

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

ATIVIDADE ANTI-*Trichomonas vaginalis* DE SAPONINAS

Tábitha Dahmer Rocha

Porto Alegre, junho de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

ATIVIDADE ANTI-*Trichomonas vaginalis* DE SAPONINAS

Tábitha Dahmer Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutico, pelo curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof. Dra. Grace Gosmann

Co-orientadora: Prof. Dra. Tiana Tasca

Porto Alegre, junho de 2010.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Dra. Grace Gosmann, pela orientação e amizade durante todo o período de iniciação científica.

À Prof. Dra. Tiana Tasca, pela co-orientação e estímulo durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Simone Gnoatto e a Prof. Dra. Marilise Rott por aceitarem fazer parte da banca examinadora do meu trabalho de conclusão.

Às alunas do Laboratório de Fitoquímica e do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia pela convivência e apoio.

À Patrícia, pela paciência e muito auxílio durante a execução dos experimentos.

À Adri, minha mestranda preferida, pelos momentos ruins e maravilhosos que passamos juntas.

À Mônica, por me incomodar e dizer que só me incomoda por que gosta muito de mim.

À Soraia, Lucimara, Cíntia, Marina e Bruna, bolsistas e grandes amigas do Laboratório de Fitoquímica, pelos momentos que passamos juntas!

Aos meus pais pelo incentivo, educação e amor, aspectos essenciais que me fizeram chegar até aqui. Dedico essa realização a vocês!

À toda a minha família, por entenderem as minhas ausências.

Ao Otávio, meu namorado, por entender mais do que ninguém todas as dificuldades e alegrias que passei durante a graduação, enfim, por ser meu companheiro e amigo.

Este trabalho foi escrito em formato de artigo científico da revista Parasitology Research, cujas normas para submissão de artigo estão contidas no anexo 1.

Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de saponinas

Tábitha Dahmer Rocha¹, Patrícia de Brum Vieira², Adriana Gregory Barlette¹,
Tiana Tasca², Grace Gosmann¹

¹Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Produção de Matéria Prima;

²Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Departamento de Análises;

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor correspondente: Grace Gosmann

Fone: (51) 33085526

E-mail: grace.gosmann@ufrgs.br

Resumo

Trichomonas vaginalis é o protozoário que parasita o trato urogenital humano, causando a tricomonose, uma doença sexualmente transmissível de importância mundial. A partir de relatos de efeitos adversos graves e toxicidade causados pelo metronidazol, fármaco de escolha no tratamento da tricomonose, bem como do aparecimento de resistência dos parasitos a essa medicação, demonstrou-se necessária a pesquisa por novas substâncias com atividade anti-*T. vaginalis* e efeitos adversos menos intensos. Nesse aspecto, saponinas são compostos vegetais com caráter anfifílico, para os quais já foram descritas diversas atividades biológicas, inclusive a antiprotozoária. Para se testar a

atividade anti-*T. vaginalis* de saponinas e seu mecanismo de ação em membrana de parasitos, oito frações de saponinas foram selecionadas. Estas foram incubadas com trofozoítos de *T. vaginalis* em um teste de suscetibilidade *in vitro*, o qual demonstrou que os extratos butanólico das folhas de *Ilex paraguariensis* e aquoso de *Quillaja brasiliensis* e as frações de saponinas de *Gypsophila* sp., *Quillaja saponaria* e *Passiflora alata* tiveram atividade anti-*Trichomonas*. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de cada fração testada foram determinadas e variaram de 0,025% até 0,1%. A fim de investigar o mecanismo de ação das saponinas ativas, na célula do parasito, foram realizados experimentos envolvendo lise de hemácias e dosagem da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) por trofozoítos de *T. vaginalis*. Todas as saponinas com atividade anti-*T. vaginalis* causaram aproximadamente 100% de hemólise e levaram a liberação de até 50% do conteúdo total de LDH dos parasitos, quando testadas em suas respectivas CIM. Esses resultados apontam para uma ação das saponinas em membranas celulares.

Palavras-chave: saponinas, *Trichomonas vaginalis*, atividade anti-*T. vaginalis*, hemólise, membrana, lactato desidrogenase.

Introdução

Tricomonose é a doença sexualmente transmissível não-viral mais comum no mundo. Estima-se que 180 milhões de pessoas sejam acometidas por essa doença por ano no mundo, principalmente aquelas pertencentes a grupos de baixo nível socioeconômico (WHO 2001). A infecção é causada por *Trichomonas*

vaginalis, protozoário flagelado patogênico que parasita o trato urogenital humano. A tricomonose é uma doença que apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo desde casos assintomáticos a graves vaginites e está associada a sérios problemas de saúde, doença inflamatória pélvica (Cherpes et al. 2006), câncer cervical (Zhang e Begg 1994), complicações na gravidez (Cotch et al. 1997), infertilidade (Goldstein et al. 1993) e, possivelmente, câncer de próstata (Stark et al. 2009). Além disso, estudos prévios apontaram *T. vaginalis* como um facilitador da transmissão do vírus HIV (Van Der Pol et al. 2008). Os sintomas da infecção aguda causada por *T. vaginalis* incluem vaginite difusa com secreção mucopurulenta amarelo esverdeada e pontos hemorrágicos na mucosa vaginal, sinal clínico conhecido como *colpitis macularis* (Honigberg 1990). Enquanto isso, na infecção crônica os sintomas se tornam mais suaves, com prurido e diminuição da secreção. As infecções dos tipos crônica e assintomática, as quais ocorrem em 25 a 50% dos casos, são mais preocupantes por serem a principal fonte de disseminação da tricomonose. A infecção por *T. vaginalis* é comumente assintomática em homens (Petrin et al. 1998, Lehker e Alderete 2000).

Para o tratamento da tricomonose e de outras infecções causadas por protozoários, são utilizados fármacos clássicos da classe dos nitroimidazólicos, como metronidazol e tinidazol. O metronidazol é um pró-fármaco e sua ativação se baseia na redução do grupo nitro presente em sua molécula, após sua entrada na célula do parasito, permitindo então a ação no DNA da célula (Tracy e Webster Jr. 2003). Porém, esses medicamentos causam efeitos adversos como náusea, sonolência, cefaléia, urticária (Honigberg 1990, Kapoor et al. 1999) e ainda possuem riscos de carcinogenicidade e mutagenicidade (Friedman et al. 2009;

Mudry et al. 1995). Além disso, existem estudos relatando resistência dos parasitos aos fármacos nitroimidazólicos (Grossman e Galask 1990, Sobel et al. 1999). Os mecanismos de resistência podem ser de dois tipos: aeróbico e anaeróbico. A resistência aeróbica ocorre por interferência do excesso de oxigênio intracelular no processo de redução do fármaco, o qual é essencial para sua ação. Por sua vez, a resistência anaeróbica se desenvolve *in vitro* e é caracterizada pela perda de vias responsáveis pela redução do fármaco no metabolismo do parasito, fazendo com que ela não ocorra (Kulda 1999). Considerando a prevalência e relevância da tricomonose, bem como os problemas relacionados à utilização dos fármacos nitroimidazólicos, torna-se necessária a pesquisa por novos e potentes agentes anti-protozoários, e que gerem poucos efeitos adversos.

Atualmente, moléculas sintéticas e produtos naturais são exaustivamente estudados como potenciais fontes de atividade antiparasitária (Anthony et al. 2005). Os produtos naturais vêm sendo utilizados popularmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais causados por protozoários como *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (Calzada et al. 2006; Fernandez et al. 2005). Além disso, também existem estudos pré-clínicos relatando a ação antiprotozoária de produtos naturais. Nesses estudos, destacam-se extratos de plantas (Vidal et al. 2007; Barbosa et al. 2006) e substâncias isoladas, como flavonóides (Barbosa et al. 2007), com atividade anti-*Giardia lamblia*, alcalóides com atividade anti-*Trichomonas gallinae* (Adebajo et al. 2006), cumarinas que estão associadas à ação anti-*Acanthamoeba castellanii* (Ródio et al), assim como saponinas, que demonstraram ação contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma* sp. (Vermeersch et al. 2009; Taketa et al. 2004) e glicosídeos, os quais foram ativos contra

diferentes protozoários do gêneros *Trypanosoma*, além de espécies como *Leishmania donovani* e *Plasmodium falciparum* (Tasdemir et al. 2008).

Por sua vez, as saponinas são metabólitos secundários de plantas, que possuem núcleo triterpênico ou esteróide, o qual é apolar, sendo ligado a um ou mais açúcares, que são polares. Suas características estruturais levam esses compostos a serem anfifílicos, possuindo então um caráter detergente (Guclu-Unstundag e Mazza 2007). Outras atividades farmacológicas já foram relatadas para essa classe de compostos, como anticoagulante (Mendes-Silva et al. 2003), imunoadjuvante (Fleck et al. 2006), antitumoral (Xiao et al. 2009), hipocolesterolêmica (Zhao et al. 2008), antiviral (Rattanathongkom et al. 2009) e antifúngica (Coleman et al. 2010).

Tiwari et al. (2008) descreveu a atividade anti-*T. vaginalis* de uma fração de saponinas extraídas dos frutos de *Sapindus mukorossi*. Nesse estudo, entre as vias que compõem o mecanismo de ação sugerido destacam-se a inibição da citoaderência de trofozoítos de *T. vaginalis* por ação na membrana celular e a ruptura do citoesqueleto do parasito. As saponinas são compostos com caráter detergente e que tem provável ação sobre o colesterol de membranas, podendo causar sua lise, como acontece em eritrócitos (Oda et al. 2000). Sendo assim, pode-se considerar o efeito de saponinas em membranas de parasitos um interessante objeto de estudo.

Nosso grupo de pesquisa vem estudando atividades farmacológicas de saponinas, provenientes de diversas espécies de plantas. Neste trabalho se investigou a atividade anti-*T. vaginalis* de algumas dessas saponinas, bem como a

capacidade de lisar as membranas de *T. vaginalis* como provável mecanismo de ação das saponinas.

Materiais e Métodos

1. Frações enriquecidas de saponinas

Oito amostras contendo saponinas foram selecionadas. O extrato butanólico das folhas de *Ilex paraguariensis* (S1), o extrato butanólico das folhas de *Passiflora alata* (S2) e o extrato aquoso de *Quillaja brasiliensis* (S3) foram previamente preparados em nosso laboratório (Gosmann et al. 1995, Reginatto et al. 2001, Fleck et al. 2006). As frações de saponinas de *Gypsophila* sp. (S4) e do extrato de *Quillaja saponaria* (S5) foram adquiridas comercialmente da Merck e Acros Organics, respectivamente. As frações enriquecidas em saponinas (S6) e flavonóides (S7) de *Passiflora alata* foram obtidas através do fracionamento de S2 utilizando uma resina de separação por tamanho molecular, Sephadex LH-20 (Reginatto et al. 2001). Por fim, a fração de saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* (S8) resultou da purificação de um extrato hidroetanólico utilizando-se uma coluna cromatográfica de sílica gel e fase móvel contendo diferentes proporções de clorofórmio, etanol e água. Todas as amostras testadas foram solubilizadas em água Milli-Q na concentração de 0,4% e posteriormente, esterilizadas por filtração com membrana de poros de 0,22 µm da Millipore.

2. Cultura de trofozoítos de Trichomonas vaginalis

Neste estudo, foi utilizado o isolado clínico fresco de *T. vaginalis* TVLACM1, isolado em março de 2010, o qual é sensível ao metronidazol. Os parasitos foram cultivados anaerobicamente *in vitro* em meio *trypticase-yeast extract-maltose* (TYM), pH 6,0, e suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado pelo calor e incubados a 37 °C ($\pm 0,5$) (Diamond 1957). Os trofozoítos do isolado foram mantidos no máximo por uma semana em cultura, a fim de manter as características do isolado clínico fresco. A criopreservação do isolado foi realizada conforme Honigberg (1990). Culturas com mais de 95% de trofozoítos exibindo motilidade e morfologia normal foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em meio TYM, a fim de se obter as densidades de $4,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^5$ trofozoítos/mL, para então serem utilizados nos testes.

3. Curva de trofozoítos

Curvas de trofozoítos de *T. vaginalis* foram realizadas conforme metodologia previamente descrita por nosso grupo (Duarte et al. 2009). Para isso foram adicionados 100 μ L de meio TYM em cada poço e 100 μ L de um inóculo contendo $4,0 \times 10^6$ trofozoítos/mL no primeiro poço da curva. Após, foi conduzida uma diluição em série. A seguir, foi completado o volume final de 200 μ L nos poços com meio TYM. A diluição em série gerou uma curva com concentrações decrescentes de células de 1×10^6 , 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, $1,25 \times 10^5$, $6,25 \times 10^4$, $3,12 \times 10^4$, $1,56 \times 10^4$, $7,81 \times 10^3$ trofozoítos/mL. Esse procedimento foi repetido em todos os experimentos, a fim de verificar a linearidade do inóculo utilizado nos

experimentos e atribuir valores de fluorescência a concentrações conhecidas de trofozoítos.

4. *Ensaio de suscetibilidade*

A fim de determinar a citotoxicidade das oito amostras contendo saponinas frente a *T. vaginalis*, um ensaio de suscetibilidade foi realizado *in vitro*. Para isso, 100 µL de meio TYM foram adicionados em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 100 µL das amostras (S1-S8), solubilizadas na concentração de 0,4%, foram adicionados nos primeiros poços de cada coluna. Seguiu-se com uma diluição seriada, conforme descrito anteriormente. Por fim, foram adicionados 100 µL de uma suspensão de trofozoítos de *T. vaginalis* contendo $1,0 \times 10^5$ trofozoítos/mL, gerando um volume final de 200 µL em cada poço. Desse modo, a densidade final de trofozoítos em cada poço foi de $5,0 \times 10^4$ trofozoítos/mL e as concentrações das amostras de saponinas (em %): 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,001562. Após 24 horas de incubação a 37°C, a placa foi visualizada utilizando um microscópio invertido, observando-se a viabilidade celular em todos os poços. Foram realizados três experimentos, cada um em triplicata.

5. *Determinação da viabilidade celular por método fluorimétrico*

Após a visualização das placas em microscópio, as mesmas foram utilizadas para a execução da quantificação de trofozoítos viáveis por método fluorimétrico previamente descrito por [Duarte et al. \(2009\)](#). Para determinar os

valores de fluorescência dos controles e parasitos tratados com as amostras, foram adicionados 20 µL de uma solução de sal de resazurina a 0,1 mg/mL. Essa substância é capaz de ser reduzida por células vivas presentes no meio, emitindo fluorescência. Após uma hora, a microplaca foi submetida à leitura em um leitor de microplacas Spectramax Gemini XS. A viabilidade dos trofozoítos, expressa em %, nas diferentes concentrações das amostras de saponinas testadas foi calculada em comparação ao controle, o qual continha apenas meio TYM e cultura de trofozoítos e cujo valor de fluorescência foi atribuído como 100% de viabilidade. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada fração ativa contra trofozoítos de *T. vaginalis* foi determinada.

6. Ensaio de hemólise

Com a intenção de se relacionar a atividade de saponinas em lise de membranas de eritrócitos à atividade em membranas celulares de parasitos, foi realizado um ensaio de hemólise com as frações de saponinas ativas no ensaio de suscetibilidade e em suas respectivas CIM. Para isso, foi utilizado o método descrito por [Gauthier et al. \(2009\)](#) com algumas modificações. Sangue do tipo O positivo de voluntários humanos sadios foi coletado com solução de Alsever (2,05% de glicose, 0,8% de citrato de sódio, 0,055% de ácido cítrico e 0,42% de cloreto de sódio) em proporção (1:1) e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. A fração eritrocítica foi submetida a três lavagens com tampão PBS 1x pH 7 e então ressuspendida nesse mesmo tampão para obter uma suspensão de eritrócitos a 1% (v/v). Para serem testadas, as amostras foram dissolvidas em água Milli-Q

para obter uma concentração de 0,4%. A escolha das concentrações das amostras se baseou na CIM determinada no experimento de suscetibilidade. Um volume de 1,1 mL da suspensão de eritrócitos a 1% foi adicionado a microtubos de 2,0 mL e então 400 µL de solução da amostra e/ou água foi adicionado para obter uma concentração final de aproximadamente 0,7% de eritrócitos. Os microtubos foram incubados a 37 °C sob agitação por 60 minutos e logo foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi então medida a 540 nm. O experimento foi executado em triplicata. A porcentagem de hemólise causada por cada amostra testada foi calculada em comparação aos 100% de hemólise atribuídos à ação hemolítica da fração comercial de saponinas do extrato de *Quillaja saponaria* (S5) (Sun et al. 2008).

7. Determinação da liberação de LDH

A fim de investigar o mecanismo de ação das frações de saponinas que apresentaram atividade anti-*T. vaginalis*, foi testada a ação em membrana celular. Para isso, o rompimento da membrana plasmática foi avaliado a partir da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) para o meio de incubação. Em microtubos de 2,0 mL, foram adicionados 250 µL de meio TYM e 250 µL de cada amostra ativa em concentração suficiente para manter a concentração final no tubo equivalente à CIM previamente determinada. Os controles positivos e negativos continham 250 µL de água Milli-Q estéril. O volume final de 1,0 mL em cada tubo foi alcançado com a adição de 500 µL de um inóculo de *T. vaginalis* com densidade de $1,0 \times 10^5$ trofozoítos/mL gerando uma densidade

final de $5,0 \times 10^4$ trofozoítos/mL. Após incubação por 24 horas a 37° C, o controle positivo foi lisado em nitrogênio líquido por um minuto e então todos os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por cinco minutos. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente no sobrenadante, por quantificar a taxa de formação de NADH a 500 nm usando kit cinético comercial Labtest. A atividade da enzima LDH em cada tubo teste foi comparada com o 100% de atividade de LDH liberada por lise total de parasitos do controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata.

Resultados

1. Suscetibilidade de trofozoítos de *T. vaginalis* a frações de saponinas

Quando visualizados no microscópio invertido, os parasitos dos controles e curvas de trofozoítos estavam viáveis. A viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* submetidos a tratamento com as frações de saponinas foi também observada em microscópio. Porém o resultado de suscetibilidade às amostras foi confirmado e determinado quantitativamente pela medida de fluorescência após a adição do sal de resazurina. A fluorescência emitida pelos trofozoítos, tratados com concentrações de 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,001562% de frações de saponinas, ao reagir com a resazurina foi comparada à fluorescência do controle de trofozoítos viáveis, o qual correspondia a 100% de viabilidade. De oito frações testadas (S1-S8), cinco foram ativas, reduzindo o número de trofozoítos viáveis à zero. O extrato butanólico das folhas de *Ilex paraguariensis* (S1) quando em concentrações abaixo de 0,0125%, praticamente não alterou a viabilidade do parasito, mas na concentração de 0,05% apresentou atividade anti-

T. vaginalis máxima, sendo esta então considerada a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato para *T. vaginalis* (Fig. 1A). O extrato aquoso das folhas de *Quillaja brasiliensis* (S3) gerou uma atividade dose-dependente na morte dos trofozoítos, chegando a uma viabilidade de aproximadamente 2% na maior concentração testada, a de 0,1%, que foi então considerada a CIM desse composto (Fig. 1C). A fração comercial de saponinas de *Gypsophila* sp. (S4) também foi ativa e em concentrações a partir de 0,0125% causou citotoxicidade aos trofozoítos. Porém a concentração de 0,1% apresentou atividade anti-*T. vaginalis* máxima e foi considerada a CIM de S4 (Fig. 1D). Outra fração comercial de saponinas, a do extrato de *Quillaja saponaria* (S5) também apresentou atividade anti-*T.vaginalis*. Desde a concentração de 0,0015%, a mais baixa concentração testada, S5 já causava morte em mais de 75% dos trofozoítos em comparação com o controle. A CIM determinada para essa fração foi de 0,025% (Fig. 1E). A fração enriquecida em saponinas das folhas de *Passiflora alata*, assim como S1, não apresentou atividade em concentrações mais baixas, mas a partir de 0,025% gerou viabilidade zero de parasitos, sendo essa concentração considerada sua CIM (Fig. 1F). As outras três frações testadas (S2, S7 e S8) não demonstraram atividade anti-*T. vaginalis* (Figs. 1B, G e H, respectivamente). Sendo assim, os ensaios para a elucidação de mecanismo de ação foram executados somente com as cinco amostras de saponinas com atividade anti-*T. vaginalis* (S1, S3, S4, S5 e S6).

2. Hemólise por saponinas

As frações de saponinas que apresentaram atividade anti-*T. vaginalis* no experimento de suscetibilidade foram testadas em ensaio de hemólise. Esse ensaio foi realizado para determinar a ação dessas frações em membrana de células, usando a de eritrócitos como protótipo. Como pode ser visualizado na [tabela 1](#), as frações S1, S3, S4 e S6, testadas na CIM pré-determinada, causaram aproximadamente 100% de lise de eritrócitos comparando aos 100% de hemólise causada pela fração S5, com base em que essa foi utilizada como controle positivo.

3. *Determinação da liberação de LDH citosólica*

As frações S1, S3, S4, S5 e S6 foram incubadas com trofozoítos de *T. vaginalis* conforme condições previamente utilizadas no ensaio de suscetibilidade, mas somente na concentração correspondente à CIM de cada substância. Para testar a ação das frações ativas em membrana dos parasitos, a atividade da enzima citosólica lactato desidrogenase foi determinada. Como está expresso no gráfico da [figura 2](#), S1, S3, S4, S5 e S6 causaram a liberação de aproximadamente 50% de LDH em comparação ao controle positivo, o qual teve 100% de liberação de LDH pela lise total de trofozoítos utilizando nitrogênio líquido.

Discussão

Desde muitos anos, nosso grupo de pesquisa vem estudando atividades biológicas de compostos de origem vegetal, principalmente saponinas. A partir de estudos como os de [McAllister et al. \(2001\)](#), [Mandal et al \(2006\)](#) e os citados

anteriormente, que demonstraram a atividade antiprotozoária dessa classe de substâncias, decidiu-se testar frações contendo saponinas para esse mesmo fim. Essas foram previamente preparadas em nosso laboratório ou então adquiridas comercialmente.

No contexto de infecções por protozoários, a tricomonose é uma DST comum e que apresenta riscos de graves complicações de saúde, considerando-se assim o tratamento da infecção pelo parasito *T. vaginalis* extremamente importante. Com o aumento da resistência a fármacos de escolha, como o metronidazol, se faz necessária a descoberta de novos agentes antiparasitários. Além disso, também já foi relatada a atividade anti-*Trichomonas* de saponinas por [Tiwari et al \(2008\)](#) e [Guerra et al. \(2008\)](#). Em nosso estudo, o teste de suscetibilidade de trofozoítos de *T. vaginalis* foi realizado com oito frações enriquecidas de saponinas: extratos butanólicos de *Ilex paraguariensis* e *Passiflora alata* (S1 e S2), extrato aquoso de *Quillaja brasiliensis* (S3), frações de saponinas de *Gypsophila* sp., *Quillaja saponaria*, *P. alata* e dos frutos de *I. paraguariensis* (S4, S5, S6 e S8, respectivamente) e fração de flavonóides de *P. alata* (S7). Para isso, foi utilizado um método fluorimétrico de quantificação de trofozoítos viáveis ([Duarte et al. 2009](#)), no qual cinco amostras, S1, S3, S4, S5 e S6, apresentaram atividade anti-*T. vaginalis*. As amostras com atividade mais potente foram as saponinas do extrato de *Q. saponaria* (S5) ([Fig. 1E](#)) e a fração enriquecida com saponinas de *P. alata* (S6) ([Fig.1F](#)), as quais apresentaram uma concentração inibitória mínima de 0,025%. A fração S6 foi obtida a partir do fracionamento do extrato butanólico das folhas de *P. alata* (S2) ([Fig. 1B](#)), o qual também originou a fração de flavonóides de *P. alata* (S7) ([Fig. 1G](#)), as quais foram

testadas e não causaram alteração na viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis*. Com esses resultados, pode-se associar a atividade anti-*Trichomonas* apenas às saponinas, dentre as frações testadas. Outras três amostras contendo saponinas também foram ativas, matando os parasitos. O extrato butanólico das folhas de *I. paraguariensis* (S1), que apresenta um alto teor em saponinas (Gosmann et al. 1995) (Fig. 1A) apresentou uma CIM de 0,05%, o extrato aquoso de *Q. brasiliensis* (S3) (Fig. 1C) e as saponinas de *Gypsophila* sp. (S4) (Fig. 1D) demonstraram CIM de 0,1%, sendo essa a maior concentração testada. No entanto, a fração de saponinas dos frutos de *I. paraguariensis* (S8) (Fig. 1H) foi testada e não apresentou atividade.

Com relação às diferentes CIM das frações testadas quando comparadas entre si, deve-se considerar o diferente conteúdo e teor de saponinas de cada amostra. As características estruturais das saponinas variam conforme a espécie utilizada, enquanto o teor de saponinas nas amostras varia, principalmente, conforme o método de fracionamento, pois algumas amostras testadas são extratos enquanto outras são frações que sofreram algum processo de fracionamento. As saponinas presentes nas frações testadas possuem a característica comum de apresentarem núcleo triterpênico em sua estrutura. Porém, os compostos com atividade anti-*T. vaginalis* são derivados dos ácidos ursólico e oleanólico (saponinas das folhas de *I. paraguariensis* e *P. alata* – Fig. 3A e B), do esqueleto cicloartano (saponinas de *P. alata*) (Gosmann et al. 1995, Reginatto et al. 2001) ou do ácido quiláico (saponinas de *Gypsophila* sp., *Q. saponaria* e *Q. brasiliensis*) (Fig. 3C) (Hostettmann e Marston 1995, Kauffmann et al. 2004), enquanto as saponinas dos frutos de *I. paraguariensis*, que não

apresentaram atividade anti-*Trichomonas*, são derivadas do ácido 19 α -hidroxiursólico (Fig. 3D) (Taketa et al. 2004). O teor de saponinas dos extratos testados e que apresentaram atividade anti-*T. vaginalis* é de aproximadamente 80% para o extrato butanólico das folhas de *I. paraguariensis* (Gosmann et al. 1995) e de 10% para o extrato aquoso das folhas de *Q. brasiliensis*. No entanto, todas as frações enriquecidas de saponinas com atividade anti-*T. vaginalis* possuem teor de mais de 90% de saponinas em sua composição (dados não publicados). Conclui-se, então, que saponinas são compostos que potencialmente apresentam atividade anti-*T. vaginalis*, porém essa atividade depende da concentração e das características estruturais desses compostos.

Com relação às CIM determinadas para as frações ativas, as quais foram maiores em comparação com a CIM de 0,005%, relatada por Tiwari et al. (2008) para a fração de saponinas de *Sapindus mukorossi*, pode-se inferir que a diferença ocorreu por utilização de uma maior densidade de trofozoítos no inóculo de *T. vaginalis* utilizado nos experimentos de suscetibilidade realizados pelo nosso grupo.

A partir da determinação das saponinas ativas, o próximo passo foi o estudo do mecanismo de ação desses compostos na célula dos parasitos. Por serem compostos anfifílicos, as saponinas podem ter a capacidade de se inserir na bicamada lipídica, que forma a membrana plasmática das células, desestabilizando-a e levando à sua lise, evento que ocorre em eritrócitos (Oda et al. 2000). Nesse contexto foram realizados dois experimentos, atividade hemolítica e atividade de liberação de LDH por trofozoítos de *T. vaginalis*, para se determinar

a ação das amostras S1, S3, S4, S5 e S6 em membranas. O percentual de hemólise de cada amostra em sua respectiva CIM, foi comparado ao das saponinas de *Q. saponaria* (S5), utilizada como referência para 100% de hemólise (Sun et al. 2008). Comparando aos 100% de hemólise causada pela concentração de 0,025% da fração S5, as outras frações causaram aproximadamente o mesmo efeito, quantificado espectrofotometricamente através da hemoglobina liberada pelos eritrócitos lisados (Tabela 1). Esse resultado demonstra que todas as amostras, quando utilizadas nas concentrações equivalentes às suas CIM para os trofozoítos de *T. vaginalis*, causam hemólise total. Portanto, as saponinas testadas têm ação na membrana de eritrócitos, indicando que essas frações provavelmente apresentam a mesma ação na membrana dos parasitos.

Neste sentido, para confirmar a ação das saponinas na membrana dos trofozoítos foi realizada a determinação da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase, a qual é liberada pela célula quando há lise de membrana celular. Basiglio et al. (2009) já havia descrito a utilização da dosagem de enzimas citosólicas, entre elas LDH, para avaliação do rompimento de células hepáticas. O percentual de liberação de LDH dos parasitos tratados por 24 horas com as saponinas ativas, apesar de semelhante entre as diferentes frações testadas, não ultrapassou 50% quando comparado ao controle de 100% de LDH, equivalente a trofozoítos lisados por nitrogênio líquido (Fig. 2). Essa diferença em relação ao controle pode ser atribuída à ação de proteases liberadas pelos trofozoítos durante a incubação de 24hs, as quais possivelmente degradaram parte da LDH liberada, fato que não ocorreu com o controle porque foi realizado no momento da determinação enzimática. Essa degradação por proteinases pode ser evitada

através da utilização de inibidores de proteases durante a incubação com as saponinas ativas. Entretanto, os dados indicam que essas saponinas provavelmente causem dano à membrana dos parasitos, demonstrado neste estudo através da hemólise e da liberação de LDH. [Tiwari et al \(2008\)](#) relatou a diminuição na citoaderência por alteração da membrana dos parasitos e rompimento do citoesqueleto por ação de saponinas. Esse último mecanismo e outros devem ser estudados, visando à determinação do real mecanismo pelo qual as frações de saponinas testadas no presente estudo desempenham a atividade anti-*T. vaginalis*.

Por fim, o extrato butanólico de *I. paraguariensis*, o extrato aquoso de *Q. brasiliensis*, as saponinas de *Gypsophila* sp., as saponinas de *Q. saponaria* e as saponinas de *P. alata* são substâncias de fonte vegetal com atividade anti-*T. vaginalis* promissora. Porém, essas necessitam maior fracionamento, visando purificação dos compostos ativos e determinação da relação entre estrutura química e atividade anti-*T. vaginalis*, bem como maiores estudos a cerca de seu mecanismo de ação nos parasitos e de seu efeito nas células do hospedeiro.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil pelas bolsas e financiamento do trabalho. Ao Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pelo uso do leitor de microplacas. Aos membros do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia pelo auxílio durante o estudo.

Referências

Adebajo AC, Ayoola OF, Lwalewa EO, Akindahunsi AA, Omisore NOA, Adewunmi CO, Adenowo TK (2006) Anti-trichomonal, biochemical and toxicological activities of methanolic extract and some carbazole alkaloids isolated from the leaves of *Murraya koenigii* growing in Nigeria. *Phytomedicine* 13:246-254

Anthony JP, Fyfe L, Smith H (2005) Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol* 21:462-468

Barbosa E, Calzada F, Campos R (2006) Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *J Ethnopharmacol* 108:395–397

Barbosa E, Calzada F, Campos R (2007) *In vivo* antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *J Ethnopharmacol* 109:552–554

Basiglio CL, Pozzi EJS, Mottino AD, Roma MG (2009) Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. *Chem Biol Interact* 179:297–303

Calzada F, Y´opez-Mulia L, Aguilar A (2006) *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol* 108:367–370

Cherpes T, Wiesenfeld H, Melan M, Kant JA, Consentino LA, Meyn LA, Hillier SL (2006) The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 33:747–752

Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, Mylonakis E (2010) Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol* 5:321-332

Cotch MF, Pastorek JG, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, Eschenbach DA, Edelman R, Carey JC, Regan JA, Krohn MA, Klebanoff MA, Rao AV, Rhoads GG (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. *Sex Transm Dis* 24:353–360

Diamond LS (1957) The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 43:488–490

Duarte M, Giordani RB, De Carli GA, Zuanazzi JA, Macedo AJ, Tasca T (2009) A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis*

and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. *Exp Parasitol* 123:195–198

Fernández SS, Guerra MCR, Cárdenas BDM, Villarreal JV, Treviño LV (2005) *In vitro* antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia* 76:466–468

Fleck JD, Kauffmann C, Spilki F, Lencina CL, Roehe PM, Gosmann G (2006) Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine* 24:7129–7134

Friedman GD, Jiang SF, Udaltsova N, Charles P, Chan J, Habel LA (2009) Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. *Int J Cancer* 125:2173–2178

Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, Mshvildadze V, Pichette A (2009) Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg Med Chem* 17:2002–2008

Goldstein F, Goldman MB, Cramer DW (1993) Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 137: 577–584

Gosmann G, Guillaume D, Taketa ATC, Schenkel EP (1995) Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. *J Nat Prod* 58:438–441

Grossman JH, Galask RP (1990) Persistent vaginitis caused by metronidazole-resistant trichomonas. *Obstet Gynecol* 76:521–522

Guclu-Ustundag O, Mazza G (2007) Saponins: Properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47:231–258

Guerra JO, Meneses A, Simonet AM, Macias FA, Nogueiras C, Gomez A, Escario JA (2008) Steroidal saponins from the plant *Agave brittoniana* with activity against the parasite *Trichomona vaginalis*. *Rev Biol Trop* 56:1645–1652

Honigberg BM (1990) *Trichomonads Parasitic in Humans*. Springer-Verlag, New York

Hostettmann K, Marston A (1995) *Saponins*. Cambridge Univ, New York

Kapoor K, Chandra M, Nag D, Paliwal JK, Gupta RC, Saxena RC (1999) Evaluation of metronidazole toxicity: a prospective study. *Int J Clin Pharmacol Res* 19:83–88

- Kauffmann C, Machado AM, Fleck JD, Provensi G, Pires VS, Guillaume D, Sonnet P, Reginatto FH, Schenkel EP, Gosmann G (2004) Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Nat Prod Res* 18:153-157
- Kulda J (1999) Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol* 29:199-212
- Lehker MW, Alderete JF (2000) Biology of trichomonosis. *Curr Opin Infect Dis* 13:37-45
- Mandal D, Panda N, Kumar S, Banerjee S, Mandal NB, Sahu NP (2006) A triterpenoid saponin possessing antileishmanial activity from the leaves of *Careya arborea*. *Phytochemistry* 67:183–190
- McAllister TA, Annett CB, Cockwill CL, Olson ME, Wanga Y, Cheeke PR (2001) Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. *Vet Parasitol* 97:85-99
- Mendes-Silva W, Assafim M, Ruta B, Monteiro RQ, Guimarães JA, Zingali RB (2003) Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. *Thromb Res* 112:93-98
- Mudry M, Gadano A, Gonzalez M, Carballo M (1995) Chemical mutagenesis – risks and benefits in the use of antiparasitic drugs. *Interciencia* 20:204-211
- Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katajama S, Oghitani T, Yoshikawa M (2000) Adjuvant and hemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol Chem* 381:67–74
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G (1998) Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 11:300-317
- Rattanathongkom A, Lee JB, Hayashi K, Sripanidkulchai BO, Kanchanapoom T, Hayashi T (2009) Evaluation of chikusetsusaponin IVa isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. *Planta Med* 75:829-835
- Reginatto FH, Kauffmann C, Schripsema J, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP (2001) Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *J Braz Chem Soc* 12:32-36
- Ródio C, Vianna DDR, Kowalski KP, Panatieri LF, von Poser G, Rott MB (2008) *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res* 104:191-194
- Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P (1999) Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis—an emerging problem. *N Engl J Med* 341:292–293

Stark JR, Judson G, Alderete JF, Mundodi V, Kucknoor AS, Giovannucci EL, Platz EA, Sutcliffe S, Fall, K, Kurth T, Ma J, Stampfer MJ, Mucci LA (2009) Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: physicians' health study. *J Natl Cancer Inst* 101:1406-1411

Sun YX, Tong HB, Li MQ, Li YJ, Guan SW, Liu JC (2008) Immunological adjuvant effect of *Japanese ginseng* saponins (JGS) on specific antibody and cellular response to ovalbumin and its haemolytic activities. *Vaccine* 26:5911-5917

Taketa ATC, Gnoatto SCB, Gosmann G, Pires VS, Schenkel EP, Guillaume D (2004) Triterpenoids from brazilian *Ilex* species and their *in vitro* antitrypanosomal activity. *J Nat Prod* 67:1697-1700

Taketa ATC, Breitmaier E, Schenkel EP (2004) Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). *J Braz Chem Soc* 15:205-211

Tasdemir D, Brunb R, Franzblauc SG, Sezgin Y, Cälisd I (2008) Evaluation of antiprotozoal and antimycobacterial activities of the resin glycosides and the other metabolites of *Scrophularia cryptophila*. *Phytomedicine* 15:209–215

Tiwari P, Singh D, Singh MM (2008) Anti-*Trichomonas* activity of Sapindus saponins, a candidate for development as microbicidal contraceptive. *J Antimicrob Chemother* DOI: 10.1093/jac/dkn223

Tracy JW, Webster Jr. LT (2003) Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários (*continuação*). In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica, 10th edn. McGraw-Hill, Rio de Janeiro, pp 823-841

Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison CS (2008) *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis* 197:548–554

Vermeersch M, Foubert K, Luz RI, Van Puyvelde L, Pieters L, Cos P, Maes L (2009) Selective antileishmania activity of 13,28- epoxy-oleanane and related triterpene saponins from the plant families Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae. *Phytother Res* DOI: 10.1002/ptr.2788

Vidal F, Vidal JC, Gadelha APR, Lopes CS, Coelho MGP, Monteiro-Leal LH (2007) *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp Parasitol* 115:25–31

World Health Organization (2001) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and Estimates, WHO, Geneva, Switzerland

Xiao X, Bai P, Nguyen TMB, Xiao JG, Liu SL, Yang G, Hu LN, Chen XL, Zhang XM, Liu JS, Wang H (2009) The antitumoral effect of Paris Saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 8:1179-1188

Zhang ZF, Begg CB (1994) Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol* 23:682–690

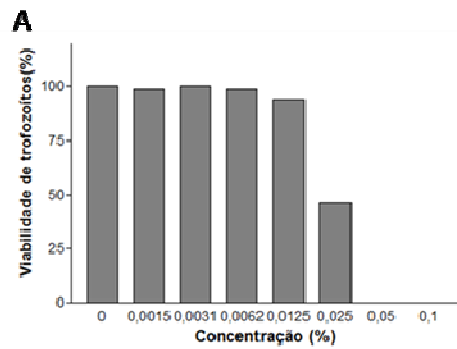
Zhao HL, Harding SV, Marinangeli CPF, Kim YS, Jones PJH (2008) Hypocholesterolemic and anti-obesity effects of saponins from *Platycodon grandiflorum* in hamsters fed atherogenic diets. *J Food Sci* 73:H195-H200

Legendas das figuras

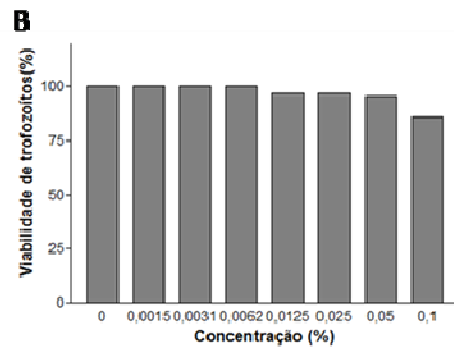
Figura 1: (A) S1 – Extrato butanólico das folhas de *I. paraguariensis* contendo saponinas triterpênicas. CIM = 0,05%; (B) S2 – Extrato butanólico das folhas de *P. alata* contendo saponinas e flavonóides. Sem atividade anti-*T. vaginalis* até concentração de 0,1%; (C) S3 – Extrato aquoso das folhas de *Q. brasiliensis* contendo saponinas. CIM = 0,1%; (D) S4 – Fração comercial de saponinas de *Gypsophila* sp. CIM = 0,1%; (E) S5 – Fração comercial de saponinas de *Q. saponaria*. CIM = 0,025%; (F) S6 – Fração enriquecida em saponinas de *P. alata*, proveniente do fracionamento de S2. CIM = 0,025%; (G) S7 – Fração enriquecida em flavonóides de *P. alata*, proveniente do fracionamento de S2. Não alterou a viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis*, em comparação ao controle, em nenhuma concentração testada; (H) S8 – Fração de saponinas dos frutos de *I. paraguariensis*. Sem atividade anti-*T. vaginalis* até concentração de 0,1%. Resultados em % calculados através das médias de unidades relativas de fluorescência comparadas ao controle (100% de fluorescência). Todos os resultados são representativos de 3 experimentos.

Figura 2: Liberação de LDH citosólica de trofozoítos de *T. vaginalis* após morte em presença das frações de saponinas testadas em suas respectivas CIM. S1 = 0,05%; S3 e S4 = 0,1%; S5 e S6 = 0,025%.

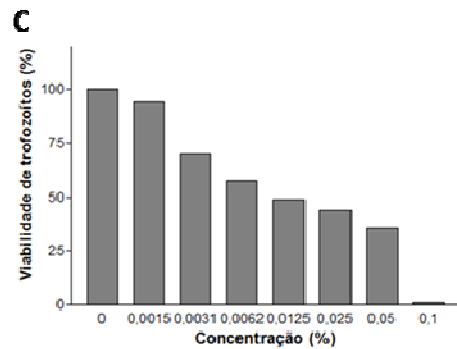
Figura 3: Comparação entre as estruturas das saponinas triterpênicas contidas nas frações testadas. (A) 28 β -O-D-glicopiranosilester do 3-O- β -L-arabinopiranosil-[(2-1)-ramnopiranosil]-(3-1)-glicopiranosil- ácido ursólico (Matesaponina II – presente nas folhas de *I. paraguariensis*) (B) Ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-(1-2)- β -D-glicopiranosil-oleanólico (presente nas folhas de *P. alata*) (C) Ácido 3-O- β -D-glicuronopiranosil-quiláico (presente nas folhas de *Q. brasiliensis*) (D) 28 β -O-D-glicopiranosilester do 3-O- β -D-glicopiranosil-(1-3)- α -L-arabinopiranosil-19-ácido hidroxiursólico (Ilexosídeo II – presente nos frutos de *I. paraguariensis*).



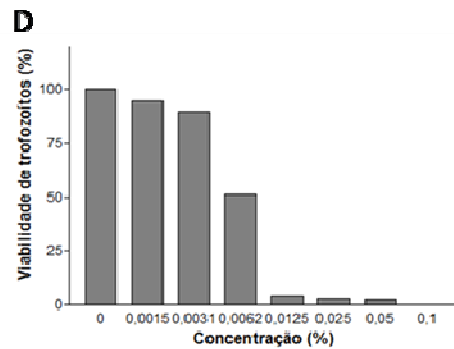
S1- Extrato butanólico das folhas de *I. paraguariensis*.



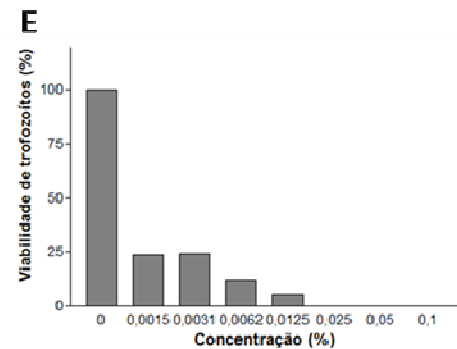
S2- Extrato butanólico das folhas de *P. alata*.



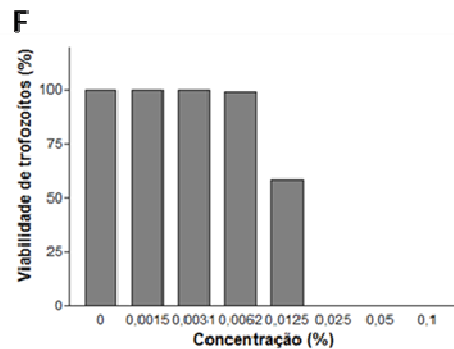
S3- Extrato aquoso das folhas de *Q. brasiliensis*.



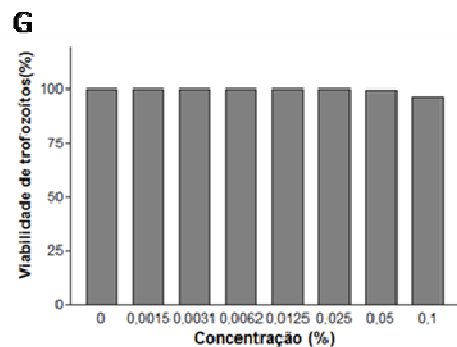
S4- Saponinas de *Gypsophila* sp.



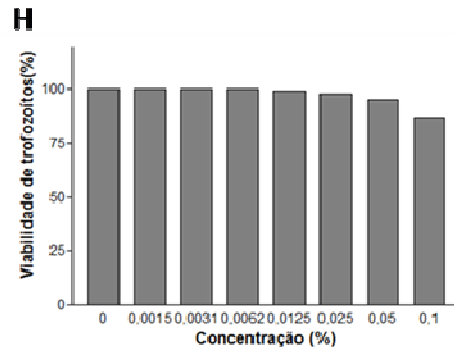
S5- Saponinas do extrato de *Q. saponaria*.



S6- Fração de saponinas das folhas de *P. alata*.



S7- Fração de flavonóides das folhas de *P. alata*.



S8- Fração de saponinas dos frutos de *I. paraguariensis*.

Figura 1

Tabela 1: Atividade hemolítica das frações de saponinas com atividade anti-*T. vaginalis* em suas respectivas CIM.

Frações de saponinas	S1	S3	S4	S5	S6
CIM (%)	0,05	0,1	0,1	0,025	0,025
Hemólise (%)	98,55	99,59	99,96	100	99,55

Resultados expressos pela média de experimento realizado em triplicata.

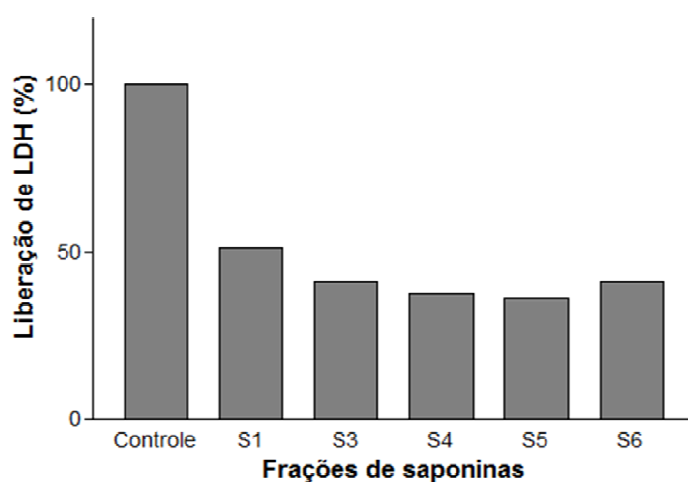


Figura 2

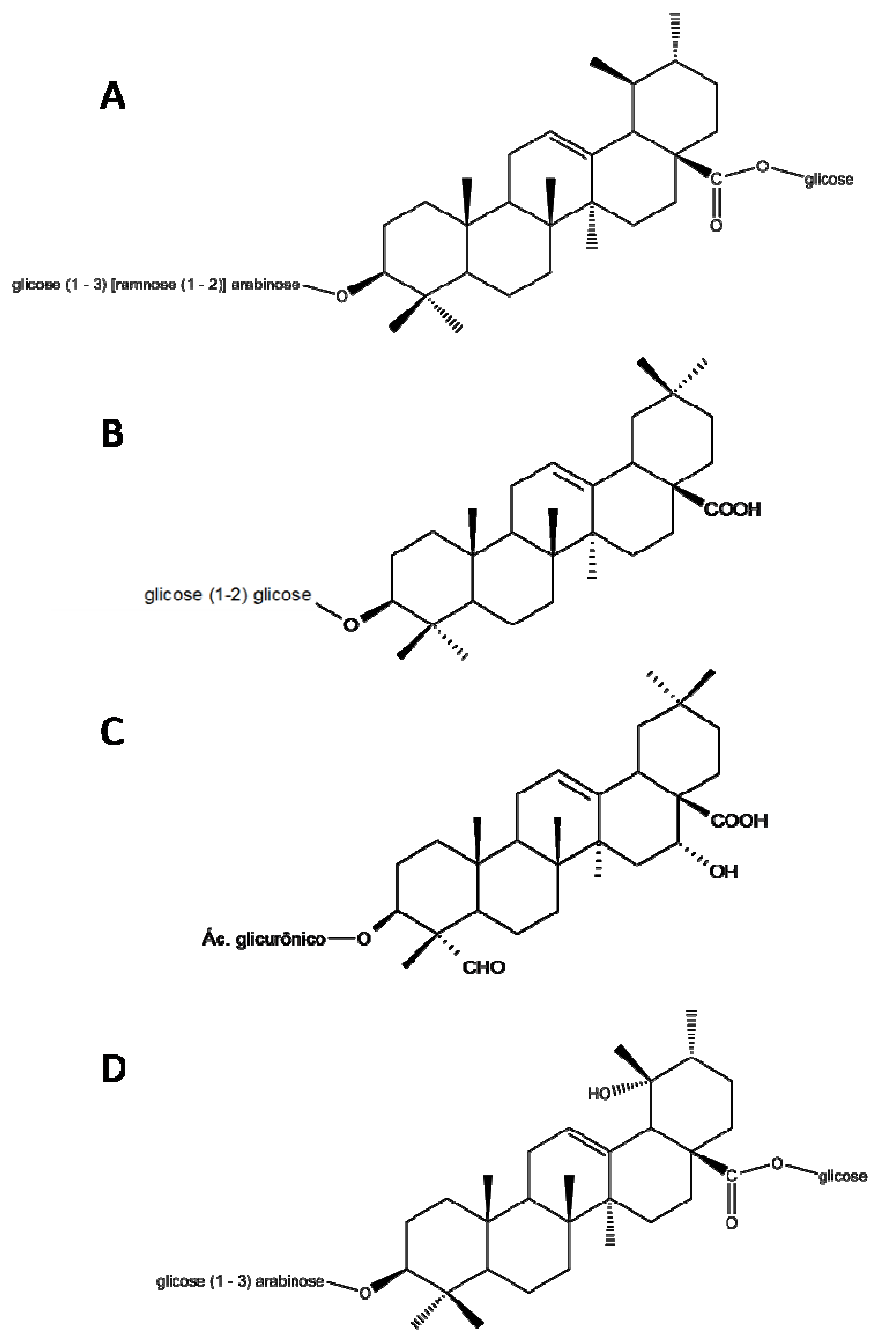


Figura 3

Anexo 1. Normas da revista Parasitology Research para submissão de artigo

Parasitology Research

Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde

Editors: H. Mehlhorn; B. Chobotar

ISSN: 0932-0113 (print version)

ISSN: 1432-1955 (electronic version)

Journal no. 436

Springer

[Editorial Board](#)

Description

The journal Parasitology Research covers the latest developments in parasitology across a variety of disciplines, including biology, medicine and veterinary medicine. Among many topics discussed are chemotherapy and control of parasitic disease, and the relationship of host and parasite.

Other coverage includes: Protozoology, Helminthology, Entomology; Morphology (incl. Pathomorphology, Ultrastructure); Biochemistry, Physiology including Pathophysiology; Parasite-Host-Relationships including Immunology and Host Specificity; life history, ecology and epidemiology; and Diagnosis, Chemotherapy and Control of Parasitic Diseases.

Impact Factor: 1.473 (2008) *

* Journal Citation Reports®, Thomson Reuters

Abstracted/Indexed in:

Abstracts in Anthropology, Academic OneFile, Academic Search, AGRICOLA, ASFA, Biological Abstracts, BIOSIS Previews, CAB Abstracts, CAB International, CSA/Proquest, Current Abstracts, Current Contents/ Life Sciences, EMBASE, EMBiology, Focus on: Veterinary Science & Medicine, Gale, Global Health, Google Scholar, IBIDS, Index Copernicus, INPHARMA, Journal Citation Reports/Science Edition, OCLC, PASCAL, PubMed/Medline, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded (SciSearch), SCOPUS, Summon by Serial Solutions, TOC Premier, VINITY - Russian Academy of Science, Zoological Record

Aims and scope

An international journal on parasitology that includes:

- General, Biological, Medical and Veterinary Parasitology
- Protozoology, Helminthology, Entomology
- Morphology (incl. Pathomorphology, Ultrastructure)
- Biochemistry, Physiology (incl. Pathophysiology)
- Parasite-Host-Relationships (incl. Immunology, Host Specificity)
- Life History, Ecology, Epidemiology
- Diagnosis, Chemotherapy and Control of Parasitic Diseases

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

[Word template](#)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted (Becker and Seligman 1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via

DIALOG. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999

- Dissertation
Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided

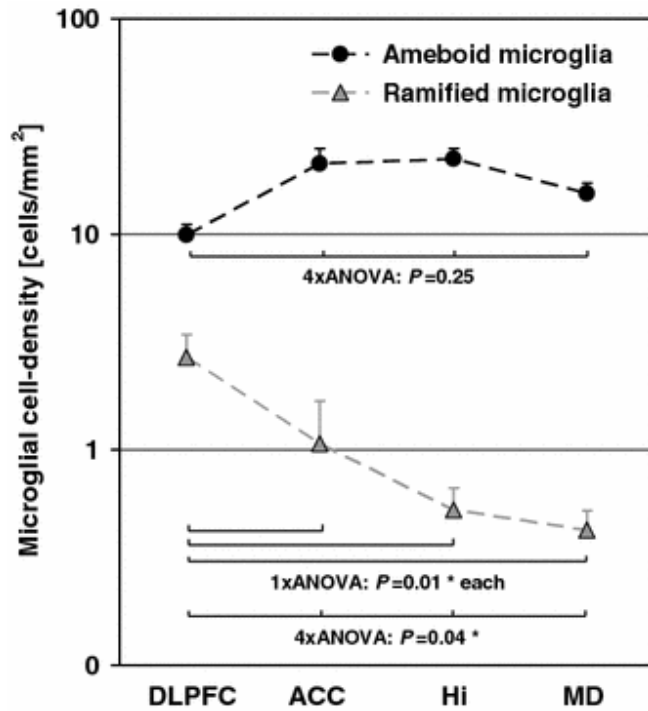
Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

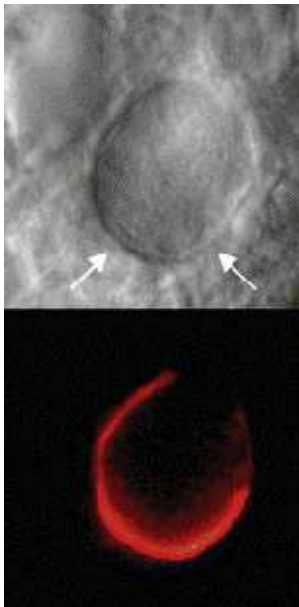
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.



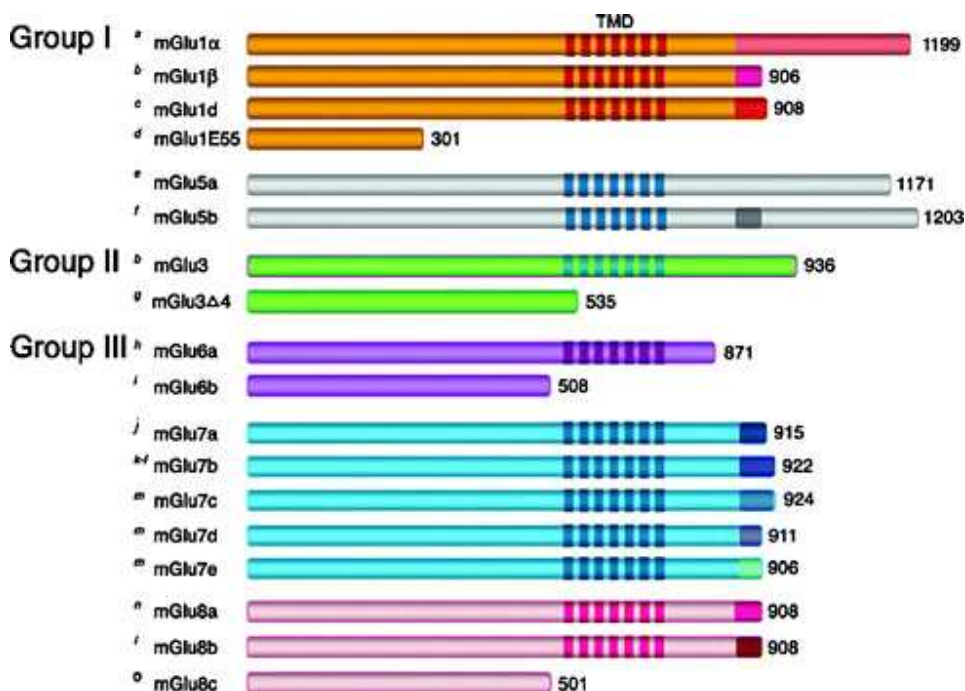
Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.



Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a

book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Additional offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Languages

Articles and abstracts must be in English or in the journal's official language(s), but the journal accepts additional abstracts in other languages of the author's choice (for instance in the author's first language, if not English or the journal's official language). Such abstracts are optional. Authors would need to supply such abstracts themselves, certify that they are a faithful translation of the official abstract, and they must be supplied in Unicode (see www.unicode.org for details), especially if they are using non-roman characters.

Such abstracts in other languages will carry a disclaimer:

"This abstract is provided by the author(s), and is for convenience of the users only. The author certifies that the translation faithfully represents the official version in the language of the journal, which is the published Abstract of record and is the only Abstract to be used for reference and citation."