquisas, os resultados indicam que a hinoquinina, ainda que não seletiva para a FMT, pode ser usada como alvo promissor para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos para o controle da infecção causada pelo *H. contortus*.

Palavras Chave: Anti-helmínticos naturais, hinoquinina, albendazol, *docking* consensual.

Abstract

The study on the use of plants and special metabolites has been one of the most studied alternatives in recent years as a way to control parasitosis in sheep caused mainly by the nematode *Haemonchus contortus*. *Piper cubeba* is an Asian pepper that has a series of biological properties, including antiparasitic activity, and this activity is often attributed to cubebin, hinokinin and dihydrocubebin lignans, which are present in the plant in greater concentration. *In vitro* studies with the *Piper cubeba* extract and with the lignans cubebin, dihydrocubebina and hinokinin demonstrated that these compounds present important action against the several stages of the development of life of the *Haemonchus contortus*, being the hinokinin the most effective ($EC_{50} = 68 \mu\text{g} / \text{mL}$ against eggs, $EC_{50} < 35 \mu\text{g} / \text{mL}$ against stage L1 and $EC_{50} = 0.34 \mu\text{g} / \text{mL}$ against stage L3). Due to the relevance of these results, molecular docking studies were then carried out with these lignans in order to evaluate the action of these compounds with the phosphoethanolamine methyl transferase (FMT) proteins and the *H. contortus* tubulin protein using albendazole as a reference drug. The consensual docking study used the Maestro 10.1, GOLD 5.3 and Autodock 4.2 softwares. The *in silico* results when compared to the *in vitro*, demonstrated that the mechanism of action of hinokinin, which was more active, may be related to the inhibition of both β -tubulin and FMT-2. Although more research is needed, the results indicate that hinokinin, although not selective for FTM, can be used as a promising target for the development of new anthelmintics to control infection caused by *H. contortus*.

Keywords: Natural anthelmintics, hinokinin, albendazole, consensual docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas das lignanas cubebina, hinoquinina e diidrocubebina.....	17
Figura 2- A-D. Diferentes fases do desenvolvimento do <i>h. contortus</i> . A- ovo, B-L1, C-L3, D - verme adulto	19
Figura 3-Ciclo de vida do <i>H. contortus</i>	20
Figura 4 - Conectividade de unidades fenilpropanoides para formação de lignanas	23
Figura 5 - Estrutura das subclasses de lignanas oxigenadas no carbonos 9 e 9'.....	23
Figura 6- Estrutura tridimensional da β -tubulina do <i>H. contortus</i>	26
Figura 7- Estrutura tridimensional da FMT-1.	27
Figura 8- Estrutura tridimensional da FMT-2.	28
Figura 9- Albendazol	29
Figura 10- Algoritmo genético Darwiniano (GOLD).....	36
Figura 11- Algoritmo genético Lamarckiano	37
Figura 12- Espectro de RMN de ^1H da cubebina em CDCl_3	40
Figura 13- Espectro de RMN de ^{13}C da cubebina em CDCl_3	40
Figura 14- Espectro de RMN de ^1H da hinoquinina em DMSO-d_6	41
Figura 15- Espectro de RMN de ^{13}C da hinoquinina em DMSO-d_6	42
Figura 16- Espectro de RMN de ^1H da diidrocubebina em CDCl_3	43
Figura 17- Espectro de RMN de ^{13}C da diidrocubebina em CDCl_3	43
Figura 18- Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com o controle negativo (0,5% DMSO).....	46
Figura 19- Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com a cubebina na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$	47
Figura 20- Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com a hinoquinina na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$	47
Figura 21-Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com a diidrocubebina na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$	48
Figura 22- Sobreposições das lignanas com o fármaco de referência ABZ. ABZ(cinza), CB (azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa).....	54
Figura 23- Resultados das poses, indicando as interações entre os resíduos de aminoácidos e o ligante. ABZ (cinza), CB (azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa). ligações de hidrogênio (linhas tracejadas pretas) e interações hidrofóbicas (linhas tracejadas lilás).....	55

Figura 24- Sobreposição do SAH (roxo) e lignanas na FMT-1. SAH (roxo), ABZ (cinza), CB(azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa).	57
Figura 25- Resultados das poses, indicando as interações entre os resíduos de aminoácidos e o ligante. SAH (roxo-A), ABZ (cinza-B), CB (azul-C), DIC (rosa- D), HNQ (amarelo-E). ligação de enxofre (amarelo), ligação de hidrogênio (preto).....	59
Figura 26- Sobreposição do sam (roxo) e lignanas na FMT-1. SAH (roxo), ABZ (cinza), CB (azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa).....	61
Figura 27- Modelo de interação entre a FMT-2 e SAM (A), ABZ (B) e HNQ (C). as linhas tracejadas em preto representam ligações de hidrogênio, em lilás interações hidrofóbicas e em amarelo as eletrostáticas	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagens de inibição da eclodibilidade dos ovos (TE), inibição do desenvolvimento larval (TDL) e inibição da migração larval (TML) (média ± DP) de nematóides gastrointestinais de ovinos (95% <i>Haemonchus contortus</i>) por lignanas extraídas de frutos de <i>P. cubeba</i>	44
Tabela 2- Valores de CE ₅₀ (IC 95%) e CE ₉₅ (IC 95%) para CB, DIC e HNQ obtidos a partir dos resultados de inibição da eclosão de ovos (TE), desenvolvimento larval (TDL) e da migração larval (TML) de nematóides gastrointestinais de ovinos.....	45
Tabela 3- Interações entre o ligante e os resíduos do sítio ativo da β-tubulina. Mostrando o tipo de interação e os grupos envolvidos nas interações. Ligação de hidrogênio (LH), interações hidrofóbicas (HB), anel aromático (AR), grupo metilenodioxo (MD), metil (ME).....	54
Tabela 4-Valores de RMSD do SAH, CB, HNQ, DHC e ABZ- Gold (G) e Maestro (M).	56
Tabela 5- Interações entre os ligantes e a FMT-1. Ligação de hidrogênio (LH), interações hidrofóbicas (HB), anel aromático (AR), grupo metilenodioxo (MD), metil (ME).....	57
Tabela 6- Valores de RMSD do SAM, cubebina, hinoquinina, diidrocubebina e abz- gold (G) e maestro (M).	60
Tabela 7- Interações entre os ligantes e a FMT-2. Ligação de hidrogênio (LH), interações hidrofóbicas (HB), anel aromático (AR), grupo metilenodioxo (MD), metil (ME), hidroxila (HX), metil (MT).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AR-Aromático

ABZ- Albendazol

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool

CB- Cubebina

CE₅₀ - Concentração eficaz a 50%-Concentração necessária para promover 50% de inibição no ensaio em questão.

CE₉₅ - - Concentração eficaz a 95%-Concentração necessária para promover 95% de inibição no ensaio em questão.

DIC- Diidrocubebina

DMSO- Dimetilsulfóxido

EPC- Extrato hidroalcoólico bruto da *Piper cubeba*

EtOH- Etanol

FMT - Fosfometiltransferase

GOLD- Genetic Optimisation for Ligand Docking

HB- Interações hidrofóbicas

HNQ- Hinoquinina

HX- Hidroxila

IC- Intervalo de confiança

LH- Ligação de hidrogênio

MD- Metilenodioxí

ME- Metil

OPG- Ovos por grama de fezes

PBS- Tampão fosfato salino

PDB-Protein Data Bank

SAH- S-adenosil homocisteína

SAM- S-adenosil metionina

UniProt- Universal Protein Research

TE- Teste de eclodibilidade

TDL- Teste de desenvolvimento larval

TLC- Cromatografia em camada fina

TML- Teste de migração larval

Aminoácidos

Arg Arginina

Gln Glutamina

His Histidina

Ile Isoleucina

Leu Leucina

Phe Fenilalanina

Ser Serina

Tyr Tirosina

Val Valina

Gly Glicina

Pro Prolina

Sumário

APRESENTAÇÃO.....	16
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.2. <i>Haemonchus contortus</i>	19
1.3 Resistência anti-helmíntica.....	20
1.4 Uso de plantas medicinais no controle da parasitose	21
1.5. <i>Piper cubeba</i> e suas lignanas.....	22
1.6. Modelagem Molecular.....	24
1.6.1. <i>Docking</i> Consensual	24
1.6.2. Proteína alvo.....	25
1.6.2.1. β -tubulina.....	25
1.6.2.2. Fosfoetanolaminametiltransferase.....	26
1.7. Composto referência Albendazol (ABZ).....	29
2 OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Material vegetal e isolamento das lignanas	31
3.1.2. Caracaterização das lignanas	31
3.2. Ensaio <i>in vitro</i>	31
3.2.1. Recuperação e preparação de ovos	31
3.2.2. Teste de eclodibilidade (TE)	32
3.2.3. Teste de desenvolvimento larval (TDL).....	32
3.2.4. Teste de migração larval (TML).....	33
3.3. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das larvas do estágio L3	33
3.4. Análise estatística	34

3.5. Estudo <i>in silico</i>	34
3.5.1. Preparo dos alvos.....	34
3.5.1.1. β -tubulina.....	34
3.5.1.2. FMT-1 e FMT-2	35
3.5.1.3. Ligantes	35
3.5.1.4. Docking Molecular	35
3.5.1.5. <i>Docking</i> consensual	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Isolamento e identificação das lignanas	39
4.2. Ensaio <i>in vitro</i>	44
4.2.1. Teste de eclodibilidade	44
4.2.2. Teste de desenvolvimento larval	45
4.2.3. Teste de migração larval.....	45
5. DISCUSSÃO DOS ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	49
6. RESULTADOS DOS ENSAIOS <i>IN SÍLICO</i>	52
6.1. Preparo das proteínas.....	52
6.1.1. β -Tubulina	52
6.1.2. FMT-1 e FMT-2.	52
6.2. Resultados do <i>docking</i>	52
6.2.1. β -tubulina.....	52
6.2.2. FMT-1.....	56
6.2.3. FMT-2.....	59
.....	63
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS <i>IN SÍLICO</i>	64
8. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS	67

APRESENTAÇÃO

Atualmente, o Brasil se encontra entre os maiores produtores de ovinos do mundo já que esta carne vem ganhando espaço no mercado consumidor devido às suas propriedades nutricionais (MAGALHÃES et al., 2018; NÓBREGA, 2016). A maior parte da criação e reprodução de ovinos é realizada por pequenos produtores, porém um dos fatores que limitam a produção é a infecção parasitária causada por nematoides gastrointestinais. O principal nematoide gastrointestinal é o *Haemonchus contortus*, um parasita hematófago que causa séria anemia podendo conduzir o animal ao óbito o que gera sérios prejuízos aos produtores (MOLENTO et al., 2013).

Para o controle da infecção é necessário o manejo sanitário adequado do rebanho e a utilização de anti-helmínticos, entretanto, o uso inadequado desses medicamentos sem respeitar doses, intervalos de aplicação e rotatividade do produto utilizado selecionou nematoides resistentes às principais classes de antiparasitários como os benzimidazóis, avermectinas, imidazotiazóis e salicilanilicidas (DUARTE et al., 2012). Após a constatação da resistência parasitária as doses administradas aos animais passaram a ser muito maior na tentativa de obter tratamento à infecção. Entretanto, essa conduta vem causando preocupação, pois parte desses compostos e de derivado do seu metabolismo podem contaminar produtos derivados dos ovinos que ao serem consumidos por humanos poderiam também selecionar nematoides resistentes em humanos, visto que alguns desses antiparasitários também são utilizados em humanos no controle de algumas verminoses (MOLENTO et al., 2013).

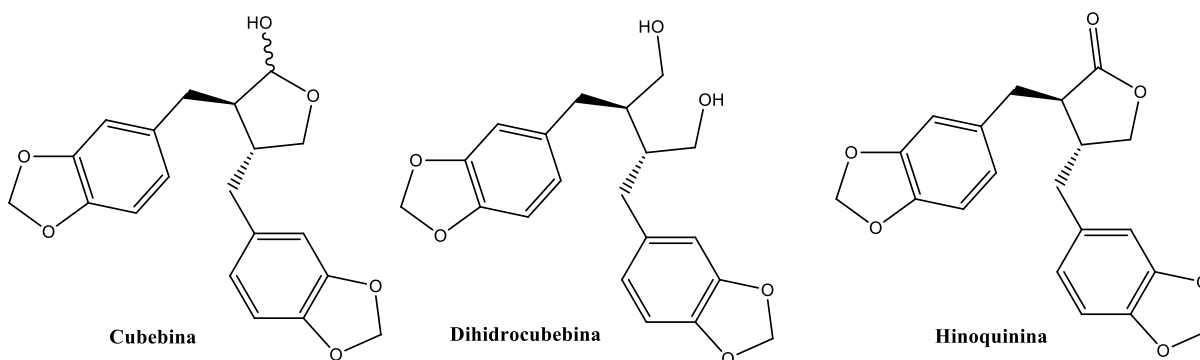
Desta forma, existe a necessidade de se propor alternativas ao uso dos anti-helmínticos já utilizados no controle da parasitose em ovinos, visando maior produtividade, bem-estar e segurança na ingestão de produtos provenientes do animal. Uma das alternativas que vem sendo estudadas para o controle da parasitose é a uso de plantas com propriedades anti-helmínticas e de metabolitos secundários extraídos destas. Assim, na tentativa de contribuir nesta área de pesquisa vários grupos têm se empenhado em avaliar a eficácia e efeitos tóxicos de plantas usadas na medicina popular através de testes *in vitro* e *in vivo* com ovinos naturalmente ou artificialmente infectados (QI et al., 2015; FÉBOLI et al., 2016; KATIKI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; ABIDIA et al., 2018).

Muitas plantas medicinais são usadas no controle de verminoses em pequenos rebanhos, muitas delas embasadas pela medicina tradicional e conhecimento popular, porém, poucas têm sua atividade comprovada cientificamente. Desse modo, as pesquisas relacionadas à utilização de

plantas no controle de parasitose em ovinos tem como objetivo avaliar o potencial de novas plantas e confirmá-lo em plantas já utilizadas na etnoveterinária (SUROOWAN et al., 2017).

A *Piper cubeba* é uma planta asiática muito estudada nas últimas décadas por suas propriedades biológicas, geralmente atribuídas às suas lignanas. Dentre elas se destacam a cubebina, hinoquina e diidrocubebina (Figura 1) que apresentam propriedades analgésica, anti-inflamatória (Da SILVA et al., 2005), antimicrobiana (SILVA et al., 2007), antioxidante (ALSAID et al., 2015) e antiparasitária (MAGALHÃES et al., 2012; ESPERANDIM et al., 2013).

Figura 1- Estruturas químicas das lignanas cubebina, hinoquina e diidrocubebina



Fonte: Próprio autor.

Portanto, com o intuito de contribuir com os estudos sobre plantas para o controle de parasitoses em ovinos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* das lignanas isoladas, determinada em ensaios de inibição da eclodibilidade dos ovos, inibição do desenvolvimento larvar e inibição da migração larvar de ovos e larvas de helmintos obtidos de ovinos naturalmente infectados. Aliados aos estudos *in vitro*, também foram realizados estudos *in silico* por docking molecular consensual com as lignanas isoladas a partir da *P. cubeba*, utilizando os programas Gold 5.1, Autodock e Maestro. Esses estudos visaram o entendimento do modelo de interação desses compostos com as proteínas β -tubulina e fosfometiltransferase do *H. contortus*, vitais na sobrevivência do nematoide (WITOLA et al., 2016).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Ovinocultura

A ovinocultura apresenta atualmente um rebanho estimado em 18 milhões de animais, sendo umas das principais atividades pecuárias desenvolvidas no Brasil. Seu crescimento se deve principalmente ao aumento da comercialização de carne devido ao seu menor teor de gordura e à utilização do leite para a fabricação de queijos finos (MAPA, 2017).

A produção de ovinos e seus derivados é considerada uma atividade em expansão, porém possui restrições, já que o manejo sanitário inadequado dos animais conduz a sérios problemas, como a infecção e infestação parasitária, que diminuem a produtividade do rebanho e os lucros obtidos a partir do produto final (COLES, 2005).

O *Haemonchus contortus*, parasita hematófago que se aloja no abomaso do animal, é nos dias atuais um dos que mais afeta os ovinos, ocasionando grandes prejuízos ao rebanho. O verme na forma adulta ingere cerca de 0,05 mL de sangue por dia, desta forma, um ovino com infecção moderada (2000 vermes de *H. contortus*) pode perder de 5 a 7% do seu volume de sangue diariamente, o que acarreta anemia, hipo-proteinemia e baixo ganho de peso. Animais com grande infestação desse parasita geralmente vão a óbito (SOUZA et al., 2009).

Para controle de nematoides gastrointestinais a realização de um manejo adequado de pastagem e de vermifugação através de anti-helmínticos sintéticos, como, ivermectina, albendazol, oxfendazol, closantel, levamisole e moxidectina, são itens básicos. Entretanto, por décadas o uso indiscriminado desses vermífugos acabou por selecionar parasitas resistentes agravando ainda mais o quadro da infecção (DUARTE et al., 2012).

Os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica surgiram na década de 70 em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e na década de 90 no Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul, Ceará, Bahia e Pernambuco (MELO et al., 1998). Relatos de resistência parasitária em vários locais do mundo evidenciaram que esse é um problema em disseminação e não um problema local (SCZESNY et al., 2010).

A contaminação dos derivados de ovinos acarretada pela utilização de doses inadequadas de anti-helmínticos é um grave problema de saúde pública, já que ao serem consumidos podem desencadear a resistência parasitária de helmintos em humanos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; SOUSA et al., 2013; VENTURINI et al., 2014).

1.2. *Haemonchus contortus*

O *H. contortus* é um parasita pertencente à classe Nematoda, ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae, gênero *Haemonchus* (VIEIRA, 1999), que se aloja no abomaso do animal infectado. Em seu estágio adulto é possível sua observação a olho nu (Figura 2), já que seu tamanho varia de 1 a 2,5 cm de comprimento (VIEIRA, 1999), sendo a principal parasita que acomete ovinos.

Seu ciclo de vida evolutivo é desenvolvido em duas fases, sendo elas, a fase parasitária, caracterizada pelo desenvolvimento no hospedeiro no ambiente interno do animal e fase de vida livre, onde há o desenvolvimento do parasita no ambiente externo. Os estágios de desenvolvimento acontecem em quatro fases, sendo o L1 o primeiro deles, caracterizado pela eclosão dos ovos. Assim, quando há a eliminação dos ovos pelas fezes do animal, em temperatura ambiente (26°C), as larvas passam do primeiro estágio L1 para o estágio L3, na própria pastagem em aproximadamente cinco dias (Figura 2A-D). A temperatura ideal para desenvolvimento das larvas é de 18 a 26 °C, porém, alterações na temperatura do ambiente influenciam no desenvolvimento do parasita. Com reduções na temperatura o desenvolvimento acontece lentamente, podendo se prorrogar a semanas ou meses.

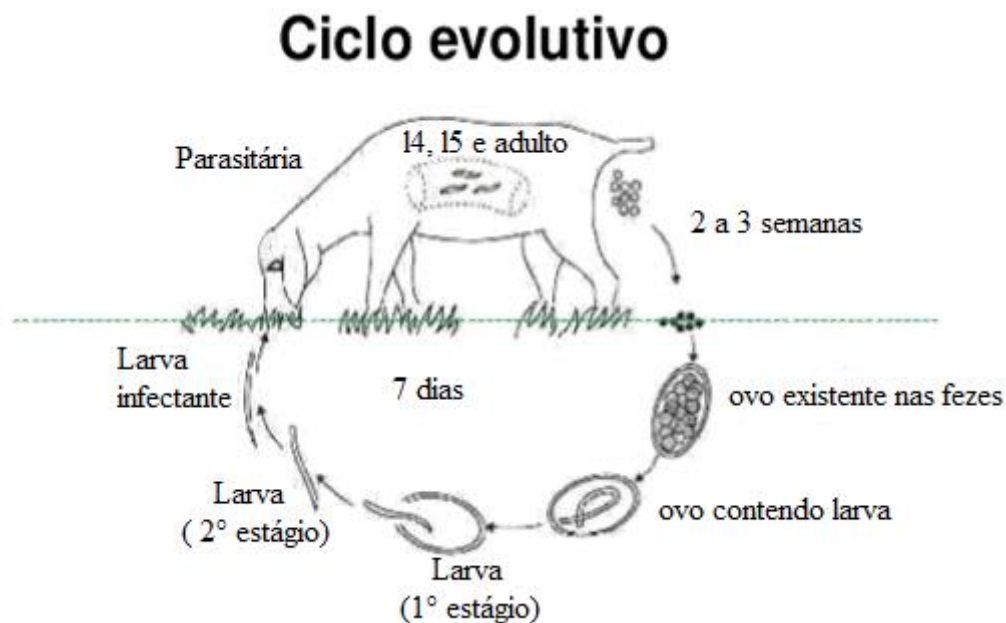
Figura 2- A-D. Diferentes fases do desenvolvimento do *H. contortus*. A- ovo, B-L1, C-L3, D -verme adulto



Fonte: A e C- Hassan et al., 2013; B- Próprio autor; D- <https://www.wormx.info/image-gallery>

O início do ciclo parasitário ocorre quando o ruminante ingere a larva infectante (L3) juntamente com a pastagem. A partir de então a larva penetra no abomaso do animal, sendo ele um dos quatro estômagos presente em ruminantes. Quando se desenvolve em L4, o parasita começa a se alimentar de sangue, ocasionando anemia, hipoproteinemia e até mesmo a morte do ovino. Dentro de aproximadamente três semanas, há então uma evolução do estágio L3 para o L5 (Figura 3) (MELO, 2005).

Figura 3- Ciclo de vida do *H. contortus*



Fonte: Zacharias, 2004.

1.3. Resistência anti-helmíntica

Há muito tempo, a infecção parasitária gastrointestinal em ruminantes é campo de destaque nas estatísticas relacionadas a problemas sanitários da ovinocultura e caprinocultura, e a dificuldade no seu controle tem se intensificado devido à resistência dos nematoides às principais drogas utilizadas (RODRIGUES et al., 2007).

O principal problema relacionado ao uso dos anti-helmínticos é o desenvolvimento de resistência. Os nematoides que sobrevivem a esse tratamento apresentam características biológicas que os tornam resistentes aos efeitos tóxicos das drogas (PRICHARD, 2001). Logo, o desenvolvimento da resistência é uma consequência evolucionária do tratamento com essas drogas e a intensidade da seleção determina a rapidez com que ela se desenvolve, sendo a baixa

eficácia dos tratamentos com anti-helmínticos o primeiro sinal do aparecimento de cepas resistentes (DEMESSIE et al., 2016). A falta de informações adequadas e atualizadas das tecnologias e utilização terapêutica iatrogênica das drogas antiparasitárias em ruminantes tem contribuído para a seleção de nematoides resistentes a praticamente todos os anti-helmínticos utilizados no Brasil e no mundo (DE JESUS et al., 2017).

O surgimento dos primeiros relatos de resistência a nematoides em ovinos foi descrito inicialmente nos Estados Unidos (THEODORIDES et al., 1970, ANDERSEN et al., 1973), Austrália (HALL et al., 1981), Nova Zelândia (BADGER et al., 1990), França (KERBOUEF & HUBERT 1985), Inglaterra (HUNT et al., 1994), Malásia (DORNY et al., 1994) e Tailândia (KOCHAPAKDEE et al., 1995). No Brasil o primeiro relato de resistência foi ao tiabendazol (DRUDGE et al., 1964; MELO et al., 1998) e depois à ivermectina no Sul do país em rebanhos de ovinos cujo nematoide predominante era o *H. contortus* e mais tarde em outras regiões (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989; MELO et al., 1998; RODRIGUES et al., 2007).

As principais linhagens de parasitas resistentes em ovinos são as de *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp. A disseminação dessas linhagens resistentes por várias regiões também agrava o problema e acontece pela comercialização de ovinos contaminado com as essas cepas resistentes (RAMOS et al., 2002).

A resistência os anti-helmínticos benzimidazóis e pró-benzimidazóis teve início na década de 1980, e mais recentemente foi também constatada para o grupo de compostos pertencentes às lactonas macrocíclicas como as avermectinas e milbemicinas (FORTES et al., 2013).

Ponderando uma nova alternativa para o controle de verminose em ovinos, surgiu o monepantel, anti-helmíntico do grupo dos derivados da aminoacetnitrila. O monepantel foi desenvolvido e colocado no mercado recentemente, como solução para o controle de nematoides multirresistentes em ovinos. Entretanto, após pouco tempo de utilização, foram relatados também casos de resistência a esse anti-helmíntico (MEDEROS et al., 2014; VAN DEN BROM et al., 2015).

1.4. Uso de plantas medicinais no controle da parasitose

Nas últimas décadas, as plantas têm sido usadas como uma fonte de moléculas bioativas para o desenvolvimento de fármacos para uma infinidade de males que afetam humanos e animais (CALIXTO, 2019). Vários grupos de pesquisa ao redor do mundo desenvolvem

estudos avaliando o uso de plantas, extratos e metabólitos secundários para o tratamento de parasitas gastrointestinais de ruminantes. A grande quantidade de artigos e citações sobre o tema demonstraram a importância da pesquisa nessa área (FÉBOLI et al., 2016; KATIKI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; ABIDIA et al., 2018; SOLDERA-SILVA et al., 2018). Estudos *in vitro* e *in vivo* contra o *H. contortus* utilizando extratos de plantas ricas em taninos tem sido foco de muitos grupos de pesquisa como aqueles desenvolvidos por QI et al. (2015), KATIKI et al. (2017), MENGISTU et al. (2017), OLIVEIRA et al. (2017), SILVA SOARES et al. (2018), PIZA et al. (2019).

A maior ênfase no estudo de plantas taníferas se deve a ocorrência de taninos em forragens já usadas para alimentar ovinos e também pelo conhecimento, ainda que parcial, do mecanismo de ação desses taninos sobre as várias formas de vida dos nematoides (ALONSO-DIAZ et al., 2008; CHAN-PÉREZ et al., 2016). Entretanto, alguns estudos também têm sido realizados com plantas não taníferas, como a *Cymbopogon citratus*, onde a atividade anti-helmíntica observada foi atribuída aos componentes do óleo essencial (MACEDO et al., 2015). A *Cissus quadrangularis* é uma planta usada na etnoveterinária como anti-helmíntica na Etiópia, e tem sua atividade anti-helmíntica associada à presença de flavonoides (ZENEBE et al., 2017).

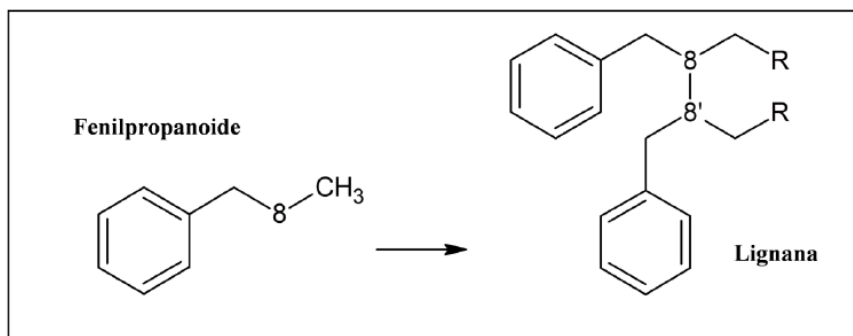
1.5. *Piper cubeba* e suas lignanas

A *P. cubeba* é uma planta não-tanífera da família Piperácea e gênero Piper, possui origem asiática e seus frutos são usados como condimento na cozinha local e também na medicina tradicional. As folhas e frutos da *P. cubeba* são usados para aliviar dores gástricas, enterites, diarreias, inflamações e no tratamento da icterícia aguda (CHOPRA et al., 1956).

O fruto de *P. cubeba* contém um óleo rico em terpenos, cujos principais constituintes são o sabineno e o eucaliptol (MAGALHÃES et al., 2012) e além do óleo possui também uma grande variedade de lignanas (BOS et al., 2007).

As lignanas são metabólitos secundários presente em algumas plantas, sendo comuns no gênero Piper e são biossintetizadas através da dimerização, por acoplamento oxidativo, de unidades fenilpropanoidicas (Figura 4).

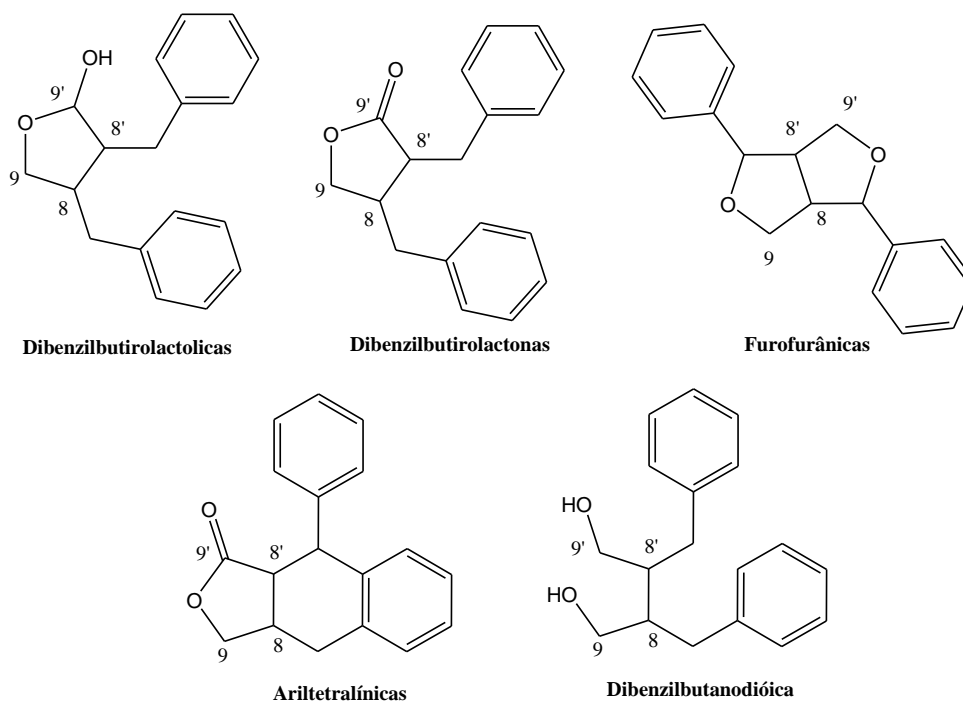
Figura 4 - Conectividade de unidades fenilpropanoide para formação de lignanas



Fonte: Próprio autor

Além disso, as lignanas podem ser classificadas em 5 principais classes, dependendo do estado de oxidação de C9 e C9' afetando os padrões de ciclização e determinando o tipo de lignana formada (Figura 5) (UMEZAWA, 2003).

Figura 5 - Estrutura das subclasses de lignanas oxigenadas no carbonos 9 e 9'.



Fonte: Adaptado de Umezawa 2003.

Nos frutos da *P. cubeba*, as lignanas encontradas em maior quantidade são a cubebina, hinoquinina e diidrocubebina que são lignanas com esqueletos químicos pertencentes respectivamente às classes dibenzilbutirolactolicas, dibenzilbutirolactônicas e dibenzilbutanodióicas. Grande parte das atividades biológicas do extrato dos frutos da *P.*

cubeba são atribuídas a essas três lignanas (LIMA et al., 2018) com destaque para as atividades analgésica e anti-inflamatória (SILVA et al., 2005), antimicrobiana (SILVA et al., 2007; LAURENTIZ et al., 2015), antiparasitária (SOUZA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2012; ESPERANDIM et al., 2013) e antioxidante (ALSAID et al., 2015).

As propriedades biológicas atribuídas ao extrato dos frutos da *P. cubeba* e suas lignanas, aliada à sua baixa toxicidade, faz desse extrato e de suas lignanas interessantes alvos para a avaliação da anti-helmíntica contra nematóides gastrointestinais em ovinos (GRAIDIST et al., 2015).

1.6. Modelagem Molecular

A modelagem molecular tem sido uma ferramenta útil na descoberta de novos fármacos, pois permite avaliar um grande número de moléculas sobre o alvo molecular e dentre elas obter moléculas com real possibilidade de ação biológica, diminuindo assim o número e o custo das análises *in vitro* e *in vivo*.

O docking molecular permite estudar o modelo de interação entre o alvo (proteína) e o ligante, possibilitando assim prever se este ligante interage de forma a alterar a função deste alvo (BIELSKA et al., 2011). Este processo se realiza com o auxílio de algoritmos, que apresentam dados conformacionais, e de funções de pontuação, que determinam valores energéticos relacionados a esta interação. (JOSEPH-McCARTHY, 1999; GÜNTHER et al., 2003; JORGENSEN, 2010; HUNG & CHEN, 2014). Com a finalidade de prever e compreender o comportamento das lignanas estudadas neste trabalho com os alvos, β -tubulina e FMT, escolheu-se, desta forma, o uso da metodologia de docking consensual que foi desenvolvido com o auxílio dos programas Gold 5.3, Maestro 10.1 e Autodock 4.2.

1.6.1. Docking Consensual

É observado que o uso de docking individual apresenta algumas falhas que prejudicam a previsão com maior precisão do modelo de interação alvo-ligante, isto geralmente ocorre, porque suas funções de pontuação são projetadas para trabalhar com um grande conjunto de proteínas alvo e não com uma proteína ou classe específica de proteínas (por exemplo, enzimas ou receptores de membrana). Estas limitações individuais, de cada software ou dos seus respectivos algoritmos, podem ser minimizadas substituindo seu resultado final por uma média

das múltiplas funções de pontuação, isto é obtido a partir da realização do método de *docking* consensual (NEVES, 2015). Os programas utilizados neste trabalho, citados acima, possuem algoritmos de amostragem específicos, o Autodock 4.2 e o Gold 5.3 utilizam algoritmo de busca baseados na teoria da evolução, enquanto o Maestro 10.1 seleciona as conformações energeticamente mais favoráveis usando um algoritmo de amostragem baseado em Monte Carlo.

Para este estudo de docking as proteínas alvo escolhidas foram a β -tubulina e a fosfoetanolaminametiltransferase (FMT) presentes em todos os estágios de vida do *H. contortus*.

1.6.2. Proteína alvo.

A proteína alvo é uma molécula que tem a capacidade de interagir com um ligante específico e a forma como eles interagem é que determina seu efeito biológico (SLIWOSKI et al., 2014). Desta forma, como citado acima, o docking molecular auxilia na compreensão da relação entre a proteína e o ligante, sendo de extrema importância, pois pode ser usada para propor novos ligantes e otimizar a interação com uma determinada proteína alvo que venha a ser estudada (HUNG & CHEN, 2014).

1.6.2.1. β -tubulina

A β -tubulina é uma proteína que apresenta papel crucial na sobrevivência do *H. contortus* por estar relacionada com a formação dos microtúbulos, que tem como funções a formação do fuso mitótico, motilidade, secreção celular, absorção de nutrientes e transporte celular (BRUCE, 1987; LACEY, 1988; JASMER et al., 2000). As unidades estruturais dos microtúbulos são os α,β -heterodímeros. Em ambas, as unidades apresentam guanosina trifosfato (GTP). A síntese dos microtúbulos se dá a partir da subunidade β (Figura 6). O GTP ao se ligar a esta subunidade é hidrolisado, levando à adição de mais uma subunidade heterodimérica ao protofilamento em formação. Esses protofilamentos se empacotam paralelamente para formação dos microtúbulos. Os microtúbulos são formados por 13 protofilamentos de dímeros $\alpha\beta$ tubulina. Os monômeros de α e β tubulina compartilham cerca de 40 % da identidade sequencial e possuem estruturas muito similares, exceto em algumas regiões das alças. Ambos monômeros apresentam domínios de ligação a nucleotídeos (N-

terminal), de interação com ligantes (intermediários) e de ligação às proteínas associadas com o processo de polimerização (KESKIN et al., 2002; KERSSEMAKERS et al., 2006). Embora apresente os monômeros $\alpha\beta$, apenas a fração β (Figura 6) é de interesse, pois é nesta subunidade que atuam os fármacos utilizados no tratamento das verminoses ocasionadas pelo *H. contortus*, estes compostos ocasionam a morte do parasita pela instabilidade na polimerização dos microtubulos. Tais fármacos, os benzimidazois interagem em um local “enterrados” na fração β -tubulina, dos quais fazem parte os resíduos Ser 165, Phe 167, Glu 198, Phe 200, Met 233, Val 236, Leu 250 e Leu 253 (ROBINSON et al., 2004).

Apesar da tubulina ser crucial para o desenvolvimento do *H. contortus*, a mesma é encontrada em várias espécies, inclusive mamíferos. Ao contrário da FMT, que é específica de parasitas e não é encontrada em mamíferos (LEE & JEZ, 2013), fato que a torna um alvo bastante interessante.

Figura 6- Estrutura tridimensional da β -tubulina do *H. contortus*.

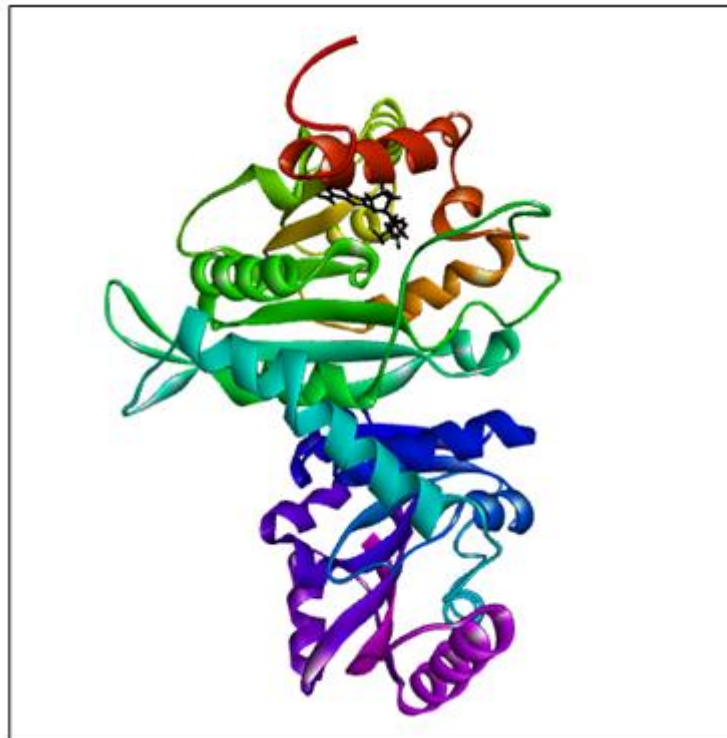


Fonte: Próprio autor.

1.6.2.2. Fosfoetanolaminamiltransferase

Essa enzima é essencial para sobrevivência do parasita, visto que é a principal via de fornecimento de fosfatidilcolina para a biossíntese de fosfolipídeos em nematoides. As N-metiltransferases de fosfoetanolamina (FMT) catalisam a metilalação sequencial de fosfoetanolamina em fosfatidilcolina. Esse processo ocorre na região da proteína formada pelos di-domínio FMT-1 e FMT-2 (Figura 7). O domínio (FMT-1) catalisa a metilação de fosfoetanolamina em fosfomonometiletanolamina, e o domínio (FMT-2) completa a síntese para formação da fosfatidilcolina (LEE et al., 2013). Tais domínios são estruturalmente distintos, assim permitindo uma metilação seletiva de substratos de fosfobases, usando dois sítios ativos diferentes.

Figura 7- Estrutura tridimensional da FMT-1.



Fonte: Próprio autor

Figura 8- Estrutura tridimensional da FMT-2.



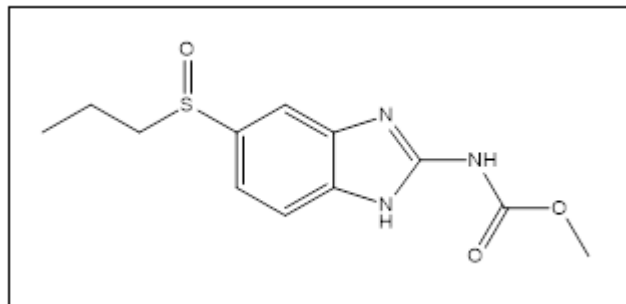
Fonte: Próprio autor

A FMT-1 utiliza como co-substrato a S-adenosil homocisteína (SAH), a partir da qual a fosfoetanolamina (pEA) é metilada através da transferência do grupo metil por reação de substituição nucleofílica biomolecular SN2. Este local corresponde ao sítio ativo da FMT-1, e é constituído pelos resíduos Trp 14, Met 26, Met 27, Asp 57, Ile 58, Ala 60, Arg 64, Phe 65, Asp 80, Phe 81, Ile 82, Phe 85, Asp 105, Trp 123, Leu 124 e Tyr 127. Na FMT-2 a síntese é completada com auxílio do co-substrato S-adenosil metionina (SAM), este local é formado pelos resíduos Tyr 183 Ile 200, Ser 201, Ile 127, Asp 250, Leu 251, Asp 277, Ala 278, Arg 294 e His 299 (LEE & JEZ, 2013) e corresponde ao sítio ativo da FMT-2. Os fosfolipídios são componentes integrais e estruturais importantes das membranas celulares eucarióticas, o que deixa claro a relevância dessa enzima na sobrevivência do parasita, convertendo-a em um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas contra o *H. contortus*, principalmente porque ela não é encontrada em humanos. A FMT fornece dois alvos inibidores antiparasitários dentro da mesma via metabólica, sendo vias distintas das dos mamíferos (LEE & JEZ, 2013), os di-domínios FMT-1 e 2.

1.7. Composto referencia Albendazol (ABZ)

O fármaco Albendazol (ABZ) (Figura 9), da classe dos benzimidazóis, é um dos anti-helmínticos mais utilizados no combate à verminose gastrointestinal devido a sua alta eficácia sob a eclodibilidade dos ovos dos helmintos e seu baixo custo (ANDERSON et al., 1991). Possui em sua estrutura um núcleo benzoimidazol contendo um grupo amida ligado ao anel azoico e um grupo sulfóxido ligado ao anel benzênico. Sua ação se dá devido a atuação na proteína β -tubulina do parasita, assim impedindo sua polimerização e incorporação da glicose, que atua no metabolismo energético (VENKATESAN, 1998). Porém, sua utilização de forma inadequada selecionou cepas de nematoides resistentes a ele. Segundo Silvestre & Cabaret (2002) esta resistência está relacionada a uma mutação no aminoácido 200 e 167 (Fenilalanina/Tirosina) do gene isotipo 1 β -tubulina dos nematoides resistentes, pois são os resíduos que parecem estar mais implicados no mecanismo de resistência aos benzimidazóis (KWA et al., 1994).

Figura 9- Albendazol



Fonte: Próprio autor

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade anti-helmíntica *in vitro* das lignanas cubebina, hinoquinina e diidrocubebina contra ovos e larvas de nematoides gastrointestinais de ovinos e prever o modelo de interação dessas lignanas através de estudos *in silico* utilizando o *docking* molecular consensual com enzimas de importância vital para a sobrevivência do principal nematoide causador da parasitose.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o estudo *in vitro* da atividade anti-helmíntica das lignanas extraídas da *P. cubeba* utilizando ovos e larvas de nematoides gastrointestinais obtidos através de ovinos doadores naturalmente infectados.
- Obter a estrutura tridimensional da β -tubulina e da fosfoetanolaminametiltransferase do *H. contortus* por métodos teóricos.
- Estudar o comportamento das lignanas no sítio de ligação das enzimas por meio da formação de complexos proteína-ligante teóricos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e isolamento das lignanas

Os frutos secos de *P. cubeba* foram adquiridos de Floral Seed Companhia, Dehradun, Índia. Os frutos foram pulverizados e extraídos por maceração exaustiva por cinco dias com etanol 70% (500 g de semente pulverizadas para 2 L de etanol). O extrato foi filtrado e concentrado sob vácuo para fornecer o extrato hidroalcoólico bruto (EPC), que foi fracionado pela partição hexano e metanol/água (9:1) (LAURENTIZ et al., 2015). A fração bruta hidrometanólica (50 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel. A eluição com proporções crescentes de hexano, hexano/acetato de etila e acetato de etila puro produziu 16 frações (200 mL), das quais seis, com perfil cromatográfico semelhante, foram reunidas, concentradas sob vácuo e novamente submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando um gradiente crescente da mistura de hexano/acetato de etila. Esta última cromatografia apresentou sequencialmente três compostos como principais produtos. O composto **1** foi eluído com hexano-EtOAc (9: 1), o composto **2** foi eluído com hexano-EtOAc (7:3) e o composto **3** foi eluído com hexano-EtOAc (1:1). Os compostos isolados foram mantidos congelados até o uso e depois diluídos em DMSO 0,5% para a obtenção das concentrações utilizadas nos testes *in vitro*.

3.1.2. Caracterização das lignanas

Os compostos isolados foram comparados por cromatografia em camada delgada com padrões de lignanas conhecidas e submetidos à análise por RMN de ^1H e ^{13}C para comprovação de suas estruturas.

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação estrutural dos compostos isolados foram realizadas usando um espectrômetro Bruker ARX 500 (Bruker-Alemanha). As amostras para as análises foram preparadas dissolvendo 10 mg de cada composto isolado em 0,5 mL de CDCl_3 ou DMSO-d_6 .

3.2. Ensaios *in vitro*

3.2.1. Recuperação e preparação de ovos

As fezes utilizadas nos testes *in vitro* foram obtidas de ovinos naturalmente infectados com nematoides gastrointestinais, sendo 95% de *H. contortus* e *Trichostrongylus* sp a 5%, as espécies de nematoides foram determinadas de acordo com Van Wyk & Mayhew (2013). As amostras de fezes foram obtidas diretamente do reto de um animal doador. As fezes foram diluídas em água morna e os ovos foram recuperados com o uso sequencial de peneiras (1 mm a 25 µm), conforme método descrito por Coles et al. (1992), com algumas modificações. Os ovos retidos na última peneira (25 µm) foram lavados com água destilada, transferidos para tubos Falcon (50 mL) e centrifugados a 2054 x g por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e uma solução saturada de NaCl foi adicionada para suspender os ovos sedimentados. Após centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi transferido para a peneira de 25 µm, os ovos foram novamente lavados com água destilada e transferidos para outro tubo. A concentração de ovos neste tubo foi estimada pela contagem do número de ovos em alíquotas de 50 µL (5 contagens) usando a técnica da lâmina de McMaster. A suspensão de ovos contida neste tubo, após contagem dos ovos, foi diluída com água para atingir uma concentração de 100 ovos/100 µL.

3.2.2. Teste de eclodibilidade (TE)

A suspensão de ovos (100 ovos/100 µL) e 100 µL das lignanas em diferentes concentrações (75-1250 µg/mL) foram incubados por 48 h a 28 ° C em placas de 24 poços. Os ovos e as L1 foram contadas sob um microscópio invertido. Albendazol (12,5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo, enquanto o DMSO 0,5% foi usado como controle negativo (COLES et al., 1992). Foram realizadas cinco repetições para os controles e para cada concentração das lignanas.

3.2.3. Teste de desenvolvimento larval (TDL)

Este teste foi realizado de acordo com o método descrito por Lacey et al. (1998), com algumas modificações. A suspensão de ovos (100 µL/100 ovos), 90 µL de meio nutritivo (1 g de levedura em 90 mL de solução salina normal e 10 mL de sal balanceado de Earle) e 10 µL de anfotericina (Sigma-Aldrich) (25 µg/mL) foram adicionados a cada poço de uma placa de 24 poços. As placas foram incubadas por 48 h a 28 ° C, e em seguida foram adicionados a cada poço 200 µL da lignana a ser avaliada nas mesmas concentrações descritas para o teste de eclodibilidade. Ivermectina (10 µg/mL) e DMSO 0,5% foram utilizados como controle

negativo, respectivamente. Foram realizadas cinco repetições para cada concentração e para os controles. As placas foram incubadas por mais 5 dias nas mesmas condições. O número de L1/L2 e L3 em cada poço foi contado sob um microscópio invertido com ampliação de 40x.

3.2.4. Teste de migração larval (TML)

As larvas infectantes L3 foram obtidas por coprocultura das fezes contendo os ovos dos nematoides e coletadas por sedimentação usando os dispositivos de Baermann (VAN WYK & MAYHEW, 2013). Este material foi lavado três vezes com PBS e transferido para um tubo Falcon (Eppendorf®) utilizado como reservatório de L3. O número de L3 no reservatório foi contado sob um microscópio invertido com ampliação de 40x através de alíquotas de 10% (placa de 6 poços, 6 contagens) e, em seguida, a suspensão no tubo foi diluída para atingir uma concentração de 500 L3/mL. O TML foi realizado com larvas vivas do estágio L3 (1000/tubo) que foram adicionadas a tubos Falcon (Eppendorf®) contendo 2 mL do controle negativo (PBS; pH 7,2), um controle anti-helmíntico (levamisol a 1,25 mg/mL) ou lignanas em concentrações iguais as descritas para o TE. Após incubação durante 3 h a 28 ° C, as L3 em cada tubo foram lavadas com PBS e centrifugadas (2054 x g) três vezes. A extremidade aberta dos tubos foi tampada com uma malha de aço de 25 µm (5cm x 5cm) que foi fixada com um elástico. O tubo então foi virado, com a extremidade da malha para baixo, em uma placa de Petri contendo 2 mL de água. Após 3 h, o número de larvas que migraram através da malha do tubo para a placa de Petri foi contado sob um microscópio invertido com ampliação de 40x, com base em alíquotas de 10% (5 contagens) (RABEL et al., 1994).

3.3. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das larvas do estágio L3

As larvas L3 para análise por MEV foram recuperadas dos testes de migração larval com o controle negativo e com as lignanas na de concentração de 150 µg/mL (cinco L3 por tratamento). As L3 foram preservadas individualmente em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4) e refrigeradas a 4 ° C até a análise. As larvas fixas foram lavadas em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4) e desidratadas em acetona (15%, 30%, 50%, 70%, 95% e 100%). As larvas desidratadas foram secas por secagem em ponto crítico Leica EM CPD300 (Leica, Alemanha) e revestidas com ouro por 2 min a 10 Å min⁻¹. As larvas foram então observadas com um microscópio eletrônico de varredura EVO LS15 (ZEISS, Alemanha) a uma voltagem de aceleração de 15 kV.

3.4. Análise estatística

As concentrações das lignanas utilizadas na análise estatística foram as concentrações iniciais divididas pela metade devido à diluição final realizada durante os testes *in vitro*. As comparações das porcentagens médias de inibição de eclosão, inibição do desenvolvimento larval e inibição da migração larval em diferentes concentrações com os controles foram realizadas por ANOVA one way, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) usando o programa Sisvar versão 5.6 (Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil). Os resultados foram expressos como médias \pm S.E. CE₅₀ (concentrações efetivas para inibir 50% da eclosão das larvas, desenvolvimento larval e migração larval das L3) e CE₉₅ (concentrações efetivas para inibir 95% da eclosão das larvas, desenvolvimento larval e migração larval de L3) foram calculados usando uma análise de regressão não linear com 95% de confiança (log (agonista) vs. inclinação variável da resposta), usando o Graphpad Prism versão 8.0 (software Graphpad).

3.5. Estudo *in silico*

Antes do docking molecular as proteínas alvo, assim como os ligantes tiveram que ser preparados para tal.

3.5.1. Preparo dos alvos

3.5.1.1. β -tubulina

Como não foi encontrada a estrutura cristalográfica da β -tubulina do *H. contortus*, esta foi construída através de modelagem por homologia. Realizou-se inicialmente a busca pela sequência primária desta proteína por meio do servidor online Universal Protein Research – UniProtKB-BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). A sequência encontrada foi a de código Q25049_HAECO. Em seguida foi realizada a busca pela estrutura tridimensional cristalográfica da β -tubulina do *Bos Tauros* (PDB-ID 1jff) a qual foi utilizada como molde. O processo foi realizado com o auxílio do servidor MUSCLE- Multiple Sequence Alignment, que realizou o alinhamento da sequência da β -tubulina com a sequência da estrutura utilizada como molde. A partir do molde e usando o servidor Swiss a estrutura tridimensional da β -tubulina do *H. contortus* foi construída. O local de interação com o ligante (centróide) foi definido com o auxílio da estrutura cristalográfica *Haemophilus influenzae* (PDB-ID 1jo0).

3.5.1.2. FMT-1 e FMT-2

Para FMT-1 foi utilizada a estrutura cristalográfica do *H. contortus* PDB-ID 4krq e para a FMT-2 a estrutura de código PDB-ID 4krh. Ambas as estruturas foram então preparadas no programa Discovery Studio Visualizer (DS), em que o seu segundo mero foi retirado e no mero utilizado foram retiradas suas águas e identificado o centróide do seu substrato (S-adenosil-homocisteína- SAH). A proteína teve ainda sua carga calculada. O mesmo foi realizado para o FMT-2 cujo substrato é a S-adenosil metionina (SAM)

3.5.1.3. Ligantes

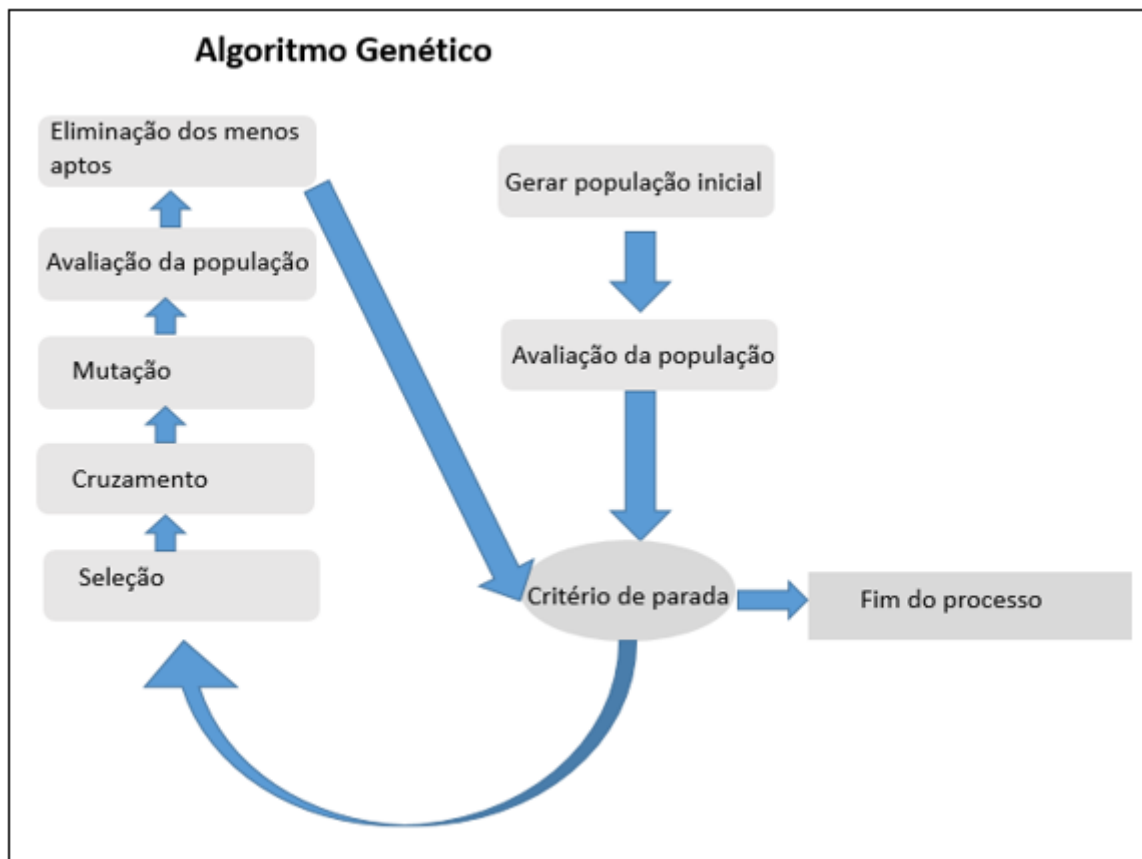
Estes foram construídos e otimizados a partir do programa ChemDraw e suas cargas calculadas pelo DS e salvo em arquivos PDB e MOL2.

3.5.1.4. Docking Molecular

Para a pesquisa utilizou-se a metodologia de *docking* consensual com os programas Gold 5.3, Autodock 4.2 e Glide-Maestro 10.1. Seus algoritmos de amostragem, embora específicos, são todos considerados métodos estocásticos, onde pesquisas aleatórias no espaço conformacional são realizadas para encontrar a melhor pose para os ligantes ao interagir com o alvo (RENNER et al., 2008). Antes de relizar o docking molecular, o processo, nos três programas foi validado por redocking (RENNER et al., 2008), sendo que o desvio quadrático médio (RMSD) de no máximo 2,0 Å foi estabelecido como limiar (KAGAMI et al., 2017).

O programa Gold 5.3 faz uma busca por possíveis soluções (JONES, WILLETT & GLEN, 1997) utilizando um algoritmo genético (AG) (Figura 10) para buscar soluções de *docking*, assim reproduzindo diversas cópias de um modelo flexível do ligante no sítio ativo (proteína) e recombinando os segmentos destas cópias aleatoriamente até que um conjunto convergente de estruturas seja gerado. A seleção da pose é acompanhada pelo uso de função de pontuação (*scoring function*), que incorpora os seguintes componentes: a energia de ligação de hidrogênio do complexo, energia interna do ligante e energia torsional (BORGES, 2016). Os cálculos do docking foram gerados utilizando a função CHEMPLP.

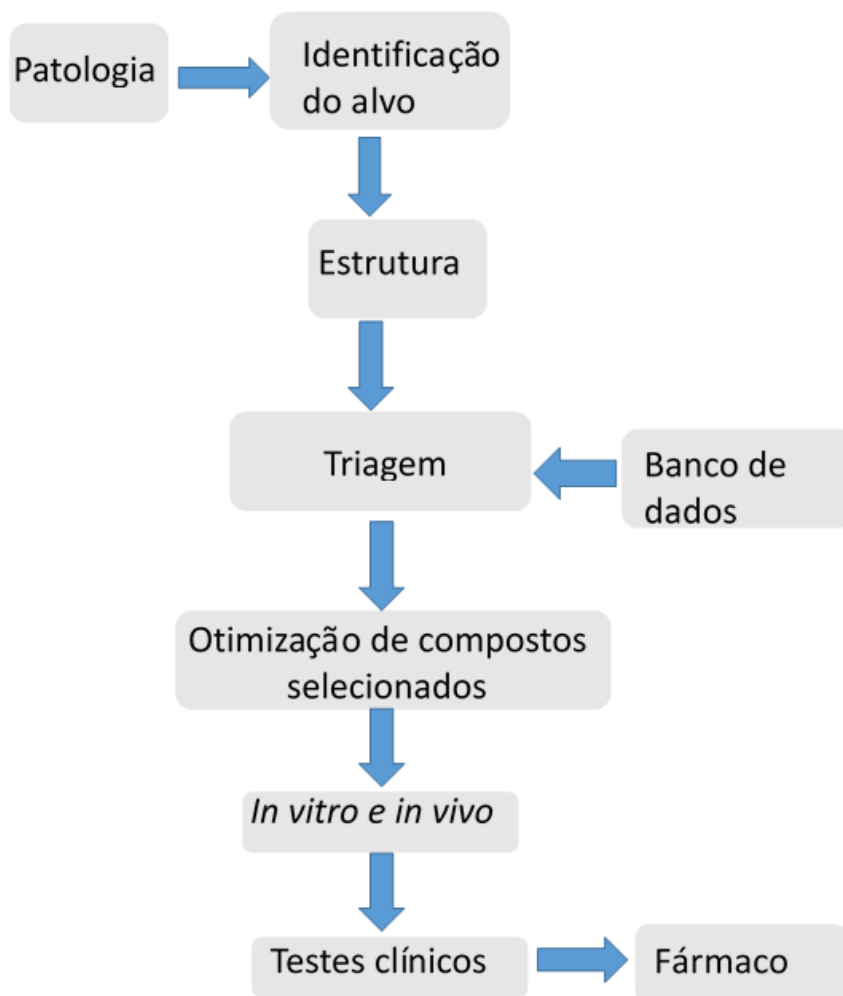
Figura 10- Algoritmo genético Darwiniano (Gold)



Fonte: Próprio autor

Assim como o GOLD 5.3, o programa Autodock 4.2 utiliza algoritmo genético, porém este último não usa o Darwiniano, mas sim o Lamarckiano (Figura 11) (Autodock version 4.2 – Use Guide). Lembrando que para Lamarck o ambiente é o principal fator que provoca as modificações no organismo. E assim como no GOLD a seleção da pose é acompanhada pelo uso de uma função de pontuação (função empírica de pontuação de energia livre), que incorpora os mesmos componentes do GOLD.

Figura 11- Algoritmo genético Lamarckiano



O software Glide Maestro 10.1 utiliza o modelo de função que combina termos empíricos e baseados em campos de força para realizar uma busca sistemática sobre a conformação, posição espacial do ligante no sítio ativo da proteína e da orientação. Primeiramente o ligante é adicionado no sítio ativo do receptor através do posicionamento aproximado e após é submetido a uma otimização flexível no sítio utilizando uma função de energia padrão de mecânica molecular. As melhores poses são refinadas pelo processo de amostragem conformacional de Monte Carlo, o qual permite a correta orientação de grupos periféricos e a alteração de ângulos torcionais internos (FRIESNER et al., 2004).

3.5.1.5. *Docking* consensual

Após finalizado o processo de docking nos três programas as estruturas dos ligantes que apresentaram as sobreposições mais próxima uma da outra foram obtidas com o auxílio do programa DS. A seguir, estas estruturas foram convertidas para o mesmo tipo de arquivo através do programa Open Babel e através do programa DS, a qualidade dessa sobreposição foi avaliada por meio dos valores do cálculo de RMSD, em que valores abaixo de 2,0 foram considerados ótimos e abaixo de 3,0 foram aceitos para análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e identificação das lignanas

Após a extração com etanol, 500 g do fruto *P. cubeba* pulverizado forneceram 75 g de extrato bruto (15% de rendimento). A cromatografia sequencial em coluna de sílica gel da fração bruta de metanol / água do extrato bruto (50 g) com a mistura de solvente em polaridade crescente (hexano / acetato de etila, diclorometano) produziu três compostos principais com massas de 1,04 g (composto **1**), 1,15 g (composto **2**) e 1,00 g (composto **3**). Os resultados das CCD comparativas com os padrão de lignanas e as análise por RMN (Figuras 12-17) confirmaram as estruturas dos compostos **1**, **2** e **3** como sendo da hinoquinina (HNQ), cubebina (CB) e diidrocubebina (DIC), respectivamente (Figura 1). Os dados de RMN obtidos para esses compostos estão de acordo com os dados publicados na literatura (SILVA et al., 2005; LAURENTIZ et al., 2015).

Cubebina

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 6,80-6,05 (m, 6H, ArH); 6,60 (sl, 4H,); 5,20 (sl, 1H), 4,10 (dd, 1H, H9α epímero A, J = 14,4 Hz e J = 7,1 Hz); 4,00 (dd, H9α epímero B, J = 8,6 Hz e J = 7,1 Hz); 3,80 (dd, 1H, H9β epímero A, J = 8,4 Hz e J = 7,8 Hz); 3,60 (dd, 1H, H9βb epímero B, J = 8,4 Hz e J = 7,1 Hz); 2,70-2,20 (m, 4H); 2,0 (m, 1H). **¹³C RMN** (CDCl₃, 100 MHz) δ 148,0; 147,9; 146,6; 146,1; 134,9; 134,5; 122,1; 121,8; 109,7; 109,5; 108,6; 108,5; 101,3; 101,2; 99,2; 72,6; 53,5 (C8'); 46,2 (C8); 39,0 (C7'); 38,3 (C7).

Figura 12- Espectro de RMN de ^1H da cubebina em CDCl_3

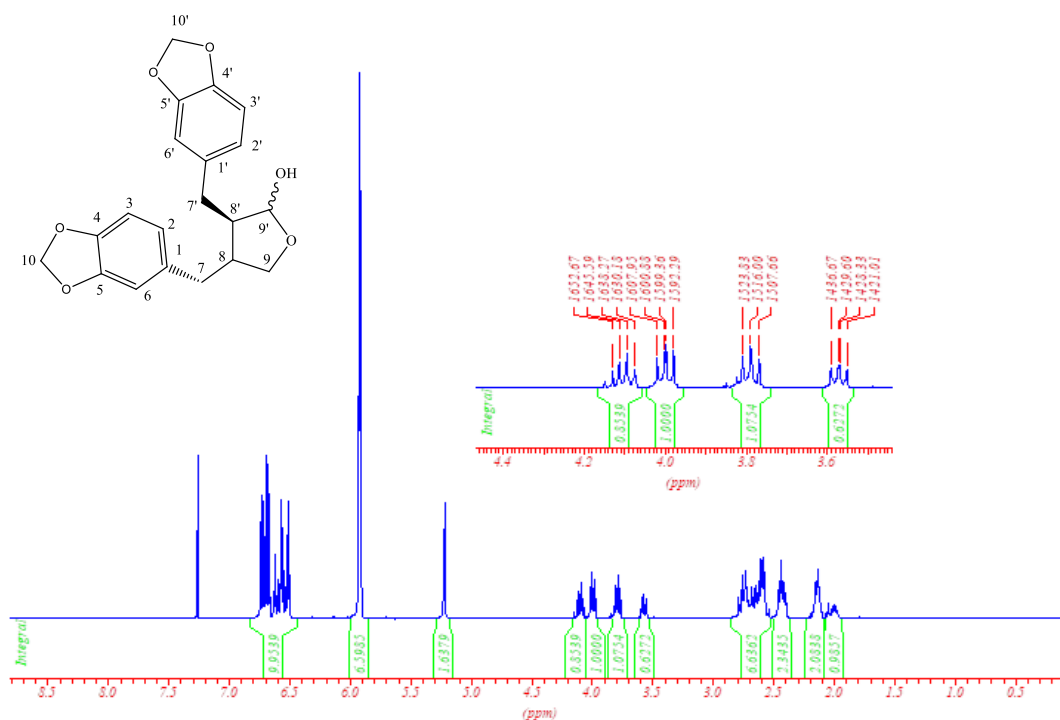
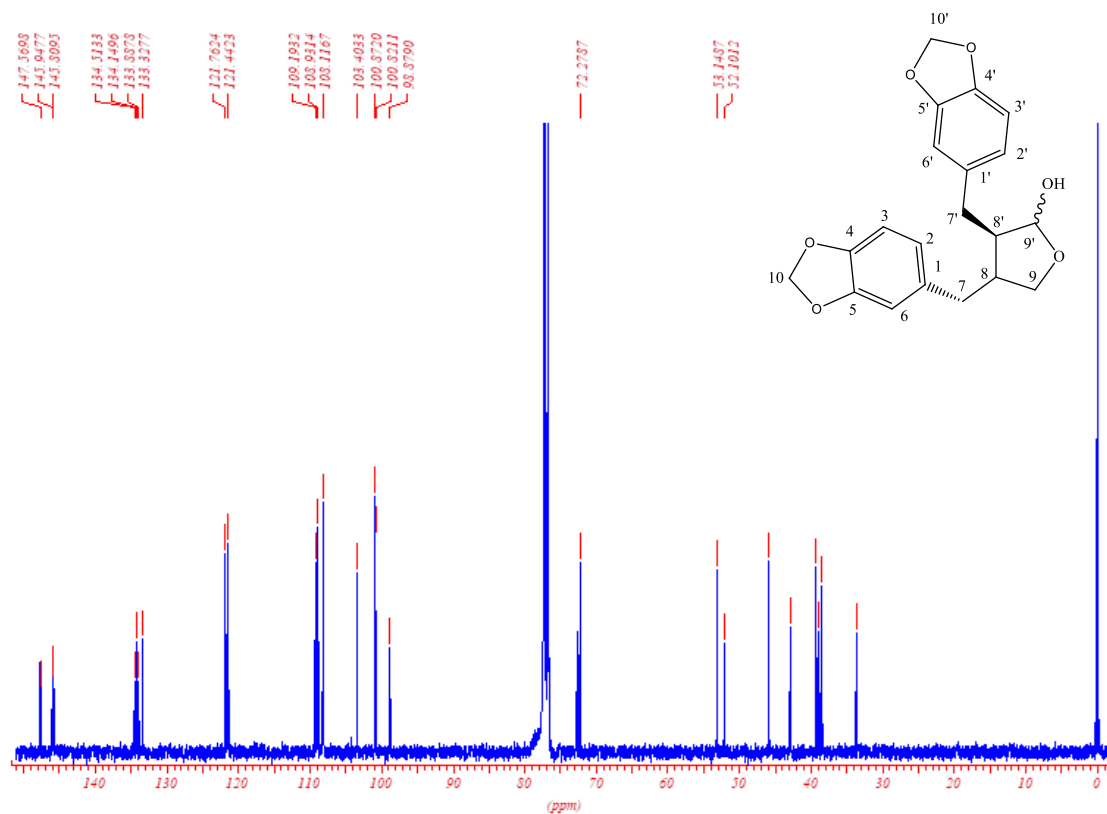


Figura 13- Espectro de RMN de ^{13}C da cubebina em CDCl_3



Hinoquinina

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 6,8-6,5 (m, 6H arom); 5,96 (s, 4H, CH_2 dos dois metilenodioxí); 4,07 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz e $J = 7,6$ Hz); 3,87 (t, 1H, $J = 8,5$ Hz); 2,84 (dd, 1H, $J = 13,5$ Hz e $J = 5,5$, Hz); 2,74 (dd, 1H, $J = 13,5$ Hz e $J = 7,0$ Hz); 2,71-2,63 (m, 1H); 2,5-2,3 (m, 3H).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 178,2; 147,26; 147,18, 145,74; 145,61; 132,48; 131,84; 122,25; 121,42; 109,41; 108,83; 108,10; 108,01; 100,73; 100,71, 70,58, 45,55; 40,81, 36,96; 33,75.

Figura 14- Espectro de RMN de ^1H da hinoquinina em DMSO- d_6

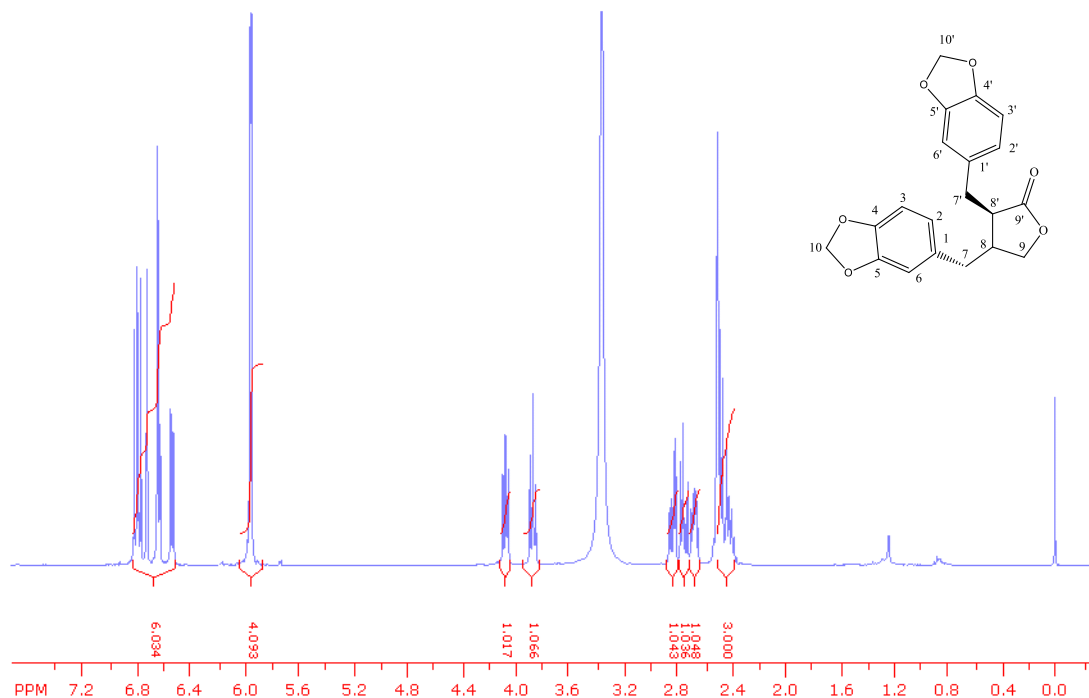
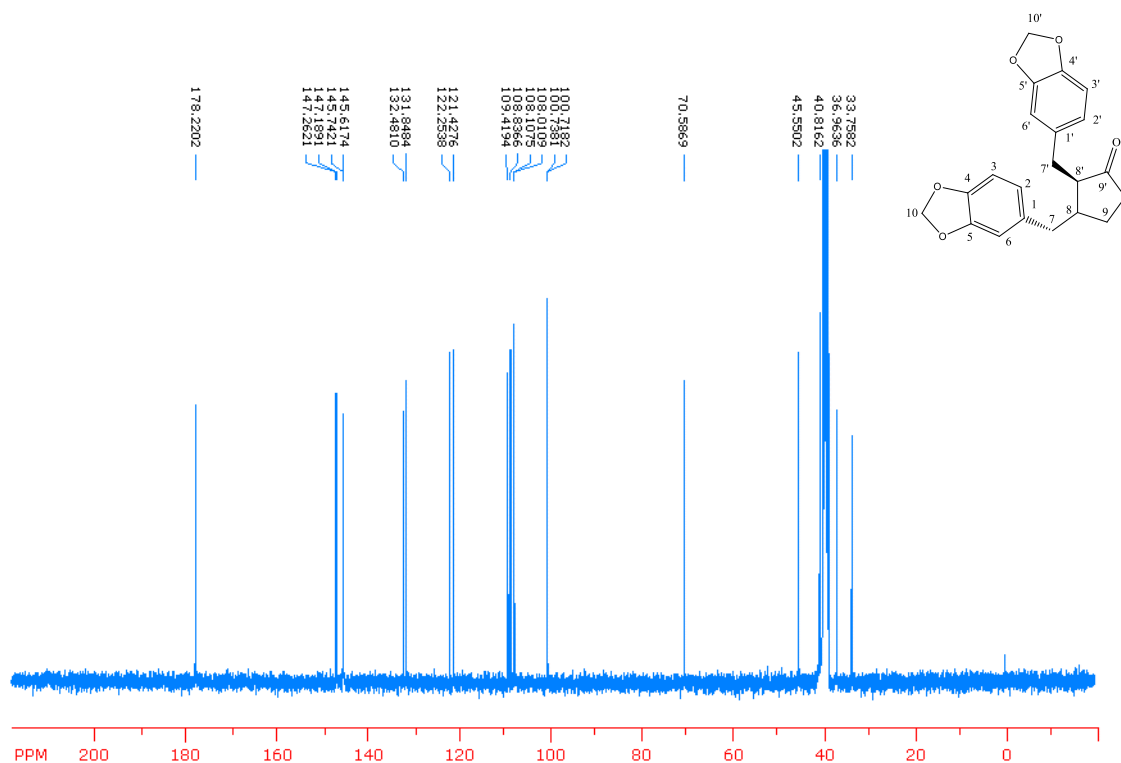


Figura 15- Espectro de RMN de ^{13}C da hinoquinina em DMSO-d₆



Diidrocubebina

^1H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 6,63, (d, 2H arom., J = 7,8 Hz); 6,59-6,49(m, 4H arom.); 5,84 (s, 4H, CH₂ dos dois grupos metilenodioxí); 3,70 (dd, 2H, J = 11,3 Hz e 1,3 Hz); 3,42 (dd, 2H, J = 11,3 Hz e J = 4,2 Hz); 3,27-3,13 (m, 2H); 2,67 (dd, 2H, J = 13,7 Hz e J = 8,7 Hz); 2,54 (dd, 2H, J = 13,7 Hz e J = 5,8 Hz); 1,82-1,77 (m, 2H).

^{13}C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 147,59; 145,73; 134,33; 121,87; 109,33; 108,13; 100,80; 60,23; 44,29; 35,92.

Figura 16- Espectro de RMN de ^1H da diidrocubebina em CDCl_3

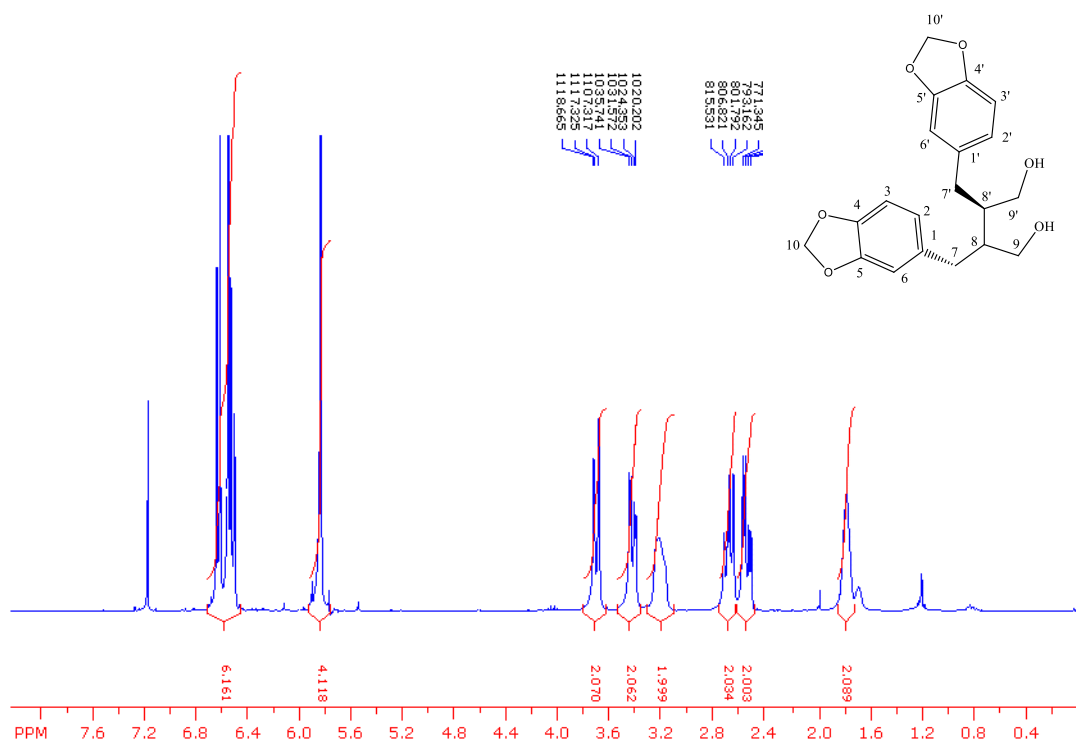
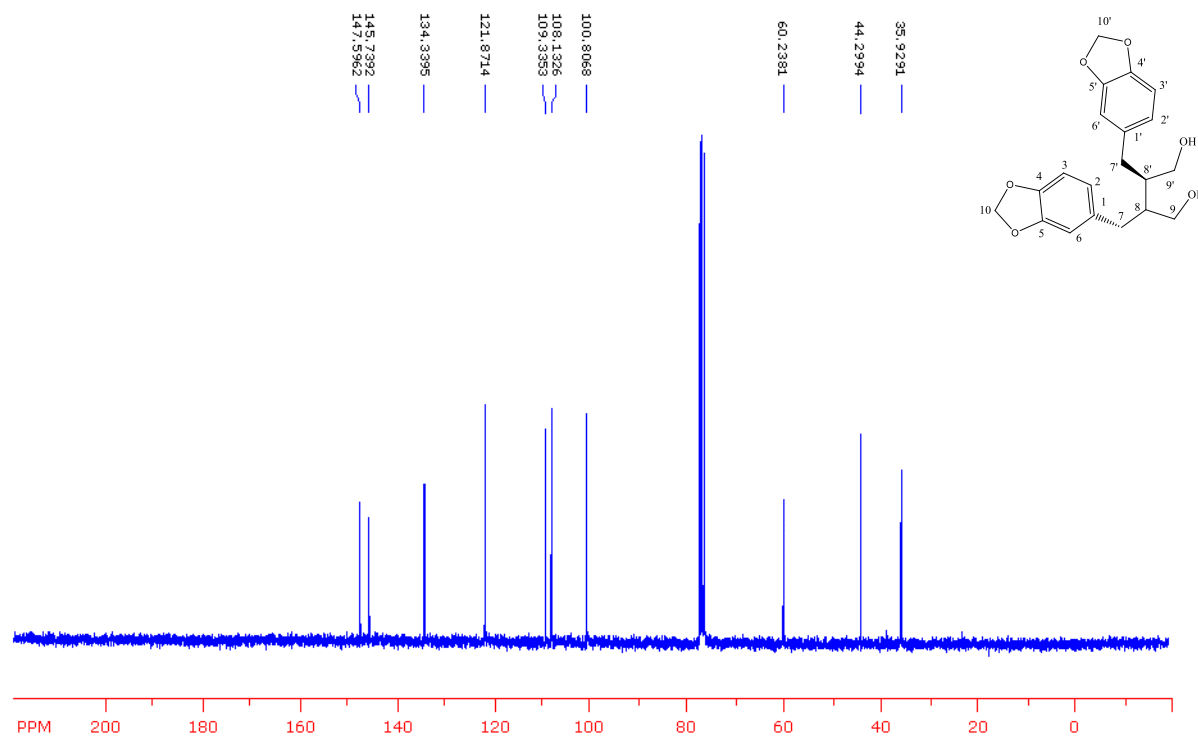


Figura 17- Espectro de RMN de ^{13}C da diidrocubebina em CDCl_3



4.2. Ensaios *in vitro*

4.2.1. Teste de eclodibilidade

Os valores de porcentagem de inibição obtidos nos testes eclodibilidade são apresentados na Tabela 1 e os de concentração eficaz a 50% (CE₅₀) e concentração eficaz a 95% (CE₉₅) são apresentados na Tabela 2.

A HNQ foi a lignana mais eficiente em inibir a eclosão dos ovos, com CE₅₀ de 68,38 µg/mL (IC 95% 58,00–85,70). CB apresentou atividade mais baixa que HNQ, com CE₅₀ = 150,0 µg/mL (IC 143,9–172,0), porém com resultado melhor do que a DIC que foi menos ativa com CE₅₀ = 186,7 µg / mL (IC 173,2–201,2) e o maior valor de intervalo de confiança (Tabela 2). As três lignanas apresentaram efeito dose dependente que pode ser observado pelos dados de inibição apresentados na Tabela 1.

Os valores de CE₉₅ não puderam ser calculados porque as concentrações avaliadas não atingiram os valores de inibições percentuais necessários para os cálculos precisos dos CE₉₅.

Tabela 1- Porcentagens de inibição da eclodibilidade dos ovos (TE), inibição do desenvolvimento larval (TDL) e inibição da migração larval (TML) (média ± DP) de nematóides gastrointestinais de ovinos (95% *Haemonchus contortus*) por lignanas extraídas de frutos de *P. cubeba*.

Conc.final (µg/mL)	TE			TDL			TML		
	CB	DIC	HNQ	CB	DIC	HNQ	CB	DIC	HNQ
1250	72,1±0,4 ^{Bb}	73,5±0,9 ^{Bb}	91,2±0,9 ^{Ba}	100,0±0,0 ^{Aa}	99,7±0,5 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	82,2±0,8 ^{Bc}	100±0 ^{Aa}	86,0±0,9 ^{Bb}
620	69,7±0,8 ^{Bb}	63,1±0,5 ^{Cc}	76,3±1,2 ^{Ca}	100,0±0,0 ^{Aa}	98,2±1,5 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	80,5±0,6 ^{Cb}	95,5±0,6 ^{Ba}	79,5±0,6 ^{Cb}
310	60,4±0,6 ^{Cb}	58,2±0,3 ^{Dc}	70,1±0,8 ^{Ca}	100,0±0,0 ^{Aa}	95,7±2,6 ^{Bb}	100,0±0,0 ^{Aa}	75,2±0,5 ^{Dc}	90,2±0,5 ^{Ca}	77,7±0,5 ^{Cb}
150	50,1±1,1 ^{Db}	45,9±0,8 ^{Ec}	59,2±1,1 ^{Da}	99,2±0,9 ^{Aa}	82,7±1,7 ^{Cb}	100,0±0,0 ^{Aa}	76,5±0,9 ^{Db}	94,5±0,6 ^{Ba}	78,0±0,6 ^{Cb}
70	35,3±1,4 ^{Eb}	29,3±0,7 ^{Fc}	52,5±1,0 ^{Ea}	99,2±0,5 ^{Aa}	78,7±3,4 ^{Db}	100,0±0,0 ^{Aa}	73,0±1,1 ^{Ec}	94,5±0,6 ^{Ba}	76,0±0,7 ^{Db}
35	20,5±1,2 ^{Fb}	18,4±0,9 ^{Gb}	37,2±0,7 ^{Fa}	93,0±1,4 ^{Bb}	52,2±3,8 ^{Ec}	100,0±0,0 ^{Aa}	68,5±0,9 ^{Fb}	91,7±0,5 ^{Ca}	70,7±1,0 ^{Eb}
C+	100,0±0,0 ^A	100,0±0 ^A	100,0±0,0 ^A	100,0±0,0 ^A	100,0±0,0 ^A	100,0±0,0 ^A	100,0±0,0 ^A	100,0±0,0 ^A	100,0±0,0 ^A
C-	6,32±0,7 ^G	6,32±0,7 ^H	6,32±0,7 ^G	5,21±0,9 ^C	5,21±0,9 ^F	5,2±0,9 ^B	4,0±0,9 ^G	4,0±0,9 ^D	4,0±0,9 ^F

Letras minúsculas comparam a média entre linhas e maiúsculas entre colunas (p <0,05). Controles positivos: TE- albendazol 6,25 µg/mL; TDL- ivermectina 5 µg/mL; TML- levamisol 0,625 mg/mL

Tabela 2- Valores de CE₅₀ (IC 95%) e CE₉₅ (IC 95%) para CB, DIC e HNQ obtidos a partir dos resultados de inibição da eclosão de ovos (TE), desenvolvimento larval (TDL) e da migração larval (TML) de nematóides gastrointestinais de ovinos.

(µg /mL)	TE			TDL			TML		
	CB	DIC	HNQ	CB	DHC	HNQ	CB	DIC	HNQ
CE ₅₀	150,0	186,7	68,38	14,89	30,75	ND	0,89	ND	0,34
IC 95%	143,9-172,0	173,2-201,2	58,00-85,70	10,87-20,38	26,86-35,20	ND	0,55-1,43	ND	0,09-1,02
CE ₉₅	ND	ND	ND	39,48	320,0	ND	ND	240,0	ND
IC 95%	ND	ND	ND	37,48- 41,59	233,2-437,3	ND	ND	145,0-384,4	ND

ND- não determinado

4.2.2. Teste de desenvolvimento larval

Os valores de porcentagem de inibição obtidos nos testes de desenvolvimento larval são apresentados na Tabela 1 e os de concentração eficaz a 50% (CE₅₀) e concentração eficaz a 95% (CE₉₅) são apresentados na Tabela 2. A CB apresentou valor de CE₅₀ = 14,89 µg/mL (IC 10,87–20,38), enquanto para a DIC o valor de CE₅₀ obtido foi 30,75 µg/mL (IC 26,86–35,2). O valor CE₅₀ para HNQ não pôde ser determinado, porque o composto exibiu 100% de atividade em todas as concentrações avaliadas. A DIC apresentou o menor efeito dose-dependente (Tabela 1), pois somente na concentração de 35,00 µg/mL houve porcentagem de inibição diferente de 100%. Entre os valores de CE₉₅ determinados, a CB apresentou CE₉₅ = 39,48 µg/mL (IC 37,48–41,59), enquanto para a DIC o CE₉₅ foi de 320,00 µg / mL (IC 233,2–437,3) (Tabela 2). As larvas foram mais sensíveis às lignanas do que os ovos e a HNQ foi a mais ativa entre todas as substâncias avaliadas (Tabela 2).

4.2.3 Teste de migração larval

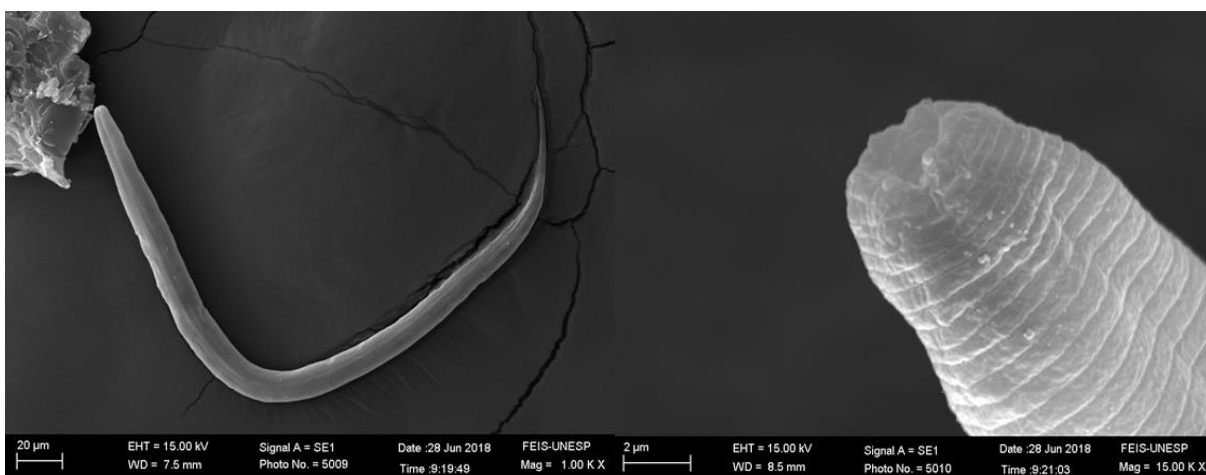
As lignanas inibiram significativamente a migração larval (P <0,05). Os valores de CE₅₀ para CB e HNQ foram respectivamente, 0,89 µg/mL (IC 0,55-1,43) e 0,34 µg/mL (IC 0,09-1,02). Os valores de descritos na tabela 1 indicam um menor efeito dose-dependente desses compostos neste teste do que nos testes de eclodibilidade e desenvolvimento larval. A porcentagem de inibição para a DIC na menor concentração (35 µg/mL) não atingiu valores abaixo de 50% para a determinação precisa do CE₅₀ (Tabela 1). A DIC apresentou CE₉₅ = 240

$\mu\text{g} / \text{mL}$ (IC 145,0-384,4), para outras lignanas o CE_{95} não pôde ser determinado, porque as concentrações avaliadas não atingiram os valores percentuais de inibições necessário para cálculos do CE_{95} (Tabela 1).

4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da L3 após o TML

As alterações estruturais induzidas nas L3 isoladas do TML com as lignanas foram avaliadas usando MEV (Figura 18-21).

Figura 18- Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com o controle negativo (0,5% DMSO)



No tratamento com o controle negativo não se observam alterações nas L3 (Figura 18). Porém a cutícula das L3 foi lesionada com exposição interna do conteúdo e perda de forma cilíndrica, principalmente após o tratamento com HNQ e DIC (Figura 20 e 21).

As principais alterações observadas entre o controle (Figura 18) e as L3 tratadas envolvem principalmente a superfície do corpo (cutícula) das L3 (Figura 19-21).

Figura 19- Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com a cubebina na concentração de 150 µg/mL

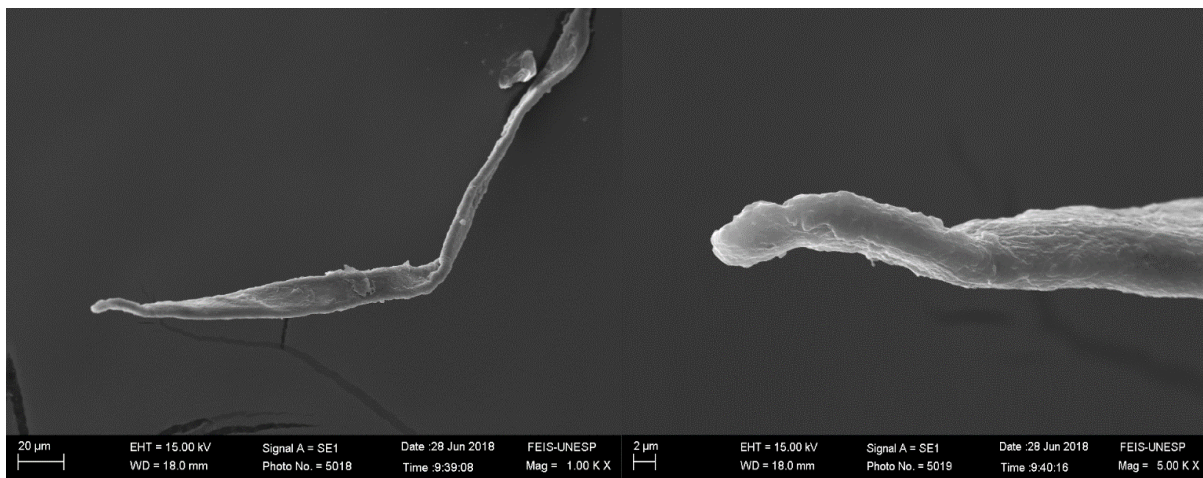


Figura 20- Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com a hinoquinina na concentração de 150 µg/mL

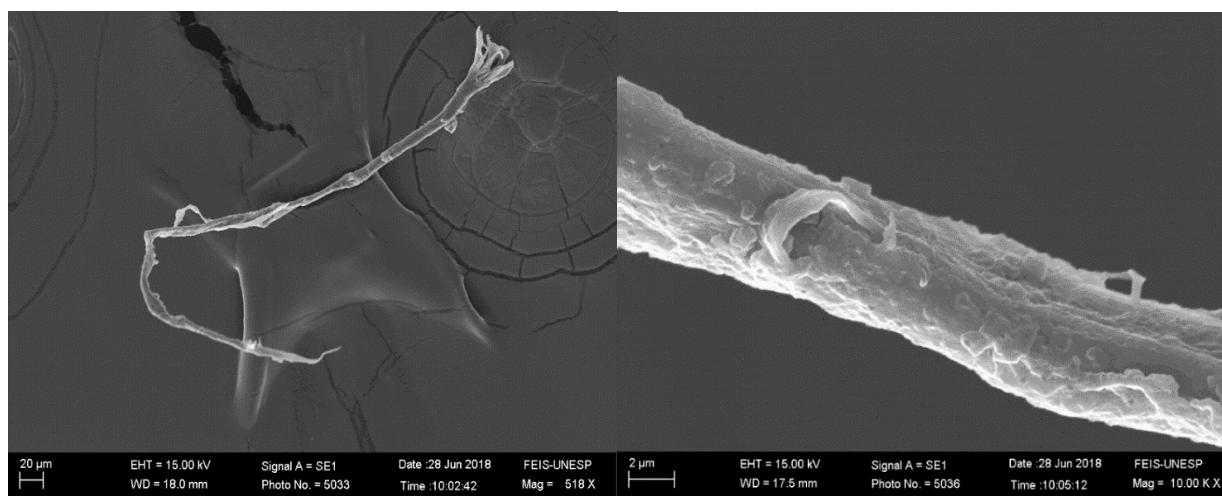
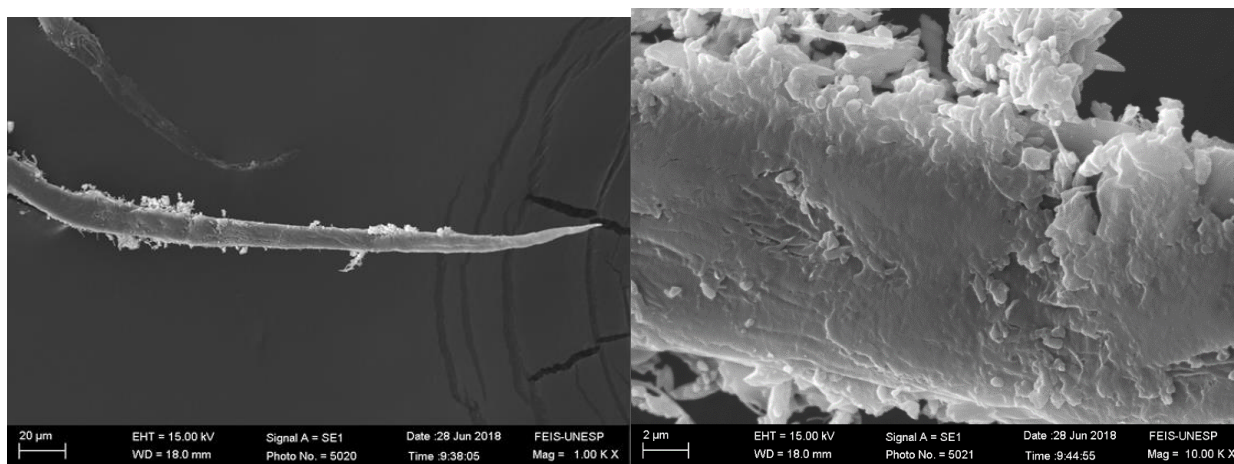


Figura 21-Micrografias do estágio L3 recuperadas do teste de migração larval com a didrocubebina na concentração de 150 µg/mL



5. DISCUSSÃO DOS ENSAIOS *IN VITRO*

A avaliação *in vitro* mostrou as lignanas CB, HNQ e DIC, quando avaliadas separadamente, apresentaram atividade anti-helmíntica *in vitro* significativa e superior à apresentada pelo extrato bruto da *P. cubeba*, avaliado anteriormente, principalmente em relação à sua ação ovicida (CARLIS et al., 2019). Essas três lignanas diferem entre si pelo esqueleto base que apresentam, sendo a HNQ uma lignana butirolactônica, a CUB uma butirolactólica e a DIC uma butanodiólica. A diferença entre elas mostra que a presença do anel lactônico da HNQ tem grande importância em relação à sua atividade ovicida e larvicida em maior grau do que as outras lignanas onde este anel lactônico foi reduzida a lactol na CUB e completamente reduzido na DIC. Na CB e na DIC a presença de hidroxilas pode alterar o mecanismo de ação dessas lignanas em relação ao da HNQ que é mais hidrofóbica.

Estudos sobre a atividade anti-helmíntica de outras plantas do gênero *Piper* foram descritos por Gaínza et al. (2016) que avaliaram os efeitos do óleo essencial de *P. Aduncun*, contra ovos e larvas de *H. contortus*. Os autores obtiveram resultados inferiores aos descritos em nosso estudo, com valores de CE₅₀ de 5,72 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente, para o TE e TDL. O óleo essencial de *P. aduncun* não contém lignanas e a atividade anti-helmíntica foi atribuída ao seu principal constituinte, o dillapiol, que é um composto fenilpropanóico. Em outro estudo realizado por Carvalho et al. (2012), o extrato metanólico da *P. Tuberculum* também apresentou excelente atividade ovicida com DE₅₀ de 0,031 mg / mL contra ovos de nematoides gastrointestinais. No entanto, essa atividade foi atribuída a um conjunto de compostos derivados de piperamida e não às lignanas. Existem vários trabalhos que relatam propriedades anti-helmínticas de outras plantas do gênero *Piper* contra vários tipos de parasitas (ADATE et al., 2012, KOORSE et al., 2018; PAUL et al., 2018). Entretanto, nosso estudo é o primeiro a relatar a atividade das lignanas extraídas da *P. cubeba* contra ovos e larvas de nematoides gastrointestinais de ovinos. Não há relatos anteriores sobre a avaliação *in vitro* de lignanas contra essa classe de parasita. A atividade promissora que apresentamos para essas lignanas deixa claro que esses compostos são capazes de atravessar e danificar a cutícula de ovos e larvas, impedindo a eclosão, o desenvolvimento larval e a motilidade. Entretanto, esses resultados suscitam o interesse em estudar o mecanismo pelo qual elas atuam nas diferentes etapas do ciclo de vida do parasita. Embora eficaz contra todos os estágios do ciclo de vida do parasita que foram avaliados, as lignanas foram mais ativas contra as larvas. Diferenças na estrutura da membrana do ovo e na cutícula das larvas podem interferir na atividade anti-

helmíntica dos compostos avaliados e alterar seus mecanismos de ação. A cutícula do nematóide é um complexo proteico extracelular com pequenas quantidades de lipídios e carboidratos que podem variar entre os estágios de desenvolvimento (MANSFIELD et al., 1992; RIOU et al., 2005). Essas diferenças podem ter contribuído para maior eficiência das lignanas nas larvas do que nos ovos, mas esse não é o único fator a ser considerado. Assim como em nosso resultado, Oliveira et al. (2017) também encontraram resultados com maiores valores de CE₅₀ para TE do que para TDL na avaliação anti-helmíntica *in vitro* de oito extratos de plantas da savana brasileira. Entretanto, Araújo et al. (2018) encontraram valores mais altos de CE₅₀ para o TDL do que para o TE na avaliação anti-helmíntica *in vitro* do óleo essencial da *Eucalyptus citriodora*. Os resultados desses dois autores demonstram que a maior ou menor atividade ovicida ou larvicida de um composto (extrato vegetal ou óleo essencial) depende não apenas das diferenças morfológicas entre ovos ou larvas, mas também de sua natureza química.

As lignanas causaram lesões graves no tegumento das larvas que as levaram à morte, como observado nos estudos de MEV, principalmente em relação ao tratamento com HNQ (Figura 20) e diidrocubebina (Figura 21). Através das micrografias é possível avaliar a interação dos compostos com a cutícula dos helmintos e este tipo de análise tem sido utilizado para demonstrar efeitos diretos de compostos com potenciais efeitos anti-helmínticos (MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE MONTELHANO et al., 2013, ANDRE et al., 2016). O efeito das lignanas na cutícula das larvas foi diferente do obtido por Engstrom et al. (2016) ao avaliar o efeito de taninos obtidos de várias fontes vegetais. Segundo os autores, o dano à cutícula das larvas causado pelos taninos foi pequeno e isolado, enquanto nas lignanas observamos que as lesões estavam sobre todo o corpo do parasita. A perda de motilidade das L3 após o tratamento com as lignanas ocorreu devido a danos cutâneos e alterações da forma cilíndrica, e não devido à paralisia, como ocorre com a ivermectina (LAING et al., 2017). A cutícula fornece aos vermes sua forma, também está envolvida em sua motilidade e nas trocas do parasita com o ambiente, incluindo trocas metabólicas com o ambiente local no trato digestivo do hospedeiro. As alterações estruturais da cutícula descritas no presente estudo poderiam levar a possíveis prejuízos no movimento livre dos nematoides e prevenir a penetração do abomaso mucoso necessário para evoluir para o estágio L4 (LUCIUS et al., 2017).

Nossas descobertas contribuem para a busca de moléculas cujas estruturas químicas podem ser usadas como alvos para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos. Estudos recentes indicaram um aumento da resistência dos GINs aos anti-helmínticos mais usados (KOTZE & PRICHARD, 2016), bem como ao monepantel, pertencente à classe de derivados

de aminoacetonitrila e recentemente comercializado (LECOVÁ et al., 2014; RAMOS et al., 2018). Esse fator agravante aumenta a necessidade de pesquisa de novas alternativas para o controle de parasitas, como a inclusão de extratos ativos como EPC na alimentação de ovinos e a identificação de novas moléculas bioativas para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos. Além disso, essas lignanas também possuem inúmeras propriedades biológicas que podem ser benéficas para os animais, como atividade anti-inflamatória, analgésica, antioxidante (SILVA et al., 2005; NAHAK et al., 2011) e baixa toxicidade. Vários autores avaliaram a toxicidade de EPC e das lignanas por diferentes protocolos. Perazzo et al. (2013) avaliaram a toxicidade do extrato de *P. cubeba* em ratos machos albinos Wistar e encontraram $DL_{50} = 2000$ mg/kg (mg por Kg de peso corporal), e esse resultado foi confirmado posteriormente por Moud et al. (2016). Esperandim et al. (2013) avaliaram o potencial tripanocida de CB e HNQ em camundongos infectados com *T. cruzi* na dose de 50 mg/kg e não observaram toxicidade, tendo os animais tratados com as lignanas maior sobrevivência em relação ao controle negativo. Rezende et al. (2016) avaliaram a citotoxicidade de CB e HNQ em células de fibroblastos LLCMK2 usando o método do MTT e não encontraram citotoxicidade significativa. Portanto, esses estudos indicam que essas lignanas são seguras para uso nas concentrações aqui avaliadas.

Portanto, novas pesquisas com o extrato bruto dos frutos da *P. cubeba* e com as lignanas isoladas ainda devem ser realizadas, particularmente com o objetivo de verificar se a eficácia desses compostos *in vitro* também ocorre *in vivo* em animais infectados com GINs e avaliar as possíveis formas de administração e doses seguras.

O estudo sobre o mecanismo de ação dessas lignanas sobre o *H. contortus* também desperta o interesse devido à crescente busca por novas moléculas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos e uma das ferramentas mais acessíveis para indicar possíveis mecanismos de interação é o docking molecular utilizando enzimas presentes no *H. contortus* como a FTM e a tubulina.

6. RESULTADOS DOS ENSAIOS *IN SÍLICO*

6.1. Preparo das proteínas

6.1.1. β -Tubulina

Como foi anteriormente citado, a estrutura 3-D da β -tubulina do *H. contortus* foi produzida através de modelagem por homologia. Os resultados do modelo construído foram considerados apropriados para o docking, uma vez que o valor negativo de pontuação do Q-Mean (Qualitative Model Energy Analysis), - 6,62, indica a pontuação do modelo como inferior à estrutura experimental (BENKERT, BIASINI & SCHWEDE, 2011). Adicionalmente, estudos de validação do modelo mostraram que 97,2% dos resíduos de aminoácidos da proteína encontram-se nas regiões energeticamente mais favoráveis do diagrama de Rachamandran e 2,1% nas regiões energeticamente permitidas. Somente os resíduos, Leu 263, Val 286 e Val 342 (0,7%) encontram-se nas regiões energeticamente desfavoráveis, porém não afetaram a simulação.

6.1.2. FMT-1 e FMT-2.

Para o *docking* das FMT-1 e 2 foram utilizadas suas estruturas cristalográficas, PDB-ID 4krq e 4krh, respectivamente. Ambas foram preparadas no programa DS 2017 R2 Client, em que foram retirados seus segundos dímeros, suas águas e sua cargas foram calculadas.

6.2. Resultados do *docking*

A precisão dos resultados dos programas é validada por *redocking* (RENNER et al., 2017) em que o desvio quadrático médio (RMSD) de no máximo 2,0 Å, foi estabelecido como limiar (KAGAMI et al., 2017). Já para a análise das interações entre os ligantes e proteínas no *docking* consensual, a partir dos resultados obtidos, apenas as poses consideradas equivalentes foram escolhidas nos três pacotes de *software*, (KAGAMI et al., 2017; AROOJ et al., 2013) ou seja, aquelas que apresentam resultados equivalentes de RMSD ($\leq 2,0$ Å) ou parcialmente equivalentes ($2,0 \text{ \AA} \leq \text{RMSD} \leq 3,0 \text{ \AA}$)

6.2.1. β -tubulina

Os resultados obtidos a partir da análise de *docking* consensual dos complexos lignanas- β -tubulina foram analisados e comparados com os resultados observados no complexo Abz- β -tubulina, por ser este o fármaco de referência.

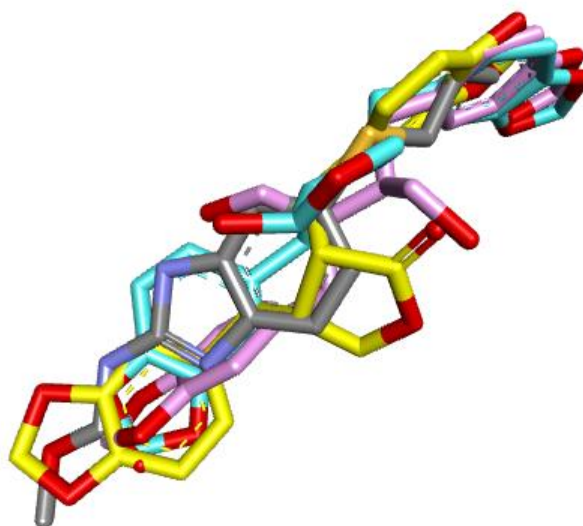
Inicialmente o *redocking* foi realizado a partir do complexo ABZ-So/ β -tubulina, uma vez que o ABZ-So é o composto encontrado na estrutura cristalográfica utilizado como referência na construção da β -tubulina. Os valores de *redocking* (RMSD) encontrados para Autodock 4.2 e Gold 5.3, foram, respectivamente, 0,79 e 1,139, valores estes concordantes para validação do processo. As poses, dos compostos, escolhidas para análise das interações por Docking consensual entre os ligantes e a proteína, a partir dos resultados obtidos pelo *docking* nos diferentes programas apresentarem valores de RMSD descritos na Tabela 3. Os valores referentes ao programa Maestro não foram considerados pois apresentaram valores acima de 3 Å, portanto, para a análise das poses do complexo ligante- β -tubulina foi levado em consideração apenas os resultados dos programas Gold 5.3 e Autodock 4.2.

Tabela 3. Valores de RMSD do ABZ (Albendazol), CB (cubebina), HNQ (hinoquinina) e DIC (diidrocubebina). Gold (G) e Autodock (AD).

Compostos	AD/G
ABZ	0,571
CB	1,603
HNQ	0,48
DIC	1,02

A fim de compreender o modelo de interação das lignanas- β -tubulina foi realizada inicialmente a sobreposição das poses destes compostos com a pose do albendazol. A partir desses resultados foi possível observar excelente sobreposição entre todas as estruturas, indicando que estas lignanas ocupam a mesma região do sitio ativo que o fármaco de referência (Figura 22).

Figura 22- Sobreposições das lignanas com o fármaco de referência ABZ. ABZ (cinza), CB (azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa).



Fonte: Próprio autor

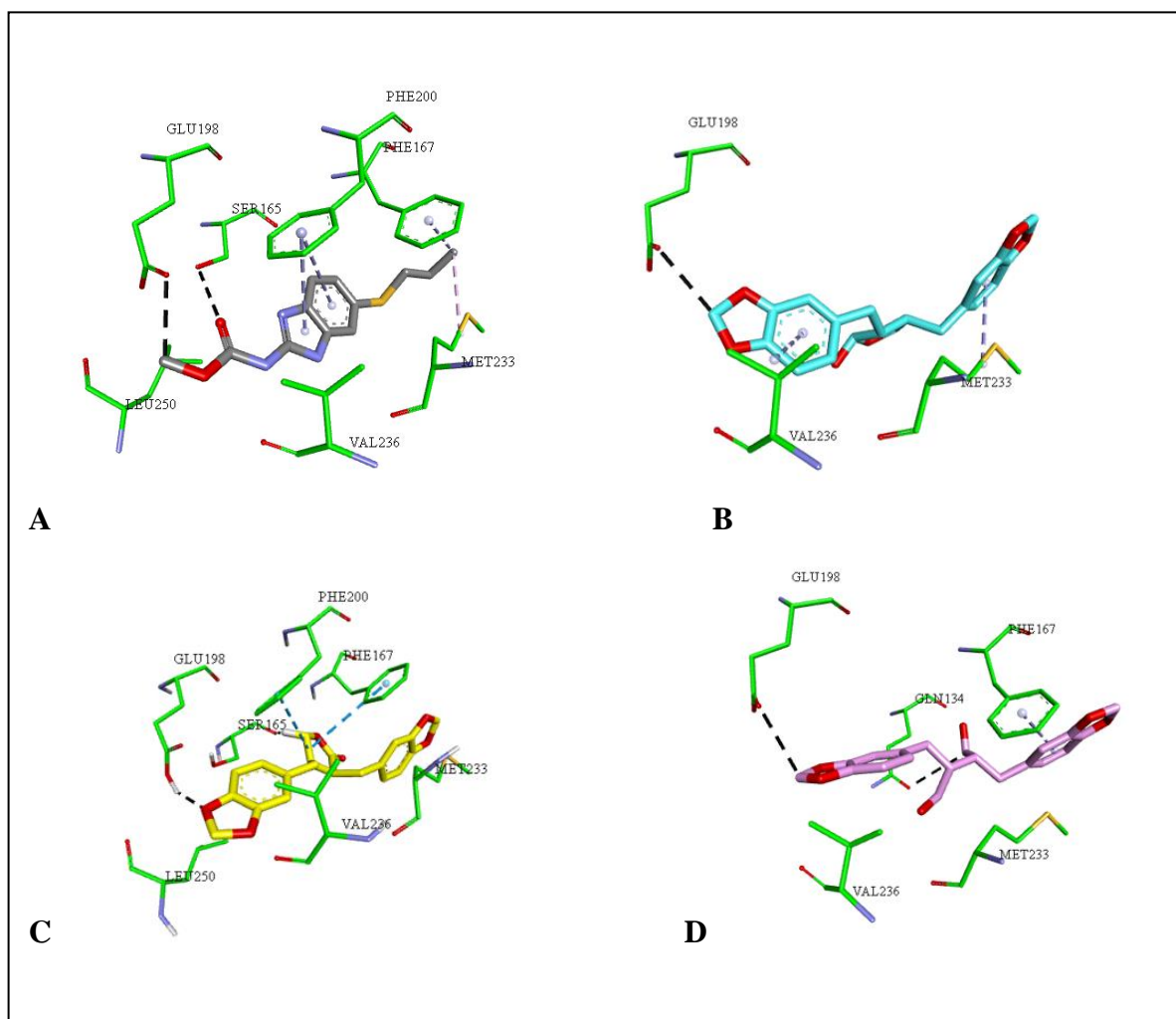
No modelo de interação obtido a partir do *docking* consensual do complexo ABZ- β -tubulina (Figura 23) (Tabela 4) foram observadas interações hidrofóbicas entre o composto e os resíduos Phe 167 2 Phe 200 e ligações de hidrogênio com os resíduos Ser 165 e Glu 198, o que é concordante com a literatura (ROBINSON et al., 2004).

Tabela 4- Interações entre o ligante e os resíduos do sítio ativo da β -tubulina. Mostrando o tipo de interação e os grupos envolvidos nas interações. Ligação de hidrogênio (LH), interações hidrofóbicas (HB), anel aromático (AR), grupo metilenodioxi (MD), metil (ME), carboxilato (CX), purina (PU) e anel lactônico (AL).

Resíduo	ABZ-SO	ABZ	CB	HNQ	DIC
GLN 134					LH/CX
SER 165	LH/IN	LH/CX		LH/AL	
PHE 167	HB/AR	HB/ME	HB/MD	HB/AL	HB/AR
GLU 198	LH/AR	LH/CX		HB/CX	LH/MD
PHE 200	HB/AR	HB/AR		HB/AL	
MET 233		HB/ME	HB/AR	HB/ME	HB/MD
VAL 236		HB/IM		LH/IM	HB/AR
LEU 250		HB/ME			
LEU 253		HB/ME			

De acordo com a literatura, a interação do ABZ com o Phe 167 e Phe 200 são importantes na inibição da β -tubulina no *H. contortus* (ROBINSON et al., 2004; PICHARDT et al., 2001). Como pode ser observado, em relação à hinoquinina na Figura 23 e Tabela 4, são notadas interações hidrofóbicas com os resíduos Phe 167, Glu 198 e Phe 200 e uma ligação de hidrogênio com a Ser 165. Para a diidrocubebina observa-se interação hidrofóbica com o resíduo Phe 167 e ligação de hidrogênio com o Glu 198. Enquanto, para a cubebina foi observado apenas a interação hidrofóbica com o Phe 167.

Figura 23- Resultados das poses, indicando as interações entre os resíduos de aminoácidos e o ligante. ABZ (cinza), CB (azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa). Ligações de hidrogênio (linhas tracejadas pretas) e interações hidrofóbicas (linhas tracejadas lilás).



6.2.2. FMT-1

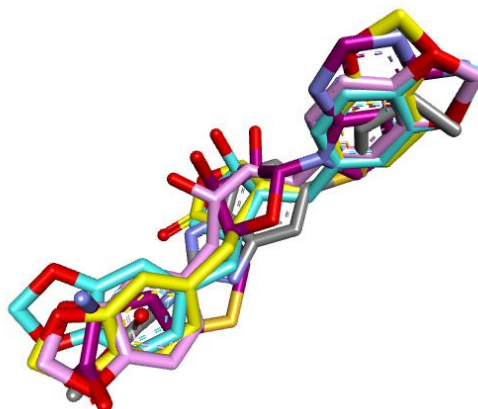
Inicialmente foram realizados ensaios de *redocking* para os três programas (RMSD-Gold 0,953 e Maestro 0,919), utilizando para isso o complexo cristalográfico SAH-FMT1 (PDB ID 4krj). Como pode ser observado, os resultados para o *redocking* estão abaixo do limiar 2,0 Å, resultados estes que validam os processos. Para a análise, no *docking* consensual, das poses resultantes das interações entre os ligantes e a proteínas, foram utilizadas as poses, cujos valores de RMSD obtidos estão descritos na Tabela 5. As análises das poses do complexo ligantes-FMT-1 foram realizadas apenas a partir dos resultados do Gold 5.3 e Maestro 10.1, pois os valores referentes ao programa Autodock 4.2 ficaram acima de 3 Å.

Tabela 5-Valores de RMSD do SAH, CB, HNQ, DHC e ABZ- Gold (G) e Maestro (M).

Compostos	G/M
SAH	0,673
CB	0,578
HNQ	0,762
DIC	0,690
ABZ	1,048

Para melhor compreensão do modelo de interação foram realizadas as sobreposições do ABZ e das lignanas com o SAH. As análises das sobreposições indicaram que todos os compostos avaliados ocupam a mesma região do sítio do SAH, que é o substrato responsável pela ativação da enzima FMT-1 (Figura 24).

Figura 24- Sobreposição do SAH (Roxo) e lignanas na FMT-1. SAH (roxo), ABZ (cinza), CB (azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa).



No modelo de interação realizado por *docking* consensual, no complexo SAH-FMT-1 (Figura 25), foram observadas interações hidrofóbicas com os resíduos Phe 81 e Leu 124 e ligações de hidrogênio com Arg 64, Asp 80, Asp 105 e Tyr 127 (Tabela 6), resíduos estes situados no sítio ativo (LEE et al., 2013). A interação com o resíduo Tyr 127 é importante no papel catalítico na metilação do substrato pela FMT-1, sendo responsável por sua síntese (LEE et al., 2013).

Tabela 6- Interações entre os ligantes e a FMT-1. Ligação de hidrogênio (LH), interações hidrofóbicas (HF), ânion aromático (AR), grupo metilenodioxo (MD), metil (ME) carboxilato (CX), purina (PU) e anel lactônico (AL).

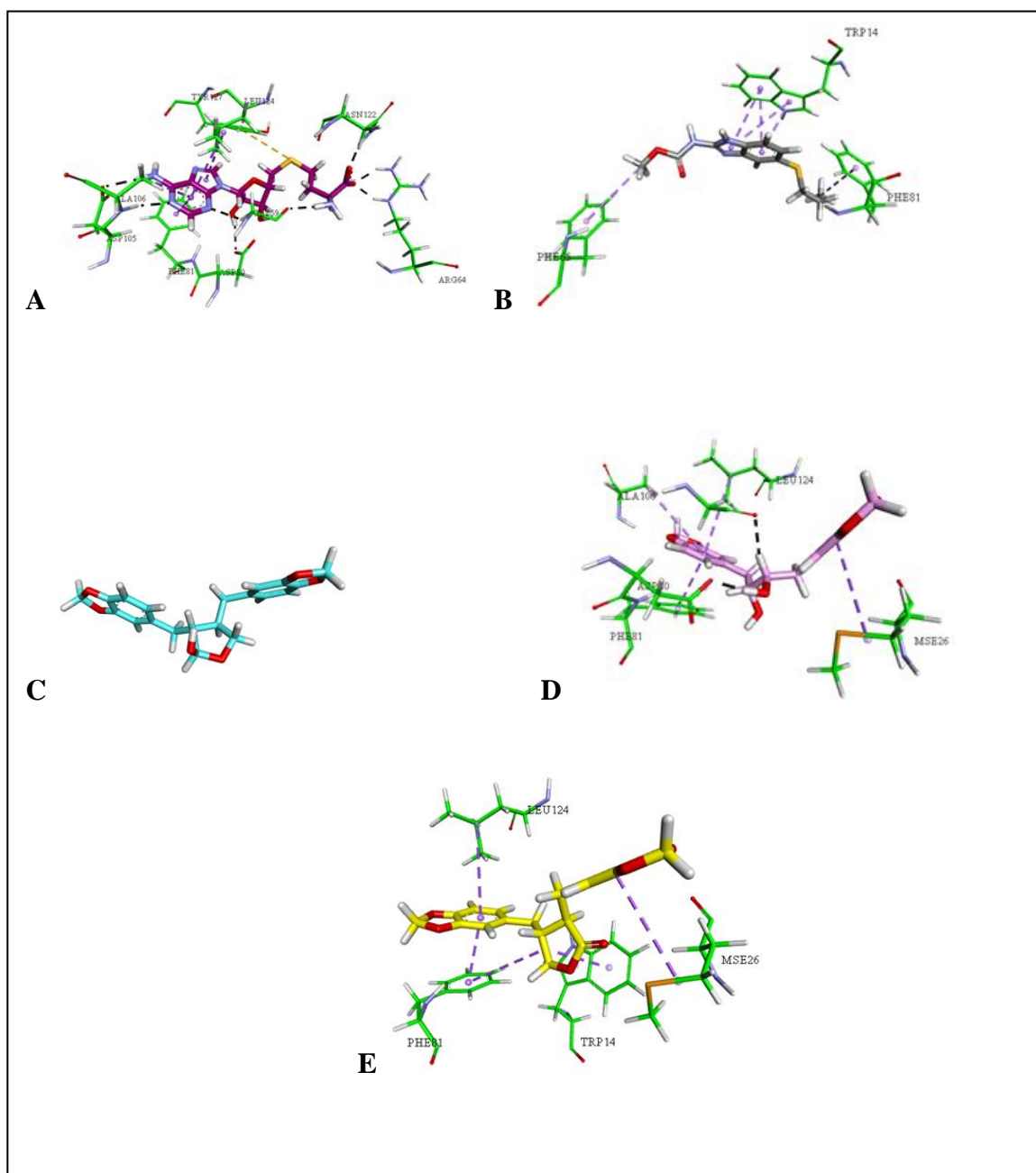
Resíduo	SAH	ABZ	CB	HNQ	DIC
TRP 14		HB/AR		HF/AL	
GLY 53	LH/AR				LH/HX
ARG 64	LH/CX				
PHE 65		HB/ME			
ASP 80	LH/HX				LH/HX
PHE 81	HF/AR	HB/MT		HF/AR	HB/AR
ASP 105	LH/AR				
ALA 106	LH/AR				HB/AR
ASN 122	LH/CX				
LEU 124	HF/AR			HF/AR	HB/AR
TYR 127	LH/AR				

Os resultados para o ABZ (Figura 25) sugerem que o mesmo apresenta apenas interações hidrofóbicas com Phe 65 e Phe 81, resíduos situados no sítio ativo da FMT-1, entretanto, apenas a interação com a Phe 81 é concordante com as observadas no SAH.

A CB, embora também ocupe a mesma região do sítio ativo que o SAH, não apresenta interações com os resíduos situados no sítio ativo, sugerindo que este composto não atua de forma a inibir a atividade da FMT-1.

No modelo de interação da HNQ observa-se interações hidrofóbicas com os resíduos Phe81 e Leu124. A DIC apresenta interações hidrofóbica com Phe81, Leu124 e ligação de hidrogênio com Asp 80. Inicialmente observa-se que nenhum dos quatro compostos interagem com o Tyr 127, resíduo importante para a atividade catalítica da FMT-1.

Figura 25- Resultados das poses, indicando as interações entre os resíduos de aminoácidos e o ligante. SAH (roxo-A), ABZ (cinza-B), CB (azul-C), DIC (rosa- D), HNQ (amarelo-E). Ligação de enxofre (amarelo), Ligação de hidrogênio (preto).



6.2.3. FMT-2

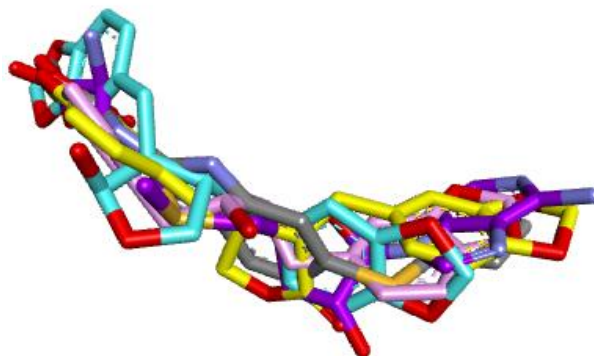
Os mesmos ensaios de *redocking* para a validação dos processos de *docking* molecular nos programas (RMSD Gold 0,87 Å e Maestro 1,65 Å) realizados com a FMT-1 foram também realizados com a FMT-2 usando o complexo cristalográfico SAM-FMT-2 (PDB ID 4krh). Os resultados de RMSD para a FMT-2 foram abaixo de 2 Å, o que torna os processos válidos. Para o *docking* consensual o mesmo procedimento realizado para a β -tubulina e a FMT-1 também foram realizados para a FMT-2 e os resultados dos RMSDs são apresentados na Tabela 7. Os valores referentes ao programa Autodock 4.2 não foram considerados, pois apresentaram valores acima de 3 Å, portanto, para a análise das poses do complexo ligante-FMT-2 foram utilizados somente os resultados dos programas Gold e Maestro.

Tabela 7- Valores de RMSD do SAM, cubebina, hinoquinina, diidrocubebina e ABZ- Gold (G) e Maestro (M).

Compostos	G/M
SAM	1,134
CB	2,373
HNQ	1,087
DIC	2,132
ABZ	1,103

Tal como na FMT-1, a sobreposição dos ligantes presuppõem que as mesmas ocupam a mesma região que o SAM na FMT-2 (Figura 26).

Figura 26- Sobreposição do SAM (Roxo) e lignanas na FMT-1. SAH (roxo), ABZ (cinza), CB (azul), HNQ (amarelo) e DIC (rosa).



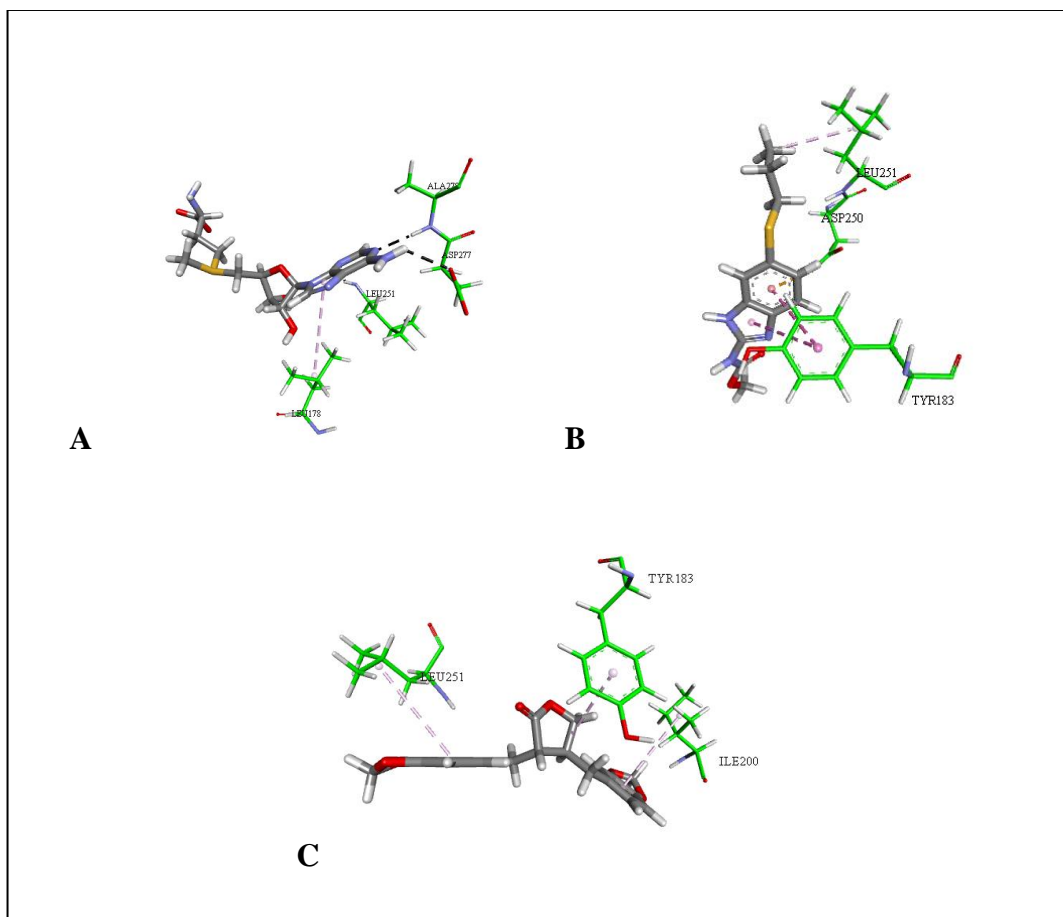
Em relação ao modelo de interação SAM-FMT-2 foram observadas ligações de hidrogênio com o grupo purina do ligante com o resíduo Leu251 e Ala278, grupo amina do ligante e carboxilato do ligante com o resíduo 277, e interação hidrofóbica entre o resíduo Leu178 e o grupo purina do ligante (Tabela 8).

Tabela 8- Interações entre os ligantes e a FMT-2. Ligação de hidrogênio (LH), interações hidrofóbicas (HB), anel aromático (AR), grupo metilenodioxi (MD), metil (ME), hidroxila (HX), metil (MT), carboxilato (CX), purina (PU) e anel lactonico (AL).

Resíduo	SAM	ABZ	CB	HNQ	DIC
Leu 178	HB/PU				
TYR 183		HB/PU		HB/AL	
ILE 200				HB/AR-C7	
ASP 250		ET/AR			
LEU 251	LH/PU	HB/ME		HB/AR-C7'	
ASP 277	LH/PU				
ALA 278	LH/CX				

Para o ABZ foram observadas duas interações hidrofóbicas com Tyr183, uma interagindo com a purina e a outra com o grupo metil. Com relação a HNQ foram observadas interações hidrofóbicas entre a Tyr183 e o grupo lactona, Ile 200 e o anel aromático em C7, e Leu 251 com o anel aromático em C7'. Os resultados para a CB e DIC sugerem que estes compostos não interagem com a FMT-2 (Figura 27).

Figura 27- Modelo de interação entre a FMT-2 e SAM (A), ABZ (B) e HNQ (C). As linhas tracejadas em preto representam ligações de hidrogênio, em lilás interações hidrofóbicas e em amarelo as eletrostáticas



7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS *IN SILICO*

As lignanas cubebina, hinoquinina e diidrocubebina apresentaram resultados promissores nos ensaios *in vitro* contra *H. contortus* e, por isso os ensaios *in silico* visaram avaliar um possível mecanismo de ação através de seus modelos de interação com as enzimas β -tubulina e FMT que são enzimas vitais para a sobrevivência do *H. contortus*. O *docking* consensual permite uma melhor interpretação dos resultados indicando possíveis interação dos ligantes com as proteínas alvos que são capazes de interferir na transformação do substrato natural da enzima inviabilizando o processo que depende dessa transformação.

Em relação à β -tubulina a HNQ foi a lignana com maior semelhança com o ABZ (Tabela 4 e Figura 22). A HNQ, assim como o ABZ apresenta interações hidrofóbicas com Phe 167 e Phe 200, Além da ligação de hidrogênio com a Ser 165 que são de grande relevância na atividade do ABZ sobre essa enzima (ROBINSON et al, 2004 & PRICHARDT et al., 2001). CB e DIC ocupam a mesma região do sítio ativo do ABZ, sendo que, a DIC interge por ligação de hidrogênio com o resíduo Glu 198, tal como o ABZ, essa interação é relevante na atividade inibitória do fármaco no nematoide (ROBISON et al., 2004), porem ambas apresentaram modelos de interação com menor semelhança ao ABZ do que a HNQ.

Os resultados sugerem que o mecanismo de ação da HNQ é bastante semelhante ao do ABZ, sendo que esses resultados corroboram com o que foi observado nos ensaios *in vitro* (Tabelas 1 e 2). Já os resultados apresentados pelas outras lignanas, sugerem que ambas interagem com a tubulina, mas que essa interação não é suficiente para promover a atividade verificada *in vitro* (Tabelas 1 e 2), portanto essas duas lignanas podem atuar sobre o nematoide por outras vias metabólicas.

Para a FMT-1, dos quatro compostos analisados o que apresentou maior semelhança com o modelo de interação do SAH dentro do sítio ativo foi a DIC (Figura 25 e Tabelas 6), mas sem interação com a Tyr 127 (LEE et al., 2013).

Em relação à FMT-2, os compostos que apresentaram maior semelhança do modelo de interação com o SAM no sítio ativo foram o ABZ e a HNQ, devido à interação com Tyr 183 que é um resíduo considerado de grande relevância para catálise (LEE et al., 2013) (Figura 27 e Tabela 8), ambos interagem por meio de uma interação hidrofóbica. Além disso, a HNQ, assim como o SAM, apresenta interação com a Leu 251, embora para a HNQ esta interação seja hidrofóbica ao invés de ligação de hidrogênio como no SAM.

Os resultados sugerem que o ABZ inibe a FMT-2 uma vez que realiza interação relevante com o resíduo responsável pela catalise, mas que também age na β -tubulina, não sendo seletivo para a FMT. A seletividade de compostos para a inibição da FTM é de grande importância, pois essa enzima é específica dos nematoides, enquanto a β -tubulina não é específica e sua inibição pode gerar efeitos colaterais (PESSI et al., 2004; PALAVALLI et al., 2006; BRENDZA et al., 2007).

Os resultados *in silico* quando comparados aos resultados *in vitro*, demonstraram que o mecanismo de ação da HNQ, que se mostrou mais ativa, pode estar relacionado à inibição, tanto da β -tubulina como da FMT-2. Embora sejam necessárias mais pesquisas, os resultados indicam que a HNQ, ainda que não seletiva para a FTM, pode ser usada como alvo promissor em estudos para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos para o controle da infecção causada pelo *H. contortus*.

8. CONCLUSÃO

Os resultados *in vitro* demonstraram atividade anti-helmíntica das lignanas cubebina, hinoquinina e diidrocubebina todas extraídas dos frutos da *P. cubeba* e dentre elas a hinoquinina foi a mais ativa.

Os resultados da modelagem molecular usando essas 3 lignanas demonstraram que a interação da hinoquinina com as enzimas β -tubulina e FMT foi semelhante ao modelo de interação dessas enzimas com o ABZ e, portanto, sugerem que a hinoquinina atua sobre o nematoide por mecanismo semelhante ao do ABZ. A cubebina e a diidrocubebina interagiram em menor grau com a β -tubulina e a FTM e, que essas interações provavelmente não são capazes de inibir a atividade enzimática. Portanto, é de se presumir que a cubebina e a diidrocubebina, que mostraram promissora atividade anti-helmíntica *in vitro*, devam atuar sobre o nematoide por outras vias metabólicas.

REFERÊNCIAS

Abidia, A., Sebai, E., Dhibi, M., Alimi, D., Rekik, M., B'chir, F., Akkari, H. (2018). Chemical analyses and anthelmintic effects of *Artemisia campestris* essential oil. *Veterinary Parasitology*, 263, 59-65.

Adate, P. S., Parmesawaran, S., Chauhan, Y. (2012). *In vitro* anthelmintic activity of stem extracts of *Piper betle* Linn against *Pheritima posthuma*. *Pharmacognosy Journal*, 4(29), 61-65.

Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Hoste, H. (2008). *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 313-319.

AlSaid, M., Mothana, R., Raish, M., Al-Sohaibani, M., Al-Yahya, M., Ahmad, A., Rafatullah, S. (2015). Evaluation of the effectiveness of *Piper cubeba* extract in the amelioration of CCl₄-induced liver injuries and oxidative damage in the rodent model. *BioMed Research International*, 2015:359358.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.

Andersen, R., Newman, J. F. (1973). Societal and individual determinants of medical care utilization in the United States. *The Milbank Memorial Fund Quarterly. Health and Society*, 95-124.

Anderson, N., Martin, P. J., arrett, R. G. (1991). The efficacy of mixtures of albendazole sulphoxide and levamisole against sheep nematodes resistant to benzimidazole and levamisole. *Australian Veterinary Journal*, 68(4), 127-132.

Andre, W. P., Ribeiro, W. L., Cavalcante, G. S., dos Santos, J. M., Macedo, I. T., de Paula, H. C., Bevilaqua, C. M. (2016). Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*, 218, 52-58.

Araújo-Filho, J. V., Ribeiro, W. L., André, W. P., Cavalcante, G. S., Guerra, M. C.M., Muniz, C. R., de Oliveira, L. M. (2018). Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. *Industrial Crops and Products*, 124, 294-299.

Arooj, M., Kim, S., Sakkiah, S., Cao, G. P., Lee, Y., Lee, K. W. (2013). Molecular modeling study for inhibition mechanism of human chymase and its application in inhibitor design. *PloS one*, 8(4).

Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.

Brendza, K. M., Haakenson, W., Cahoon, R. E., Hicks, L. M., Palavalli, L. H., Chiapelli, B. J., McLaird, M., McCarter, J. P., Williams, D. J., Hresko, M. C., Jez, J. M. (2007). Phosphoethanolamine N-methyltransferase (PMT-1) catalyses the first reaction of a new pathway for phosphocholine biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 404(3), 439-448.

Bielska, E., Lucas, X., Czerwoniec, A., Kasprzak, J. M., Kaminska, K. H., Bujnicki, J. M. (2011). Virtual screening strategies in drug design—methods and applications. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 92(3).

Borges, A., Casoti, R., Silva, M. L. A., da Cunha N. L., Pissurno A. P. R., Kawano, D. F., Laurentiz, R. S. (2018). COX Inhibition Profiles and Molecular Docking Studies of the Lignan Hinokinin and Some Synthetic Derivatives. *Molecular Informatics*, 37(12), e1800037.

Bos, R., Woerdenbag, H. J., Kayser, O., Quax, W. J., Ruslan, K., Elfami. (2007). Essential oil constituents of *Piper cubeba* L. filis. from Indonesia. *Journal of Essential Oil Research*, 19(1), 14-17.

Bruce, J. I. (1987). New anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, 17(1), 131-140.

Calixto, J. B. (2019). The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3), e20190105.

Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Morais, S. M., Santos, L. F. L., Rocha, M. F. G., Bevilaqua, C. M. L. (2005). Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 7(3), 97-106.

Carlis, M. S. P, Féboli, A., Laurentiz, A. C., Filardi, R. S., Oliveira, A. H. P., Silva, M.L.A., Anjos, A. L., Magalhães, G. L, Laurentiz, R. S. (2019). *In vitro* anthelmintic activity of the crude hydroalcoholic extract of *Piper cubeba* fruits and isolated natural products against gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, 275, 108932.

Carvalho, C. O., Chagas, A. C. S., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L. G., Chaves, F. C. M., Stephan, M. P., Bizzo, H. R., Amarante, A. F.T. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*, 183, 260-268.

Chan-Pérez, J. I., Torres-Acosta, J. F. D. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Castañeda-Ramírez, G. S., Vilarem, G., Mathieu, C. (2016). *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology*, 217, 53-60.

Chopra, R. N., Nayar, S. L., Chopra, I. C. (1956). *Glossary of Indian medicinal plants*, v. 1, pp. 138-139, New Delhi: Council of Scientific & Industrial Research.

Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2), 35-44.

da Silva, R., de Souza, G. H., da Silva, A. A., de Souza, V. A., Pereira, A. C., Royo, V. A., Silva, M. L. A., Donate, P. M., Carvalho, C. T., Bastos, J. K. (2005). Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(4), 1033-1037.

de Jesus, J. O., da Paz, J. P., Perugini, N., Sakamoto, C. A. M. (2017). Controle de nematódeos gastrintestinais e resistência anti-helmíntica em ovinos na região Sul do Brasil. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 4, 094-094.

de Souza, V. A., da Silva, R., Pereira, A. C., Royo, V. D. A., Saraiva, J., Montanheiro, M., Bastos, J. K., Filho, A. A. S., Grando, D. M., Donate, M. P., Albuquerque, S., Silva, M.L.A. (2005). Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(2), 303-307.

Demessie, Y., Seyoum, Z., Getnet, K., Yitbarek, D. (2016). Anthelmintics Resistance Against Gastrointestinal Nematodes of Sheep: A Review. *World Journal of Agricultural Sciences*, 12(4), 245-253.

Dorny, P., Claerebout, E., Vercruyse, J., Sani, R., Jalila, A. (1994). Anthelmintic resistance in goats in peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology*, 55(4), 327-342.

Duarte, E. R., Silva, R. B., Vasconcelos, V. O., Nogueira, F. A., Oliveira, N. J. (2012). Diagnostic of the control and sensitivity profile of nematodes from sheep to albendazole and levamisole in northern Minas Gerais, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(2), 147-152.

Drudge, J. H., Szanto, J., Wyant, Z. N., Elam, G. (1964). Field studies on parasite control in sheep: comparison of thia-bendazole, ruelene, and phenothiazine. *American Journal of Veterinary Research*, 25(108), 1512-1518.

Echevarria, F. A., Trindade, G. N. (1989). Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil: a preliminary report. *Veterinary Record*, 124(6), 147-148.

- Engström, M. T., Karonen, M., Ahern, J. R., Baert, N., Payré B., Hoste, H., Salminen, J.P. (2016). Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 64, 840–851.
- Esperandim, V. R., da Silva Ferreira, D., Rezende, K. C. S., Magalhães, L. G., Souza, J. M., Pauletti, P. M., Januário, A. H., da Silva de Laurentiz, R. Bastos, K. J., Símaro, G. V., Cunha, W. R., Andrade, S. M. L. (2013). *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of *Piper cubeba*. *Planta Medica*, 79(17), 1653-1655.
- Féboli, A., Laurentiz, A. C., Soares, S. C., Augusto, J. G., Anjos, L. A., Magalhães, L. G., Laurentiz, R. S. (2016). Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 226, 65-68.
- Fortes, F. S., Molento, M. B. (2013). Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(12), 1391-1402.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Shaw, D. E. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739-1749.
- Gaínza, Y. A., Fantatto, R. R., Chaves, F. C. M., Bizzo, H. R., Esteves, S. N., Chagas, A. C. D. S. (2016). *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(4), 383-393.
- Graidist, P., Martla, M., & Sukpondma, Y. (2015). Cytotoxic activity of Piper cubeba extract in breast cancer cell lines. *Nutrients*, 7(4), 2707-2718.
- Günther, J., Bergner, A., Hendlich, M., Klebe, G. (2003). Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using Relibase. *Journal of Molecular Biology*, 326(2), 621-636.

- Hall, M. N., Silhavy, T. J. (1981). Genetic analysis of the ompB locus in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Molecular Biology*, 151(1), 1-15.
- Hassan, M. F. M., Gammaz, H. A., Abdel-Daim, M. M., Abdoel-Motalab, Y. M., Mohammedsalih, K. (2013). Efficacy and safety of albendazole against *Haemonchus contortus* infestation in goats. *Research Zoological*, 3, 31-37.
- Hung, C. L., Chen, C. C. (2014). Computational approaches for drug discovery. *Drug Development Research*, 75(6), 412-418.
- Hunt, K. R., Hong, C., Coles, G. C., Jones, T. O. (1994). Benzimidazole-resistant *Trichostrongylus colubriformis* from goats in central England. *Veterinary Record*, 134(16), 420.
- Jasmer, D. P., Yao, C., Rehman, A., Johnson, S. (2000). Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 105(1), 81-90.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727-748.
- Jorgensen, W. L. (2010). Pulled from a protein's embrace: it is hard to predict how strongly a small molecule will bind to a protein, but this is a crucial goal of computer-aided drug discovery. A new approach models the forcible removal of molecules from a protein's active site. *Nature*, 466(7302), 42-44.
- Joseph-McCarthy, D. (1999). Computational approaches to structure-based ligand design. *Pharmacology & Therapeutics*, 84(2), 179-191.
- Katiki, L. M., Barbieri, A. M. E., Araujo, R. C., Veríssimo, C. J., Louvandini, H., Ferreira, J. F. S. (2017). Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, 243, 47-51.

Kagami, L. P., das Neves, G. M., Rodrigues, R. P., Da Silva, V. B., Eifler-Lima, V. L., Kawano, D. F. (2017). Identification of a novel putative inhibitor of the *Plasmodium falciparum* purine nucleoside phosphorylase: exploring the purine salvage pathway to design new antimalarial drugs. *Molecular Diversity*, 21(3), 677-695.

Kerboeuf, D., Hubert, J. (1985). Benzimidazole resistance in field strains of nematodes from goats in France. *Veterinary Record*, 116(5), 133.

Kerssemakers, J. W., Munteanu, E. L., Laan, L., Noetzel, T. L., Janson, M. E., Dogterom, M. (2006). Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature*, 442 (7103), 709-712.

Keskin, O., Durell, S. R., Bahar, I., Jernigan, R. L., Covell, D. G. (2002). Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin. *Biophysical Journal*, 83(2), 663-680.

Kochapakdee, S., Pandey, V. S., Pralomkarn, W., Choldumrongkul, S., Ngampongsai, W., Lawpetchara, A. (1995). Anthelmintic resistance in goats in southern Thailand. *Veterinary Record*, 137(5), 124-125.

Koorse, K. G., Samraj, S., John, P., Narayanan, P. M., Devi, S. S., Usha, P. T. A., Gleeja, V. L. (2018). Anthelmintic activity of fruit extract and fractions of *Piper longum* L. *In vitro*. *Pharmacognosy Journal*, 10(2), 333-340.

Kotze, A. C., Prichard, R. K. (2016). Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. In *Advances in Parasitology*, v. 93, pp. 397-428. Academic Press.

Kwa, M. S., Veenstra, J. G., Roos, M. H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63(2), 299-303.

Lacey, E. (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, 18(7), 885-936.

Laing, R., Gillan, V., Devaney, E. (2017). Ivermectin—old drug, new tricks? *Trends in Parasitology*, 33(6), 463-472.

Laurentiz, R. S., Borges, A., Laurentiz, A. C., Silva, M. L. A., Martins, C. H. G. (2015). Avaliação da atividade antimicrobiana da lignana diidrocubebina extraída da *Piper cubeba* e de seus derivados semissintéticos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 782-789.

Lecová, L., Stuchlikova, L., Prchal, L., Skalova, L. (2014). Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*, 141(13), 1686-1698.

Lee, S. G., Jez, J. M. (2013). Evolution of structure and mechanistic divergence in di-domain methyltransferases from nematode phosphocholine biosynthesis. *Structure*, 21(10), 1778-1787.

Lima, R. G., Barros, M. T., Laurentiz, R. S. (2018). Medicinal attributes of Lignans extracted from *Piper cubeba*: Current developments. *ChemistryOpen*, 7(2), 180-191.

Lucius, R., Loos-Frank, B., Lane, R. P., Poulin, R., Roberts, C., Grencis, R. K. (2017). *The Biology of Parasites*, 452 p, John Wiley & Sons.

Macedo, I. T. F., Oliveira, L. M. B., Ribeiro, W. L. C., Santos, J. M. L., Silva, K. C., Araújo Filho, J. V., Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Bevilaqua, C. M. L. (2015). Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(3), 268-275.

Magalhães, K., Martins, E., Souza, F., Barbosa, C., Guimarães, V. (2018). Panorama e perspectiva nacional da Ovinocultura e Caprinocultura, *Embrapa Caprinos e Ovinos*. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos, n 8.

Magalhães, L. G., de Souza, J. M., Wakabayashi, K. A., Laurentiz, R. D. S., Vinhólis, A. H., Rezende, K. C., Simaro, G. V., Bastos, K. J., Rodrigues, V., Esperandin, V. R., Ferreira, D. S., Crotti, A. E., Cunha, W. R., Silva, M. L. (2012). *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L.(Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 110(5), 1747-1754.

MAPA, 2017 (Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento) www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos.

Mansfield, L. S., Gamble, H. R., Fetterer, R. H. (1992). Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*-I. Structural components. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 103(3), 681-686.

Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H. (2013). Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology*, 133(3), 281-286.

Mederos, A. E., Ramos, Z., Banchemo, G. E. (2014). First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*, 7(1), 598.

Melo, A. C. F. L. (2005). Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal- Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

Melo, A. C. F. L., Bevilaqua, C. M. L., Villaroel, A. S., Girão, M. D. (1998). Resistência a anti-helmínticos em nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, Estado do Ceará. *Ciência Animal*, 8(1), 7-11.

Mengistu, G., Hoste, H., Karonen, M., Salminen, J. P., Hendriks, W. H., Pellikaan, W. F. (2017). The *in vitro* anthelmintic properties of browse plant species against *Haemonchus*

contortus is determined by the polyphenol content and composition. *Veterinary Parasitology*, 237, 110-116.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos [recurso eletrônico] - n. 2, (dez. 2017) – Dados eletrônicos. Sobral, CE : Embrapa Caprinos e Ovinos, 2017.

Molento, M. B., Veríssimo, C. J., Amarante, A. T., Van Wyk, J. A., Chagas, A. D. S., De Araújo, J. V., Borges, F. A. (2013). Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Arquivos do Instituto Biológico*, 80(2), 253-263.

Nahak, G., Sahu, R.K. (2011). Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(08), 153-157.

Neves, G. M. D. (2015). Planejamento *in silico* de novosinibidores da enzima Guanina Fosforibosil Transferase de *Giardia lamblia* como possíveis candidatos a fármacos antiparasitários. Trabalho de Conclusão de Curso, Farmácia, UFRS.

Nóbrega, A. Estudo aponta tendências para caprinocultura e ovinocultura nos cenários nacional e internacional. Embrapa caprinos e ovinos. Disponível em < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8698648/estudo-aponta-tendenciaspara-caprinocultura-e-ovinocultura-nos-cenarios-nacional-e-internacional>>. 2016.

Oliveira, A. F., Junior, L. M. C., Lima, A. S., Silva, C. R., Ribeiro, M. N., Mesquista, J. W., Vilegas, W. (2017). Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. *Veterinary Parasitology*, 236, 121-127.

Palavalli, L. H., Brendza, K. M., Haakenson, W., Cahoon, R. E., McLaird, M., Hicks, L. M., Jez, J. M. (2006). Defining the role of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from *Caenorhabditis elegans* in phosphocholine biosynthesis by biochemical and kinetic analysis. *Biochemistry*, 45(19), 6056-6065.

- Paul, A., Adnan, M., Majumder, M., Kar, N., Meem, M., Rahman, M. S., Kabir, M. S. H. (2018). Anthelmintic activity of *Piper sylvaticum* Roxb.(family: Piperaceae): *In vitro* and *in silico* studies. *Clinical Phytoscience*, 4(1), 17.
- Perazzo, F. F., Rodrigues, I. V., Maistro, E. L., Souza, S. M., Nanaykkara, N. P. D., Bastos, J. K., De Souza, G. H. B. (2013). Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L.(Piperaceae). *Pharmacognosy Journal*, 5(1), 13-16.
- Pessi, G., Kociubinski, G., Mamoun, C. B. (2004). A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 6206-6211.
- Piza, M. L. S. T., Féboli, A., Augusto, J. G., Anjos, L. A., Laurentiz, A. C., Royo, V. A., Laurentiz, R. S. (2019). *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Psidium cattleianum* Sabine leaves against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Boletim de Indústria Animal*, 76, 1-8.
- Prichard, R. (2001). Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 17(9), 445-453.
- Qi, H., Wang, W. X., Dai, J. L., Zhu, L. (2015). *In vitro* anthelmintic activity of *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 223-227.
- Rabel, B., McGregor, R., Douch, P. G. C. (1994). Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal for Parasitology*, 24(5), 671-676.
- Rajeswari, V. D. (2014). Anthelmintic activity of plants: a review. *Research Journal of Phytochemistry*, 8 (3), 57-63.

Ramos C.I., Bellato V., Ávila V.S., Coutinho G.C., Souza A.P. (2002). Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Rural*, 32,473-477.

Ramos, F., Portella, L. P., Rodrigues, F. D. S., Reginato, C. Z., Cezar, A. S., Sangioni, L. A., Vogel, F. S. (2018). Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(1), 48-52.

Renner, S., Derksen, S., Radestock, S., Mörchen, F. (2008). Maximum common binding modes (MCBM): consensus docking scoring using multiple ligand information and interaction fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48(2), 319-332.

Rezende, K., Lucarini, R., Símaro, G. V., Pauletti, P. M., Januário, A. H., Esperandim, V. R., Silva, M. L. (2016). Antibacterial activity of (-)-cubebin isolated from *Piper cubeba* and its semisynthetic derivatives against microorganisms that cause endodontic infections. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(3), 296-303.

Riou, M., Koch, C., Delaleu, B., Berthon, P., Kerboeuf, D. (2005). Immunolocalisation of an ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and cuticles of free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, 96(3), 142-148.

Robinson, M. W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I. (2004). A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23(3), 275-284.

Rodrigues, A. B., Athayde, A. C. R., Rodrigues, O. G., Silva, W. W., Faria, E. B. (2007). Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão P anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(4), 162-166.

Szczesny-Moraes, E. A., Bianchin, I., Silva, K. F. D., Catto, J. B., Honer, M. R., Paiva, F. (2010). Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(3), 229-236.

Silva, M.L., Coímbra, H.S., Pereira, A.C., Almeida, V.A., Lima, T.C., Costa, E.S., Vinhólis, A.H., Royo, V.A., Silva, R., Silva Filho, A.A., Cunha, W.R., Furtado, N.A., Martins, C.H., Carvalho, T.C., Bastos, J.K. (2007). Evaluation of Piper cubeba extract, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Phytotherapy*, 21(5), 420–422.

Silvestre, A., Cabaret, J. (2002). Mutation in position 167 of isotype 1 β -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(2), 297-300.

Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E. W. (2014). Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 334-395.

Soares, S. C. S, Lima, G. C., Laurentiz, A.C, Féboli, A., Anjos, L. A., Carlis, M. S. P, Laurentiz, R. S. (2018). *In vitro* anthelmintic activity of grape pomace extract against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(2), 243-247.

Soldera-Silva, A., Seyfried, M., Campestrini, L. H., Zawadzki-Baggio, S. F., Minho, A. P., Molento, M. B., Maurer, J. B. B. (2018). Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of *Persea americana* seed extracts. *Veterinary Parasitology*, 251, 34-43.

Sousa, R. G., Falcão, H. S., Barbosa Filho, J. M., Melo Diniz, M. F. F., Batista, L. M. (2013). Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(2), 287-292.

Souza, P. N. S. (2009). Eficácia de extratos vegetais para o controle da helmintose ovina, no Norte de Minas Gerais. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

- Suroowan, S., Javeed, F., Ahmad, M., Zafar, M., Noor, M. J., Kayani, S., Mahomoodally, M. F. (2017). Ethnoveterinary health management practices using medicinal plants in South Asia—a review. *Veterinary Research Communications*, 41(2), 147-168.
- Theodorides, V. J., Scott, G. C., Laderman, M. (1970). Strains of *Haemonchus contortus* resistant against benzimidazole anthelmintics. *American Journal of Veterinary Research*, 31(5), 859-863.
- Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371-390.
- Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P. (2015). *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*, 209(3-4), 278-280.
- Van Wyk, J. A., Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80(1), 539.
- Venkatesan, V. (1998). Albendazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 145-147.
- Venturini, C. D., Engroff, P., Ely, L. S., Tasca, T., De Carli, G. A. (2014). Interações entre antiparasitários e alimentos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 35(1), 17-23.
- Vieira, L. S., Cavalcante, A. C. R. (1999). Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 19(3-4), 99-103.
- Witola, W. H., Matthews, K., McHugh, M. (2016). *In vitro* anthelmintic efficacy of inhibitors of phosphoethanolamine Methyltransferases in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(1), 44-53.

Zacharias, F. Controle alternativo da infecção por *Haemonchus contortus* em ovinos: avaliação do tratamento homeopático. 2014. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Tropical - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador

Zenebe, S., Feyera, T., Assefa, S. (2017). *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of aerial parts of *Cissus quadrangularis* L. and leaves of *Schinus molle* L. against *Haemonchus contortus*. *BioMed Research International*, 2017, 1905987.