

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

HAYDÉE MARIA SALES BERNARDES

ESTUDO DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO
E FRAÇÕES DE *Chenopodium ambrosioides* L. SOBRE *Strongyloides venezuelensis*
(BRUMPT, 1934)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
(SP) para obtenção do título de Doutor em
Parasitologia.

Orientadora: Dr^a. Marlene Tiduko Ueta

Campinas – SP

2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: _____
T/UNICAMP B456e
V. _____ EX: _____
TOMBO BCCL 73862
PROC 16.145-07
C _____ D X
PREÇO 11.100
DATA 28-8-07
BIB-ID 43 0083

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B456e

Bernardes, Haydée Maria Sales

Estudo do efeito anti-helmíntico do extrato hidroalcoólico e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *Strongyloides venezuelensis* (BRUMPT, 1934) / Haydée Maria Sales Bernardes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Marlene Tiduko Ueta.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Chenopodium ambrosioides*. 2. Paico. 3. Erva de Santa Maria. 4. *Strongyloides venezuelensis*. 5. Tiabendazol I. Ueta, Marlene Tiduko. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Study of antihelmitic effect of hidroalcoholic extract and fractions of *Chenopodium ambrosioides* L. against *Strongyloides venezuelensis* (BRUMPT, 1934).

Palavras-chave em inglês: *Chenopodium ambrosioides*; Paico; Santa Maria herb; *Strongyloides venezuelensis*; Thiabendazole.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Doutora em Parasitologia.

Banca examinadora: Marlene Tiduko Ueta, Silmara Marques Allegreti, Ana Maria Aparecida Guaraldo, Vera Lúcia Garcia Rehder, Isabela Cristina Simoni.

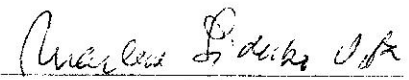
Data da defesa: 29/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

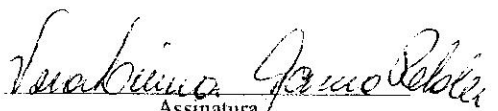
Campinas, 29 de agosto de 2006

BANCA EXAMINADORA

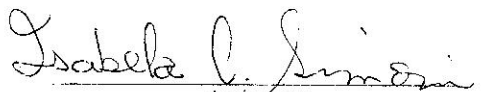
Prof^a. Dr^a. Marlene Tiduko Ueta (Orientadora)


Assinatura

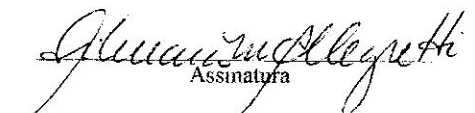
Prof^a. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder


Assinatura

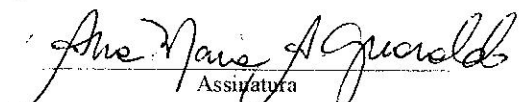
Prof^a. Dra. Isabela Cristina Simoni


Assinatura

Prof^a. Dra. Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Prof^a. Dra Ana Maria Aparecida Guaraldo


Assinatura

Prof^a. Dra. Marili Villa Nova Rodrigues

Assinatura

Prof^o. Dr. Odair Benedito Ribeiro

Assinatura

Prof^a. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães

Assinatura

Aos meus pais, Ângela e Jonas, aos meus irmãos Andrezza e Luiz Henrique pelo incentivo e compreensão sempre.

Dedico.

A minha avó Haidê Benedicto, pelo constante apoio durante minha caminhada e educação, pelas palavras amigas e confortadoras. A tia Lena e tio Zé, pelo apoio.

Dedico.

Aos meus saudosos tios Carlinhos e Lázaro “*In Memorian*” por incentivarem e acreditarem em mim sempre.

Ao Prof^o. Welson Barbosa dos Santos, que sempre acreditou, desde os tempos de colegial, que eu aqui chegaria.

Ao Mestre com carinho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que mais uma página em minha vida tenha sido escrita.

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de realização desta Tese.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa para realização deste estudo.

A minha orientadora, Marlene Tiduko Ueta, pela orientação, por ter me acolhido neste projeto e pelos ensinamentos que me fizeram crescer muito durante todo esse período.

À Prof^a. Vera Lúcia Garcia Rehder, por ter me acolhido na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA-UNICAMP, pela valiosa colaboração e sugestões para o desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigada!

A todos os professores do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, em especial ao Prof^o. Ângelo, pelas conversas, à Prof^a. Eliana, ao Prof^o. Magalhães, à Prof^a. Silmara, à Prof^a. Ana Maria, ao Prof^o. Arício, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos técnicos do Laboratório de Helminologia: João e Ivo, pelo apoio e aprendizado constante que me proporcionaram ao longo das disciplinas e no laboratório. Ao Rubens, pelas ajudas em qualquer problema de ordem informática que surgisse. Minha imensa gratidão.

Às secretárias, Andréia e Margareth, que sempre se mostraram dispostas a resolver os assuntos acadêmicos de maneira muito amiga.

Ao amigo Laerte Machado, pela amizade, carinho e por acreditar em mim durante todo esse período, pelo apoio constante, paciência e disposição em ajudar, sempre. Minha gratidão.

Aos colegas de curso da Pós – graduação Wagner, Ivanilde e Rubéns, pelo convívio, amizade e troca de informações.

Ao colega David Villas Boas, pela disposição em me acompanhar na procura e coleta da planta, pela amizade e convívio. Às conversas nos momentos de estresse.

Aos amigos Ana Tereza, Cínara, Maurílio e as primas Lazimarie e Tatiana, pelas conversas, por acreditarem sempre e pela compreensão nos momentos difíceis.

A todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho.

O meu olhar é nítido como um girassol.
Tenho o costume de olhar pelas estradas,
olhando para a direita e para a esquerda,
e de vez em quando olhando para trás....
e o que vejo a cada momento
é aquilo que nunca eu tinha visto
e eu sei dar por isso muito bem....
Sei ter o pasmo essencial
que tem uma criança se, ao nascer,
reparasse que nascera deveras...
Sinto-me nascido a cada momento
para a eterna novidade do mundo.

Fernando Pessoa (Alberto Caieiro) em o
“Guardador de Rebanhos”

“Só existem dois dias do ano em que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro amanhã, portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e, principalmente, viver”.

Dalai Lama

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. <i>Strongyloides stercoralis</i>	8
2.2. Tratamento da estrongiloidíase.....	9
2.3. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	15
3. OBJETIVO GERAL.....	20
3.1 Objetivos específicos:.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Material Vegetal	21
4.2. Fitoquímica.....	23
4.2.1. Preparação do Extrato Hidroalcóolico de <i>C. ambrosioides</i> (EHA).....	23
4.2.2. Fracionamento do EHA liofilizado de <i>C. ambrosioides</i>	24
4.2.3. Análises Cromatográficas.....	25
4.2.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	25
4.2.3.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	26
4.3. Material animal.....	26
4.3.1. Camundongos	26

4.3.2. <i>Strongyloides venezuelensis</i>	27
4.3.2.1. Obtenção das larvas filarióides (L3) de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e infecção dos camundongos.....	27
4.4. Quantificação de ovos e das fêmeas parasitas	27
4.5. Administração do EHA de <i>Chenopodium. ambrosioides</i> e do Tiabendazol (TBZ)..	28
4.6. Teste de diferentes concentrações do EHA liofilizado de <i>Chenopodium ambrosioides</i> sobre <i>Strongyloides venezuelensis</i>	28
4.7. Estudo comparativo do efeito anti-helmíntico entre a concentração resposta do EHA de <i>Chenopodium. ambrosioides</i> e o Tiabendazol	29
4.7.1. Tratamento.....	30
4.7.1.1. Pós-Infecção	30
4.7.1.2. Pré-Infecção	31
4.8. Avaliação anti-helmíntica de frações de diferentes polaridades obtidas a partir do EHA liofilizado de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	32
4.9. Eficácia do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> :	32
4.10. Cálculo da fecundidade (F) das fêmeas partenogênicas parasitas de <i>Strongyloides</i> <i>venezuelensis</i>	33
4.11. Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Rendimento do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	34
5.2. Análise do extrato hidroalcolico de <i>Chenopodium ambrosioides</i> . por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	34
5.3. Concentração resposta e eficácias das diferentes concentrações do EHA liofilizado de <i>C. ambrosioides</i> sobre <i>S. venezuelensis</i>	37

5.3.1. Efeito do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> na concentração de 400mg Kg ⁻¹ /animal/dia sobre a fecundidade de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	40
5.4. Estudo comparativo do efeito anti-helmíntico entre a concentração resposta do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> e o Tiabendazol sobre <i>Strongyloides venezuelensis</i>	43
5.4.1 Eficácia do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> e do Tiabendazol sobre o número de ovos e de fêmeas parasitas e fecundidade de <i>Strongyloides venezuelensis</i> mediante o tratamento pós e pré-infecção.	44
5.4.1.1. Eficácia de <i>Chenopodium ambrosioides</i> sobre número de ovos e fêmeas parasitas de <i>S. venezuelensis</i>	45
5.4.1.2. Eficácia do Tiabendazol sobre o número de ovos e fêmeas parasitas de <i>S. venezuelensis</i>	46
5.4.2. Efeito do EHA de <i>C. ambrosioides</i> e do Tiabendazol sobre a fecundidade das fêmeas de <i>S. venezuelensis</i>	47
5.5. Frações do EHA liofilizado de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	50
5.5.1 Análise por CCD	50
5.5.2. Avaliação anti-helmíntica: eficácia das frações Fr 4, Fr 5 e Fr 6 sobre o número de ovos, número de fêmeas parasitas e fecundidade de <i>S. venezuelensis</i>	54
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE ABREVIATURAS

$\bar{X}$	Média
A.clor	Ácido clorogênico
AcOEt	Acetato de etila
AF	Ácido fórmico
<i>C. a.</i>	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectometria de massas
CH ₃ Cl ₃	Clorofórmio
Ctr	Controle
d.p.i	Dia pós-infecção
DP	Desvio padrão
EF %	Percentagem de eficácia
EHA	Extrato hidroalcólico liofilizado
F	Fecundidade
FP	Fêmeas parasitas
Fr	Frações: 2, 3, 4, 5 e 6.
GC-ME	Gasous chromatography mass spectrometry
Hex.	Hexano
HOAc	Ácido acético
Isoq.	Isoquercetina
L3	Larva filarióide
MeOH	Metanol

MM	Massa molecular
NP	Ácido difenilborânico – natural peoduct - revelador
OPG	Ovos por grama de fezes
Isov.	Isovitexina
P	Probabilidade
PE	Percentagem de eficácia
Rut.	Rutina
TAF	Trietanolamina: ácido acético: formol – fixador
TBZ	Tiabendazol
UV	Ultravioleta
Vit.	Vitexicina
Vit.-2R	Vitexicina-2-raminosídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. – Horta do Instituto de Biologia	22
Figura 2. A: folhas e B: inflorescências de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	22
Figura 3. Preparação do Extrato hidroalcólico liofilizado de <i>C. ambrosioides</i>	24
Figura 4. Desenho experimental do tratamento pós - infecção com a concentração resposta do EHA de <i>C. ambrosioides</i> e Tiabendazol (50mg Kg ⁻¹ /animal/dia)	30
Figura 5. Desenho experimental do tratamento pré - infecção com a concentração resposta do EHA de <i>C. ambrosioides</i> e Tiabendazol (50mg Kg ⁻¹ /animal/dia).	31
Figura 6. CCD do EHA de <i>C. ambrosioides</i>	35
Figura 7: Cromatograma gasoso obtido para o EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	36
Figura 8. Estrutura química do Ascaridol.....	36
Figura 9. N°. médio de OPG em camundongos infectados com <i>S. venezuelensis</i> e tratados com diferentes concentrações do EHA de <i>C. ambrosioides</i>	38
Figura 10. N°. médio de FP em camundongos infectados com <i>S. venezuelensis</i> e tratados com diferentes concentrações do EHA de <i>C.ambrosioides</i>	38
Figura 11. CCD do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> e das frações 2, 3, 4, 5 e 6 :Eluente CHCl ₃ : MeOH (90:10); Revelador: Luz UV 254 e 366 nm e Solução de anisaldeído	51
Figura 12: Cromatografia em Camada delgada (CCD) do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> e das frações Fr4+Fr5 e Fr6 resultantes da coluna cromatográfica seca do EHA.....	52
Figura 13: Cromatografia em Camada delgada (CCD) das frações resultantes da coluna cromatográfica seca do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> e dos padrões de vitexina	

(Vit), isovitexina (Isov), Vitexina-2-Raminosideo (Vit-2R), Isoquercetina (Isoq.), Rutina (Rut.) e Ácido clorogênico (A.clor.).....	53
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração e eficácia do extrato hidroalcólico liofilizado de <i>C. ambrosioides</i> (EHA), $\bar{X}$ OPG, $\bar{X}$ de fêmeas parasitas e $\bar{X}$ e variação das fecundidades para <i>S. venezuelensis</i> após tratamento com o EHA de <i>C. ambrosioides</i> e análise estatística. .	40
Tabela 2. Estatística, médias do número de ovos, fêmeas parasitas e fecundidade após os tratamentos pós e pré – infecção com 400mg Kg ⁻¹ /animal/dia do EHa de <i>C. ambrosioides</i> e com 50mg Kg ⁻¹ /animal/dia do Tiabendazol .	44
Tabela 3. Grupos de animais, medicamento, concentrações usadas nos tratamentos, n ^o médio de ovos por grama de fezes, média de fêmeas recuperadas do intestino, eficácia do medicamento utilizado em camundongos infectados com <i>S. venezuelensis</i> e tratados com EHA de <i>C. ambrosioides</i> ou TBZ e a variação de fecundidade para cada tipo de tratamento.	45
Tabela 4. Frações, condição de tratamento, número médio de OPG e fêmeas parasitas, eficácia e variação de fecundidade de <i>Strongyloides. venezuelensis</i> após administração de 250mg Kg ⁻¹ /animal/dia do EHA de <i>Chenopodium ambrosioides</i> .	55

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Dados brutos referentes a Figura 9 e Figura 10 e Tabela 1, número de ovos por grama de fezes (OPG), número de fêmeas parasitas e fecundidade.....	60
Anexo 2. Dados brutos dos tratamentos pré e pós – infecção com 400 mg Kg ⁻¹ /animal/dia com o EHA de <i>C. ambrosioides</i> e com 50 mg Kg ⁻¹ /animal/dia de tiabendazol (Tabela 3): número de ovos (OPG), fêmeas parasitas (FP) e fecundidade.....	61
Anexo 3. Dados brutos referentes aos tratamentos pré e pós-infecção com as frações 4, 5 e 6 obtidas do EHA de <i>C. ambrosioides</i> na concentração de 250 mg Kg ⁻¹ /animal/dia;(Tabela 3).....	62

RESUMO

No presente estudo foi avaliado o efeito anti-helmíntico do extrato hidroalcolico (EHA) de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) e frações sobre *Strongyloides venezuelensis* (Brumpt, 1934). O EHA de *C. ambrosioides* foi obtido de folhas secas e moídas em solução de etanol:água (70:30) em sistema de extração ultra turrax. O extrato hidroalcolico liofilizado (EHA) foi fracionado e analisado. Foram realizados testes para a determinação da concentração resposta em camundongos Swiss machos de 30 dias, infectados com *S. venezuelensis* e tratados, via oral, com as concentrações de 100mg Kg⁻¹/animal/dia, 250mg Kg⁻¹/animal/dia e 400mg Kg⁻¹/animal/dia durante cinco dias. Foram formados grupos de 10 animais para cada concentração e um grupo controle. Os animais foram infectados por injeção subcutânea com 1500 larvas e sacrificados no 6º d.p.i para contagem do número de ovos e de fêmeas. A concentração de 400mg Kg⁻¹/animal/dia apresentou maior eficácia tanto para o número de ovos por grama de fezes (75,89 %) quanto para as fêmeas parasitas (86,31 %). Em outro experimento a concentração de 400mgKg⁻¹/animal dia do EHA de *C.ambrosioides* foi comparada com o Tiabendazol (TBZ) na concentração de 50 mgKg⁻¹/animal/dia em regime de tratamento pós e pré-infecção sendo formados grupos de 10 animais para cada tratamento e droga. Nos tratamentos pré-infecção, os animais receberam TBZ ou EHA de *C. ambrosioides* durante cinco dias e foram infectados com 1500 larvas. Nos tratamentos pós-infecção, os animais foram infectados, tratados com TBZ ou EHA de *C.ambrosioides* 24h após infecção durante cinco dias. Em ambos os tratamentos os animais foram sacrificados no 6º d.p.i para a contagem de ovos e fêmeas. A concentração de 400mgKg⁻¹/animal/dia apresentou eficácia de 99,14 % e 89,95 % para ovos e fêmeas, respectivamente quando avaliado o grupo tratado pré-infecção contra 79,60 % para ovos e 86,46 % para fêmeas parasitas, no grupo tratado pós-infecção. O TBZ apresentou eficácia de 39,91 % para o OPG e 89,54 % para fêmeas no grupo tratado pré-infecção e eficácia de 100 % tanto para ovos quanto para as fêmeas no regime de tratamento pós-infecção. O TBZ mostrou-se pouco eficiente como preventivo da infecção de camundongos por *S. venezuelensis*. O EHA de *C. ambrosioides* apresentou eficácia moderada para o número de fêmeas no tratamento pós-infecção. Após o fracionamento do EHA em seis frações, das quais três (Fr 4, Fr 5 e Fr 6) foram testadas em regime de tratamento pós e pré infecção na concentração de 250 mg Kg⁻¹/animal/dia

durante cinco dias. Foram formados grupos de 10 animais para cada fração e um grupo controle. A infecção e administração foram realizadas como descrito anteriormente. A fração 6 foi a que apresentou maior eficácia para ovos (94,51 %) e fêmeas (90,55 %) no tratamento pós-infecção. No tratamento pré-infecção, a Fr 5 foi a mais eficaz para os ovos (90,84 %) e para as fêmeas parasitas (67,28 %). Ficou demonstrada a presença de compostos fenólicos da classe dos flavonóides (por CCD) nas frações 5 e 6. A fração 6 apresentou-se mais rica nesses flavonóides semelhantes aos padrões de flavonóides testados. O fitol foi o composto majoritário detectado no EHA por CG-EM.

PALAVRAS-CHAVE: *Chenopodium ambrosioides*; Erva-de-Santa Maria; *Strongyloides venezuelensis*; atividade anti-helmíntica; Tiabendazol; Flavonóides.

ABSTRACT

The present study the antihelminthic effect of the hidroalcoholic extract (EHA) *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) and fractions obtained of dry column on *Strongyloides venezuelensis* (Brumpt, 1934) was evaluated. The EHA of *C. ambrosioides* was obtained from dried and powdered using ethanol:H₂O solution (70:30). The extract was evaporated and liophilized, getting the hidroalcoholic crude extract. The EHA was partitioned in dry column using chloroform: methanol solution (90:10) and analyzed by TLC (Thin Layer Chromatography) and GC-MS (Gaseous Chromatography Mass Spectrometry). Tests for the determination of the concentration response had been carried out in Swiss male mice of 30 days infected with *S. venezuelensis* and treated with the concentrations to 100mg kg⁻¹/animal/day, 250mg kg⁻¹/animal/day and 400mg kg⁻¹/animal/day during five days by intraesophageal intubation. Groups of 10 animals for each concentration and a control group were formed. The animals had been infected subcutaneous injection with 1500 larvae sacrificed in 6^o d.p.i (day post-infection) for evaluation for the number of eggs and females. The concentration of 400mg kg⁻¹/animal/day presented greater in such a way effectiveness for the eggs (75.89 %) how much for the parasites females (86.31 %). In another experiment it was compared concentration of 400mgKg⁻¹/animal/day of the EHA of *C. ambrosioides* with Thiabendazole (TBZ) in regimen of treatment post and pre-infection being formed groups of 10 animals for each treatment and drugs. In the pre-infection treatments, the animals had been treated with EHA of *C. ambrosioides* or TBZ during five days and infected. In the post-infection treatments, the animals had been infected, treated with TBZ or EHA of *C. ambrosioides* 24h after infection during five days. The animals had been sacrificed for quantification of eggs and females in the 6^o d.p.i..The 400mgKg⁻¹/animal/day concentration presented effectiveness of 99.14 % and 89.95 % for the eggs and females respectively when evaluated the pre-infection treated group against 79.60 % to (eggs) and 86.46 % (females) in the group post-infection treated. The TBZ presented a effectiveness of 39.91 % for eggs and 89.54 % for the females in the pre-infection treated group and effectiveness of 100 % for eggs how much for the females parasites in the regimen of post-infection treatment. The TBZ revealed little efficient as preventive of the infection of mice with *S. venezuelensis*. The EHA of *C. ambrosioides* presented moderate effectiveness to the number of female parasites in the treatment post-

infection. After the partition of the EHA six fractions had been gotten and three (Fraction 4, 5 Fraction 5 and Fraction 6) had been tested in regimen of post-infection and pre-infection in the 250 mg kg⁻¹/animal/dia concentration during five days. Groups of 10 animals for each fraction had been formed and one control group. The infection and administration had been carried through as described previously. The fraction 6 presented greater effectiveness for the eggs (94.51 %) and parasite females (90.55 %) in the group post-infection treated. In the treatment pre-infection, the Fr 5 was the one that revealed more efficient for the eggs (90.84 %) and for the number of female parasites (67.28 %). It showed the presence of fenolics compounds of flavonols class in tehe fractions 5 and 6 (in TLC). The fraction 6 presented more rich in these compounds, same to used standarts. The phytol was the compound major detected in the GC-MS.

KEY – WORDS: *Chenopodium ambrosioides*; Santa Maria'herb; *Strongyloides venezuelensis*; anthelmintic activity; Thiabendazole; Flavonols.

1. INTRODUÇÃO

A estrongiloidíase humana é uma das infecções mais prevalentes causadas por helmintos. Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estejam parasitadas por *Strongyloides stercoralis* em todo o mundo (Maruyama et al., 1996; Nolan et al., 1999). O parasito tem a capacidade de realizar auto-infecção no indivíduo podendo disseminar-se, levando-o a morte, principalmente quando observado em indivíduos imunocomprometidos como os HIV+ (Naquira et al., 1989) e aqueles tratados com corticosteróides (Hagelskjaer, 1994; Liepman, 1975).

Strongyloides stercoralis é um geohelminto cuja forma infectante é a larva filarióide (L3), que está presente no solo ou alimentos contaminados. A L3, após penetrar na pele, cai na corrente sanguínea ou linfática chega aos pulmões onde sofre duas mudas atingindo o estágio de L5. Após a última muda as larvas saem dos alvéolos, chegam à traquéia, alcançam a faringe, onde a maioria é deglutida e se alojam no intestino delgado, onde se transformam em fêmeas partenogenéticas parasitas (Stratton, 2000; Grove, 1996; Genta, 1986). Nas infecções assintomáticas, as fêmeas se alojam no primeiro terço do jejuno ou ficam mergulhadas na mucosa intestinal e nas formas sintomáticas ficam alojadas do piloro ao intestino grosso misturadas à secreção da luz intestinal ou ficam escondidas nas criptas da mucosa. Na forma disseminada da doença, o parasito é encontrado na maioria dos órgãos, nas glândulas e articulações (Grove, 1996; Delaroque et al., 1994; Stratton, 2000).

Duas espécies têm importância para o estudo da biologia, morfologia, aspectos imunológicos e da relação parasito-hospedeiro em roedores: são *Strongyloides*

venezuelensis (Brumpt, 1934) e *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) bem como importância no teste de drogas contra a infecção (Grove & Blair, 1981; Sato et al., 1995; Costa-Cruz et al., 1997).

Os modelos de estudo da estrogiloidíase em roedores com *S. venezuelensis* têm contribuído muito para o melhor entendimento da infecção humana por *S. stercoralis*, por possuírem rotas de infecção e aspectos de estimulação do sistema imunológico de camundongos e/ou ratos semelhantes à infecção humana, apesar de alguns aspectos do ciclo destas espécies diferirem, por exemplo, as formas do parasito que são eliminadas nas fezes e o fato dos parasitos de roedores não realizarem auto-infecção no hospedeiro (Sato e Toma, 1990). Para *S. stercoralis*, as larvas são eliminadas juntamente com as fezes e para *S. venezuelensis* são eliminados ovos que sofrem a primeira clivagem ao serem eliminados nas fezes, ou seja, ovos larvados que originarão larvas infectantes (Little, 1966).

Esses modelos permitem a quantificação de ovos por grama de fezes e de fêmeas parasitas no intestino (Dawkins & Grove, 1981), e possibilitam assim, o estudo da ação de drogas nas diferentes fases evolutivas do parasito. Dessa forma, é possível avaliar a eficácia de cura e mesmo mecanismos de ação de diferentes medicamentos sobre o verme, possibilitando uma melhor escolha do modo de tratamento de acordo com o grau de patogenia causado.

Strongyloides venezuelensis é um parasito natural de ratos, inicia seu ciclo parasitário com as larvas infectantes (L3), que penetram na pele do hospedeiro, migram para os pulmões e se instalam no intestino delgado, onde atingem a maturidade. É considerado um ótimo modelo para o estudo da relação parasito/hospedeiro para a estrogiloidíase considerando que o parasito pode ser mantido por várias passagens em animais de laboratório e um grande número de ovos e larvas podem ser obtidos para a

realização de experimentos (Taira et al., 1994). Deve-se considerar ainda, que este helminto não causa morte repentina quando utilizado em infecções altas em ratos quando comparado com espécies relacionadas, como *S. ratti*, que causa morte rápida em ratos e gerbils quando em infecções altas nesses animais (Islam et al., 1999)

Os agentes etiológicos causadores de doenças infecciosas têm demonstrado resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e também aos tratamentos convencionais com drogas sintéticas ou semi-sintéticas, seja por mudanças na composição de antígenos superficiais por meio de mutações gênicas, seja por mutações de genes que determinam a codificação de proteínas estruturais daqueles agentes infecciosos, as quais os medicamentos existentes no mercado se ligam de forma seletiva (Melville et al., 2006; Taylor et al., 2002).

No caso específico de *S. stercoralis* existem alterações nos genes codificadores de proteínas estruturais do citoesqueleto das células da luz intestinal. Essas proteínas são sítios-alvos dos princípios ativos presentes nos derivados benzimidazólicos existentes para o tratamento da strongiloidíase humana. Para *S. stercoralis* o tratamento padrão é o tiabendazol, que foi introduzido no início da década de 60 como tratamento alternativo ao Cambendazol e continua sendo utilizado atualmente no tratamento da strongiloidíase humana (Croft, 1997; Frayha, 1997; Lacey & Gill, 1994, Brown et al., 1961). O cambendazol é utilizado no tratamento da larva currens em humanos na dose de 5mg/ Kg em humanos e na strongiloidíase em equínos e suínos (Ministério da Saúde, 2004).

As plantas sempre representaram para o homem um recurso terapêutico alternativo de enorme importância para as mais variadas doenças. Antes da Segunda Guerra Mundial uma série de produtos isolados de plantas e/ou fungos constituíram-se em agentes terapêuticos

e ainda estão em uso atualmente: quinino (do caule de *Chinchona* sp), morfina e codeína (do látex do Ópio) digoxina (das folhas de *Digitalis* sp) (Phillipinson, 2001).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 60-80 % da população mundial de países em desenvolvimento utilizam-se de algum tipo de medicina tradicional, incluindo o uso de plantas medicinais como cuidados básicos com a saúde (Calixto, 2000). Menos de 10 % de aproximadamente 250000 espécies de plantas com flores em todo o mundo foram investigadas cientificamente para a determinação de suas propriedades farmacológicas e nos Estados Unidos e Inglaterra estima-se que cerca de 25 % das drogas prescritas são isolados direta ou indiretamente de plantas superiores (Anthony et al., 2005; Shu, 1998). No Brasil, estima-se que apenas cerca de 1 % da flora tenha sido estudada quanto ao seu potencial medicinal, e ainda pode ser considerado um número superestimado (Calixto, 2000), visto que a flora brasileira representa mais de 20 % das espécies de plantas mundialmente conhecidas (Petrovick et al., 1999). Muitas dessas plantas possuem propriedades medicinais apenas com comprovação empírica por parte das populações que as utilizam, sem pesquisas que comprovem e/ou encontrem o efeito de seus princípios ativos. Essas plantas podem se tornar fitoterápicos potentes, passíveis de serem produzidos em larga escala de comercialização (Rates, 2001; Stepp & Moerman, 2001; Whitfield, 1996).

O aumento no uso de plantas medicinais como tratamento alternativo de diversas enfermidades está relacionado ao aparecimento de novas doenças, para as quais ainda não existem tratamentos adequados, ao custo elevado para a síntese química, aos efeitos colaterais de produtos sintéticos e aos movimentos ecológicos em países ocidentais que defendem o uso de produtos naturais (Capasso et al., 2000). De outro lado, a viabilidade e o alto custo da terapia em massa para as infecções parasitárias em regiões endêmicas,

principalmente em áreas rurais, o aumento de viagens para essas áreas, que requerem tratamento profilático e a resistência dos parasitos às drogas convencionais são os fatores determinantes para a busca de novas drogas (Anthony et al., 2005)

Comparadas às drogas sintéticas, as plantas medicinais exibem diferenças marcantes como: os princípios ativos são quase sempre desconhecidos; a padronização, estabilidade e controle de qualidade são possíveis, mas de difícil execução; a viabilidade e qualidade dos materiais em estado bruto são problemáticas; testes de toxicidade e prova de eficácia com controle de qualidade são raros; o uso empírico pela população é uma característica comum; possuem uso terapêutico amplo e conveniente para tratamento de doenças crônicas; os efeitos colaterais parecem ser menos freqüentes quando comparados às drogas de uso convencional, mas existem; geralmente custam menos que as drogas sintéticas (Calixto, 2000).

Vários dados da literatura mundial têm demonstrado o uso empírico de plantas medicinais como primeiros cuidados para o tratamento de parasitoses intestinais com relatos de cura de tais infecções. Geralmente as populações utilizam as plantas sob forma de chás ou infusões que são tomadas de variadas formas. Há que se considerar ainda a forma em que os extratos, chás e infusões, em que a planta foi preparada para utilização: sementes, folhas secas ou frescas, raízes, caule ou todas as suas partes (Santayana et al., 2005; McDonald et al., 2004; Jones, 1996)

A família Chenopodiaceae possui mais de 1500 espécies e *C. ambrosioides* é uma das espécies mais utilizadas no tratamento das mais diversas enfermidades, entre elas as parasitoses intestinais (Jouad et al., 2001, Dinan et al., 1998).

No início do século XX, o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, popularmente conhecida, no Brasil, como erva de Santa Maria ou Mastruz, foi amplamente

utilizado no tratamento de infecções causadas por parasitos intestinais. Smilie & Pessoa (1924) e Nelson (1920) foram os pioneiros a descreverem detalhadamente a composição do óleo essencial e a sua utilização como potente vermífugo no início do século passado e o mesmo tornou-se altamente industrializado fazendo parte da farmacopéia de alguns países como os Estados Unidos e Argentina e por alguns anos fez parte do índice de produtos da Merck, uma das maiores companhias fabricantes de medicamentos do mundo (Gadano et al., 2006; Kliks, 1985; Merck & Co., 1976).

O óleo foi amplamente utilizado na cura de pacientes com algum tipo de verminose pelo alto poder de cura atribuído ao seu principal constituinte, o ascaridol, que chega a representar cerca de 70 % da composição do óleo (McDonald et al., 2004; Bonzani et al., 2003; Nelson, 1920). No entanto, seu uso foi descontinuado do mercado nacional devido às overdoses que causaram intoxicações fatais. No Brasil, estima-se que por volta de 1930 mais de um milhão de pessoas foram submetidas ao tratamento com o óleo essencial de *C. ambrosioides* e cerca de 22 pessoas morreram devido aos seus efeitos colaterais (Garcia et al., 1997; Kliks, 1985).

Modelos experimentais de infecção de animais com helmintos intestinais vem sendo alvo de vários estudos no que diz respeito a testes de diferentes drogas consideradas antihelmínticas, sejam fármacos sintéticos obtidos de vegetais e/ou fungos antes utilizados somente em bovinos como a ivermectina (Satou et al, 2001; Amato Neto et al., 1997; Njoroge et al., 1997). Substâncias como a artemisinina e seus derivados semi-sintéticos, extraídos de *Artemisia annua* inicialmente testados em pesquisas com malária (Meshnick, 2002) vêm sendo utilizadas no tratamento e como profilático em infecções experimentais de animais com *Schistosoma* sp (Shuhua et. al, 2000; Shuhua et al., 2002), e no tratamento da clonorquíase em humanos (Tinga et al., 1999).

Para *Strongyloides* sp, não há relatos de trabalhos que utilizem em modelo experimental, *in vivo*, *Chenopodium ambrosioides* como forma de tratamento ou como profilático, sob forma de chás, infusões, decocção ou sob a forma de extratos alcoólicos ou aquosos. Considerando ainda a resistência de *S. stercoralis* ao tratamento com derivados benzimidazólicos atualmente disponíveis no mercado, faz-se necessária a busca de novos medicamentos para o tratamento da estrogiloidíase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Strongyloides stercoralis*

Strongyloides stercoralis foi pela primeira vez relatado como sendo causador de diarreia na cidade de Toulon (França) em 1876 após Normand examinar fezes diarreicas de soldados vindos da Conchinchina (Vietnã). Inicialmente o parasito foi nomeado de *Anguillula stercoralis*, no caso de formas encontradas em fezes diarreicas e de *Anguillula intestinalis* para as formas encontradas no intestino de indivíduos necropsiados. Após trabalhos de Leuckart, ficou demonstrado que as duas formas pertenciam à mesma espécie, a primeira sendo a larva filarióide que originará a forma parasita e a segunda a forma parasitária que originará o adulto de vida livre (Genta, 1986).

No Brasil, Ribeiro da Luz, em 1880, foi quem deu importância relevante ao estudo do agente etiológico da strongiloidíase humana e foi o precursor de vários estudos que demonstraram uma grande variação da prevalência desta helmintíase, que está ligada a fatores como faixa etária, diferenças socioeconômicas e geográficas das populações estudadas. As taxas de prevalências chegam a variar cerca de 60 % (Machado & Costa-Cruz, 1998, Pires & Dreyer, 1993).

Strongyloides pertence ao Filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabditoidea e Família Strongyloididae que engloba 52 espécies dentro do gênero *Strongyloides* (Grove, 1996). Duas espécies e uma subespécie causam infecção no homem, *S. stercoralis* e *S. fulleborni*, *S. fulleborni kellyi* (Pires & Dreyer, 1993; Barnish & Ashford, 1989; Hira & Patel, 1980).

A estrogiloidíase ocupa o quinto lugar dentre as parasitoses causadas por helmintos e estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estejam acometidas por *S. stercoralis* em todo o mundo (Maruyama et al. 1996; Nolan et al., 1999). As demais espécies têm importância veterinária, pois existem altos índices de infecção em bovinos, eqüinos, suínos.

2.2. Tratamento da estrogiloidíase

Existe uma grande variação na avaliação e eficácia de drogas para a terapia e profilaxia das doenças parasitárias, tanto em humanos quanto em animais domésticos. Para as protozooses e helmintíases existe tratamento adequado resultante principalmente de drogas desenvolvidas e introduzidas no início dos anos 60. Os derivados benzimidazólicos oferecem maiores avanços no tratamento das infecções gastrointestinais causadas por helmintos (Croft, 1997).

Dois derivados benzimidazólicos são eficazes no tratamento da estrogiloidíase humana: o tiabendazol e o cambendazol. Ambos são administrados via oral e atuam bloqueando a captação da glicose pelo helminto. O tiabendazol age sobre o verme adulto, mas em doses terapêuticas tem duvidosa ação larvicida ou ovicida. Os índices de cura com tiabendazol variam de 70 % a 90 % dependendo da severidade da doença e do modo de administração. O cambendazol é um composto relacionado ao tiabendazol com vantagem de atuar sobre formas larvárias e por ser eficaz em doses mais baixas, praticamente livres de efeitos colaterais (Baranski et al., 1978, Martirani et al., 1976, Pires, 1989).

Estudos na década de 70 com a dose de 5mg/ Kg de peso de cambendazol, em dose única, em comparação com a dose de 50 mg/ Kg de peso, em dose única recomendada

para o tiabendazol, indicaram que o cambendazol apresentava uma potência superior à do tiabendazol, atribuindo-se esta propriedade a uma alteração no metabolismo da substância (Rodrigues et al., 1977). O tiabendazol quando comparado com o cambendazol é altamente inativado pela hidroxilação metabólica na posição 5 e a introdução de um grupo acilamino no carbono 5, como acontece no cambendazol, parece inibir esta rápida metabolização, conferindo assim maior eficácia intrínseca ao medicamento (Hoff et al., 1970). No entanto, alguns testes com cambendazol elevado índice de cura (95 %) em pacientes positivos para *S. stercoralis* após administração de 500 mg de substância ativa para adultos, e em forma de suspensão contendo 100mg em 10 mL, para crianças em dose única apresentaram efeitos colaterais. Nos Estados Unidos, após ter provocado a morte de animais de laboratório depois de testes com concentrações altas, o cambendazol foi retirado do mercado (GROVE, 1990).

Desde a sua introdução em 1961 (Brown et al., 1961), o Tiabendazol (TBZ) vem sendo a droga padrão para o tratamento da estrogiloidíase humana. Geralmente administra-se 50mg/ Kg/peso, máximo de 3g fracionadas em duas doses, durante três dias. Os efeitos colaterais, freqüentes em 1/3 dos pacientes, manifestam-se por tontura, cefaléia, náuseas, vômitos e dores abdominais, mialgia e fadiga (Satou et al., 2001; Pires, 1989). Atualmente o TBZ é droga de escolha apenas para o tratamento dos casos de estrogiloidíase disseminada. A família dos benzimidazólicos é a que tem melhor transporte pelo sangue sendo bastante eficaz na fase de migração do parasito (Vieira et al., 1989; Pitisuttithum & Chindanond, 1995)

No início do tratamento da estrogiloidíase com TBZ obteve-se um índice de cura que variou de 55 a 100 %, quando administrado em altas doses (Franz, 1963; Aziz, 1969; Most et al., 1965). Grove (1982a), observou efeitos colaterais severos em pacientes tratados

com 25 mg/ Kg duas vezes ao dia durante três dias. Neste estudo, o autor verificou que 89 % dos 43 pacientes incluídos no tratamento apresentaram anorexia, vômito, tonturas e dores abdominais e seis meses depois do tratamento, 7 % dos pacientes encontraram-se novamente positivos para *S. stercoralis*, atribuindo a positividade à baixa eficiência do tiabendazol.

Grove (1982b) obteve uma eliminação de 94 % para larvas de *S. ratti* em fêmeas de camundongos C57BL/6 infectadas com 500 larvas e tratadas nos dias 3 e 4 pós-infecção (p.i) com 50 mg/ Kg/dia. Não houve redução significativa para o número de vermes adultos quando os animais foram infectados com 3000 larvas no 4º e 5º dias pós-infecção (p.i) e avaliados no 6º dia p. i.

Grove & Northern (1986) avaliaram o efeito, *in vitro*, do cambendazol, tiabendazol e mebendazol diluídos em PBS 0,1 M, pH 7,4, sobre *S. ratti* e *S. stercoralis* e não encontraram efeitos sobre a eclosão de larvas, viabilidade de larvas infectantes e vermes adultos de *S. ratti*. No entanto, as drogas inibiram o desenvolvimento de larvas rabditóides de *S. stercoralis* e apenas o cambendazol inibiu a infectividade das larvas filarióides de *S. ratti* e *S. stercoralis*.

Satou et al. (2001) demonstraram *in vitro* que o TBZ não causou a mortalidade de larvas filarióides quando usado em concentração alta de 250µM. A concentração (PC50) que paralisa 50 % das larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* foi de 190 µM.

Satou et al. (2002) avaliaram a atividade nematocida, *in vitro*, da ivermectina, albendazol e tiabendazol e compararam com alcalóides de isoquinoline isolados de *Macleaya cordata* (Ranunculales, Papaveraceae) sobre larvas infectantes de *S. venezuelensis* e *S. ratti*, em água destilada a 37 ° C, mostrando que três alcalóides de isoquinoline apresentaram efeito equivalente sobre as larvas filarióides de *S. ratti* e *S.*

venezuelensis e apenas a papaverina teve forte efeito contra *S. venezuelensis*. A mortalidade foi observada por cálculo da concentração de paralisia (PC50). Os autores também demonstraram que a ivermectina foi mais eficaz que o albendazol e este mais eficaz que o tiabendazol na concentração de 2,3µM para *Strongyloides venezuelensis*. No caso de *S. ratti*, nenhum composto superou a eficácia da ivermectina.

O efeito da ivermectina sobre *Strongyloides venezuelensis* também foi testado por Amato-Neto et al. (1997). Os autores inocularam via subcutânea 2000 larvas em fêmeas de ratos albinos e administraram duas preparações comerciais (Ivomec, de uso veterinário e o Mectizan, de uso humano) com o mesmo princípio ativo na concentração de 0,2 mg/ Kg em dose única. Os medicamentos foram administrados após um e oito dias da infecção e os animais avaliados no 12º d.p.i. Observou-se diminuição significativa do número de vermes adultos recuperados do intestino entre animais tratados e não tratados para as duas preparações, sendo o ivomec mais eficaz, 98 % contra 59 % do Mectizan quando administrados no 8º d.p.i.

Compostos não benzimidazólicos vem sendo testados como alternativa do tratamento contra a strongiloidíase com o objetivo de descobrir uma nova droga mais eficaz e menos tóxica no tratamento da doença. Em alguns casos, os estudos têm combinado a administração de duas ou mais drogas:

Armson et al (1995b) testaram o efeito da ciclosporina A (30mg Kg⁻¹) e do tiabendazol (5 ou 10 mg Kg⁻¹) individualmente e em conjunto, via oral, no tratamento de ratos infectados com *S. ratti* e verificaram que houve redução significativa no número de larvas excretadas nas fezes dos animais para as duas drogas. Quando as mesmas foram co-administradas não houve efeito sinérgico no 4º dia pós-infecção.

As larvas de *S. stercoralis* são eliminadas nas fezes do hospedeiro. No caso de *S. venezuelensis*, espécie parasita natural de roedores observa-se ovos larvados nas fezes, que encontrando condições adequadas no ambiente permitem a eclosão das larvas rabditóides que se desenvolvem em larvas filarióides infectantes (Little, 1966)

Com a introdução do tiabendazol (TBZ) no mercado, em 1961, surgiram vários estudos com animais experimentais infectados com *Strongyloides venezuelensis* e *S. ratti* com o objetivo de avaliar a eficiência de cura do TBZ em diferentes esquemas de tratamento e ao mesmo tempo seguiram-se estudos realizados *in vitro* com o intuito de avaliar a viabilidade de larvas, vermes adultos e ovos. Paralelamente foram realizadas várias pesquisas sobre técnicas de diagnóstico que fossem mais sensíveis e específicas para a detecção da infecção *in vitro* e *in vivo* para uma melhor escolha do tratamento. Essas técnicas abrangem desde o diagnóstico clínico, passando pelo exame de amostras de fezes, fluídos corporais e de diagnóstico imunológico da doença, uma vez que apenas o diagnóstico parasitológico fecal, na maioria das vezes, apresenta falso negativo.

É necessária a introdução de novas drogas contra a doença, tendo em vista, que o parasito vem desenvolvendo um mecanismo de resistência cada vez mais eficiente contra o tiabendazol. Resistência aos derivados benzimidazólicos foi observada após três anos de sua introdução como tratamento de helmintos e hoje é um problema mundial para a medicina veterinária (Lacey & Gill, 1994; Wagland et al., 1992). Ao longo dos anos de tratamento com tiabendazol, acredita-se que existam linhagens de *S. stercoralis* resistentes ao medicamento. O mecanismo de resistência do parasito está relacionado à mutação de genes codificadores da molécula de β - tubulina, proteína estrutural do citoesqueleto das células intestinais de helmintos e que é alvo dos derivados benzimidazólicos (Croft, 1997).

Os derivados benzimidazólicos inibem a polimerização dos dímeros que compõem as moléculas de β - tubulina, bloqueando as funções vitais da célula, entre elas a divisão celular do parasito (Dumontet e Branimir, 1999; Lubega et al., 1993, Lacey, 1990). Há interferência na absorção de nutrientes pelo intestino do parasito, pois as moléculas de β - tubulina são os principais componentes dos microtúbulos que formam o citoesqueleto das células intestinais do parasito impedindo que ocorra a absorção de glicose (Jasmer et al., 2000; Petersen et al., 1997; Frahya et al., 1997; Armson et al., 1995a; Prichard, 1973).

Além do mecanismo de não polimerização das moléculas de β - tubulina, ocorre a inativação da enzima fumarato redutase que faz parte da cadeia de reações que promove a quebra da glicose para que a mesma seja absorvida no intestino do parasito (Martin et al. 1997). O parasito não conseguindo absorver glicose morre por carência desse nutriente impossibilitado de realizar seus mecanismos de obtenção de energia e conseqüentemente de manter seu ciclo evolutivo dentro do hospedeiro (Frayha et al., 1997).

A forma de resistência está relacionada aos genes que codificam a molécula de β - tubulina, que promovem rearranjo nas cadeias de aminoácidos constituintes da molécula, impedindo que o fármaco se ligue de forma seletiva a mesma (Melville et al., 2006; Robinson et al., 2004; Taylor et al., 2002; Lacey e Gill, 1994).

Strongyloides stercoralis pode manter-se no organismo humano por mais de 50 anos, por meio de auto-infecção, provocar hiperinfecção em imunossuprimidos e tem se mostrado resistente. O tiabendazol, tratamento padrão durante anos, não é mais tão eficaz na síndrome de hiperinfecção e em alguns casos tem sido substituído pelo albendazol. A ivermectina tem sido introduzida como tratamento alternativo em pacientes com strongiloidíase crônica e em pacientes HIV+ , e possui alta eficácia e baixa toxicidade em

relação aos derivados benzimidazólicos (Daltry et al., 1994; Gann et al., 1994; Ottesen e Campbell, 1994)

2.3. *Chenopodium ambrosioides* L.

Chenopodium ambrosioides é uma erva medicinal que vem sendo utilizada como tratamento de parasitoses há muitos anos de forma empírica pelas populações de diversos países. São relatados diversos usos da planta com efeito vermífugo (Gadano et al., 2002; Noumi e Yomi, 2001; Blanco et al., 1999, Kliks, 1985) e inseticida (Tavares & Vendramim, 2005; Delobel & Melonga, 1987; Peterson et al., 1989). Os principais usos terapêuticos descritos na literatura são contra desordens digestivas, respiratórias, uro-genitais, vasculares, hepáticas diabetes, hipercolesterolemia, sedativo, antipirético e antireumático, antialérgico, hipotensivo (Jouad et al., 2001; Hernández et al., 2000; Shinwari e Khan, & 2000; Gohar e Elmazar, 1997; De Feo & Sanatore, 1993), antiinflamatório e antiséptico (Grupta & Behari, 1972), fungicida e antibacteriano (Kishore et al., 1993, Lall & Meyer, 1999), no tratamento de úlceras causadas por *Leishmania brasiliensis* (França et al., 1996), contra *Plasmodium falciparum in vitro* (Pollack et al., 1990), moluscocida (Hamamouchi et al., 2000) e ainda possui efeito alelopático em culturas de milho (Jiménez-Osornio, 1996)

O uso desta planta aromática é considerado antigo, há relatos de plantas selvagens crescendo em associação com ruínas abandonadas em Pueblo. Os Maias pré-colombianos de Yucatan chamavam a planta de *lucumxiu* (planta do verme). Ilustrações da planta aparecem no século XVI, no catálogo Florentino de Sahagún e ilustrações feitas pelos Astecas. Na literatura européia, a primeira descrição da planta aparece no século XVIII, quando o botânico sueco Peter Kalm (1715 – 1779) reporta o seu uso como vermífugo,

contra *Ascaris*, por nativos e europeus de colônias americanas (Kliks, 1985). Extratos alcoólicos de sementes e o óleo essencial foram por muitos anos considerados específicos para o tratamento das helmintíases intestinais e eram oficialmente reconhecidos pela farmacopéia nos Estados Unidos entre 1820 e 1947 e no Formulário Nacional entre 1820 e 1960. Em 1985, o óleo essencial de *C. ambrosioides* ainda constava do índice médico-veterinário da Merck (Kliks, 1985).

A família Chenopodiaceae engloba mais de 1500 espécies agrupadas em cerca de 120 gêneros, sendo que existem cerca de 250 espécies no gênero *Chenopodium* (Jouad et al., 2001; Dinan et al., 1998). A espécie *C. ambrosioides*, também conhecida como erva de Santa Maria (Brasil), Paico (Peru), Wormeseed (Estados Unidos) Pazote, Epazote verde, Epazote colorado, Epazote blanco (México), T'u-Ching-chieh (China), L' anserine vermifuge, na França, Wurmsamen Gansefuss, na Alemanha (Kliks, 1985), tem sido objeto de vários estudos sobre seu efeito antiparasitário contra helmintos de ruminantes como *Haemonchus contortus* (Ketzi et al., 2002) e contra helmintos parasitas de humanos como o caso de *Ascaris lumbricoides* (De Guimarães, 2001). Além de pesquisas realizadas com helmintos de animais de criação ou com parasitos de humanos, comunidades de vários países, tais como Argentina, África, Peru, Chile e México têm relatado esta erva como um importante meio alternativo para o tratamento de parasitoses em geral, seja na forma de chás e/ou infusões.

No que diz respeito às infecções experimentais com parasitos, o extrato ou óleo essencial de *C. ambrosioides* tem sido bastante avaliado quanto à redução de parasitemias e efeitos tóxicos em linfócitos humanos (Gadano et al., 2006; Gadano et al., 2002). Ketzi et al., 2002, verificaram que não houve eficiência do óleo essencial de *C. ambrosioides* na infecção experimental de ruminantes com *Haemonchus contortus* e tratados com as doses

de 0, 1, 0,2 e 0,4 mL/ Kg animal . Okuyuma et al. (1993) observaram uma eficiência de 69% de efeito analgésico do ascaridol (composto majoritário presente no óleo essencial de *C. ambrosioides*) em camundongos na dose de 2g Kg⁻¹/animal via oral. Esses autores também verificaram efeito hipotérmico na dose de 100mg Kg⁻¹ /animal e morte de 75 % de camundongos tratados com 300mg Kg⁻¹ /animal. Alguns trabalhos também têm relatado o efeito antiparasitário em humanos, porém utilizando a forma popular de preparação de *C. ambrosioides*, seja na forma de chás, infusões ou simplesmente sob a forma de suco da planta.

São escassos os estudos que avaliam o efeito antiparasitário bioativos do extrato bruto aquoso ou hidroalcóolico, infusões, decocções e chás de *C. ambrosioides*, bem como, a determinação de concentrações a serem utilizadas e de compostos químicos presentes nos mesmos. A grande maioria dos estudos está relacionada à identificação e efeitos de substâncias químicas presentes em seu óleo essencial utilizando modelos experimentais *in vitro*.

No início do século XX cerca de um milhão de pessoas com algum tipo de parasitose intestinal foram tratadas com o óleo essencial de *C. ambrosioides* e 22 pessoas morreram devido aos efeitos neurotóxicos provocados pela administração da planta, que em concentrações altas é fatal (Kliks, 1985). O uso do óleo essencial de *C. ambrosioides* em humanos foi descontinuado devido a sua alta toxicidade (Smilie & Pessoa, 1924; Nelson, 1920).

Okuyama et al. (1993) relataram o efeito neurotóxico do óleo essencial desta planta quando o mesmo foi utilizado em uma concentração de 300mg/ Kg/peso em camundongos machos da linhagem ddy, heterogênica para o locus Dão – 1 (deficiente para

a atividade D - amino ácido oxidase). Esses autores verificaram hipotermia, diminuição na atividade locomotora, queda de pressão e espasmos musculares nos animais estudados.

Existem também alguns estudos que comprovam sua ação contra protozoários como *Plasmodium falciparum* (Pollack et al., 1990), *Trypanosoma cruzi* (Kiuchi et al., 2002) e *Giardia lamblia* (Ordóñez et al., 2001) e também seu poder inseticida contra insetos-pragas de grãos armazenados como *Sitophilus zeamais* (Tavares & Vendramim, 2005) e até mesmo seu efeito antibacteriano contra *Mycobacterium tuberculosis* (Lall & Meyer, 1999).

Gadano et al (2002) demonstraram o efeito mutagênico do óleo essencial em cultura de linfócitos humanos. Os autores encontraram um alto índice de mutações cromossômicas e rompimento de cromátides naquelas células.

Hamamouchi et al. (2000) observaram a ação moluscicida do extrato de *C. ambrosioides* obtido com acetato de etila 24h após a exposição de moluscos *Bulinus truncatus* (Pulmonata, Bulinidade) a uma concentração letal 90 (CL90) de 2,23ppm.

Strongyloides stercoralis, tem apresentado resistência ao tratamento com antihelmínticos tradicionais, sendo o tiabendazol, droga padrão contra a estrongiloidíase, não mais eficiente (Dayan, 2003; Frayha et al. 1997; Martin et al., 1997; Grove, 1996; Lacey e Gill, 1994; Genta, 1989); ocorrendo em alguns casos a não eliminação total das formas parasitárias em humanos, Grove, 1982b).

Considerando fatores como resistência do parasito à terapêutica tradicional, efeitos colaterais, dificuldade de eliminação de formas larvárias e ainda o risco de hiperinfecção, torna-se necessária pesquisa de produtos naturais, sintéticos e/ou semi-sintéticos, como alternativa para tratamento de parasitas intestinais. Considerando estes fatores, o presente

estudo avaliou o efeito anti-helmíntico do extrato hidroalcóolico e frações de *C. ambrosioides* sobre *S. venezuelensis*.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliação do efeito anti-helmíntico do Extrato bruto de *Chenopodium ambrosioides* sobre camundongos infectados experimentalmente com *Strongyloides venezuelensis*.

3.1 Objetivos específicos:

- ❖ Obtenção do extrato bruto hidroalcólico liofilizado (EHA) de *Chenopodium ambrosioides*;
- ❖ Estabelecer a concentração resposta do extrato bruto hidroalcólico liofilizado (EHA) de *C. ambrosioides* para a diminuição do número de ovos e fêmeas parasitas de *Strongyloides venezuelensis*;
- ❖ Comparar a concentração resposta do EHA de *C. ambrosioides* sobre o número de ovos e de fêmeas parasitas com o tiabendazol;
- ❖ Realizar o fracionamento do Extrato bruto hidroalcólico liofilizado de *C. ambrosioides* e avaliar o efeito anti-helmíntico das frações de diferentes polaridades obtidas a partir do EHA sobre o número de ovos e de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*;
- ❖ Identificar classes de compostos presentes nas frações obtidas a partir do EHA de *C. ambrosioides* que possam ser bioativas contra *S. venezuelensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Chenopodium ambrosioides foi cultivada a partir do plantio de sementes coletadas de exemplares da planta na região de Jaguariúna (SP) no período de agosto – dezembro de 2002. O cultivo realizou-se durante os meses de agosto - dezembro de 2004 na horta do INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNICAMP (**Figura 1 e 2**).

As partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* foram coletadas e identificadas no Herbário UEC, no qual uma exsicata encontra-se depositada sobre o número de tombo 143517 no Herbário UEC da Universidade Estadual de Campinas.

As folhas (1800g) foram secas a 45° C por 48h em estufa com circulação de ar forçada, moídas em moinho de facas modelo Fabbi.



Figura 1. *Chenopodium ambrosioides* L. – Horta do Instituto de Biologia



Figura 2. A: folhas e B: inflorescências de *Chenopodium ambrosioides* L.

4.2. Fitoquímica

Todos os procedimentos de processamento da planta para a obtenção e fracionamento do extrato bruto hidroalcólico liofilizado (EHA) e análises cromatográficas foram realizados na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF) do CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS DA UNICAMP (CPQBA), localizado em Paulínia (SP).

4.2.1. Preparação do Extrato Hidroalcólico de *C. ambrosioides* (EHA)

Foram utilizadas folhas secas e moídas de *C. ambrosioides* para a preparação do extrato hidroalcólico. Foram pesados 100g para a extração em solução de etanol: água (70:30) 1000 mL em sistema ultra turrax (modelo IKA T25), durante 3 min à temperatura ambiente, seguido de filtração a vácuo. O resíduo das folhas foi re-extraído de modo análogo com 1000 mL da solução etanol:água. Após filtração, os extratos foram agrupados, evaporados a vácuo em evaporador rotativo (modelo FISATON 802D), seguido de liofilização em Liofilizador VIRTIS SENTRY 8L, obtendo-se o extrato bruto hidroalcólico liofilizado (EHA), Wagner e Bladt, 1995 ,**Figura 3**.

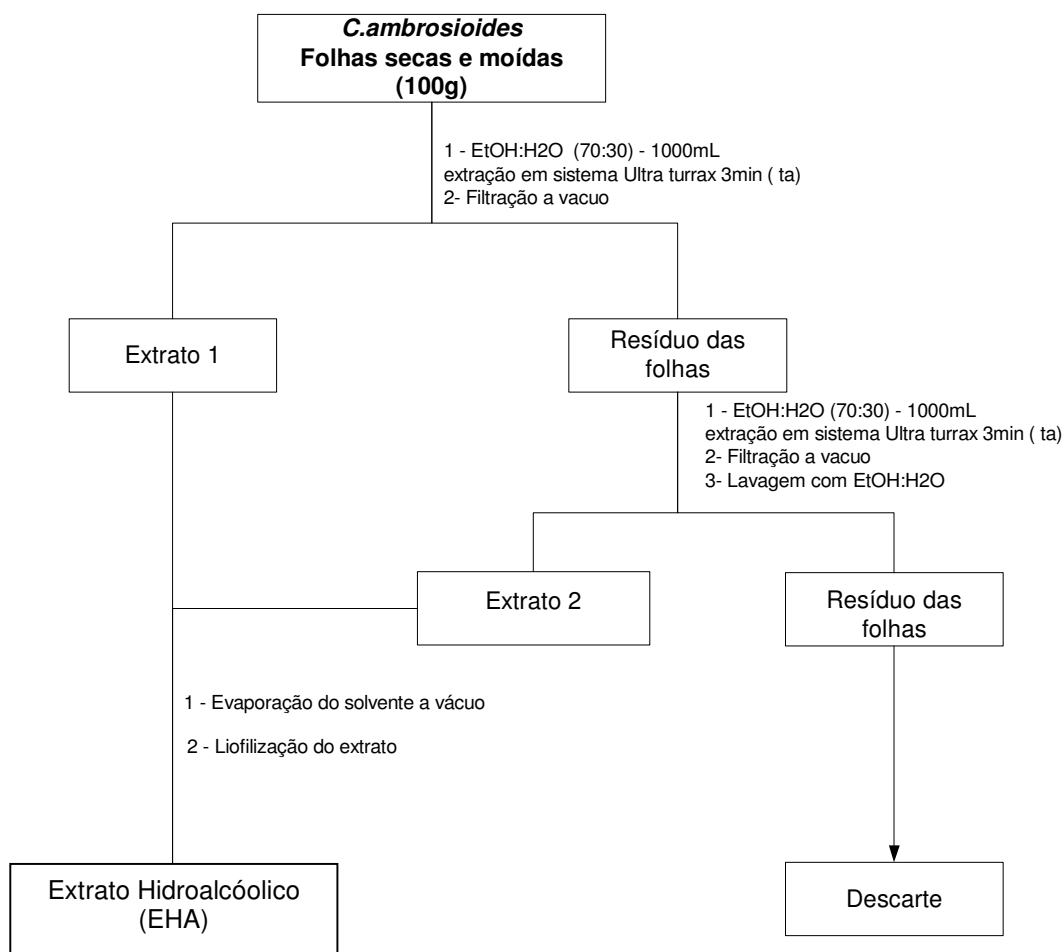


Figura 3. Preparação do Extrato hidroalcolólico liofilizado de *C. ambrosioides*

4.2.2. Fracionamento do EHA liofilizado de *C. ambrosioides*

O fracionamento do EHA liofilizado de *C. ambrosioides* (5,0g) foi realizado em coluna seca, utilizando como suporte, membrana de acetato de celulose de 2 cm de diâmetro e 50 cm de altura, empacotada com sílica – gel 60 (0,063 – 0,200 mm) Merck 1.07734.1000. Foi utilizada uma solução de clorofórmio: metanol (90:10) como eluente. Após eluição, a coluna foi cortada em seis partes iguais. O material foi extraído da sílica com clorofórmio: metanol (90:10) ou metanol 100 %, seguido de filtração e evaporação do

solvente a vácuo em evaporador rotativo (modelo FISATON 802D).As frações foram mantidas em geladeira até o momento da administração aos animais.

4.2.3. Análises Cromatográficas

4.2.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O EHA e as frações obtidas em coluna seca foram analisados por CCD, utilizando-se cromatoplasmas de alumínio (Merck – artigo 5554) em diferentes eluentes e reveladores:

Eluentes: Hex: AcOET (80:20 v/v); Hex : AcOEt (50:50);

Clorofórmio: MeOH (98:2); clorofórmio : MeOH (90:10) e AcOEt : AF : HOAc : H₂O : [100:11:11:26].

A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada Ultravioleta – UV a 254 e 366 nm, seguida de pulverização com solução de revelador segundo método de Wagner e Bladt (1995).

Reveladores:

1- Solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50:1: 0,5) para detecção de compostos terpênicos.

2- Solução de NP (difenilborânico) para detecção de compostos fenólicos, Wagner. e Bladt (1995).

Após aplicação do revelador, a placa foi seca em estufa a 100°C por 5 min.

4.2.3.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As frações obtidas em coluna seca foram analisadas por CG-EM em Cromatógrafo HP 5890 série II, acoplado com um detetor seletivo de massas HP5971, equipado com coluna capilar HP-5 (25m x 0,2mm x 0,33 μ m). As condições de análises utilizadas seguiram a metodologia de Kassuya et al., 2005:

- Temperaturas: Injetor: 280° C
- Detetor: 300° C
- Coluna: 150° C (2 min), 5° C/min, 240° C/min Tf=300° C (34 min)
- Gás de arraste: Hélio (1,0 mL/min)
- Volume de injeção: 1 μ L (15-20mg/ mL)

4.3. Material animal

4.3.1. Camundongos

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos SWISS machos SPF com 30 dias de idade. Todos os animais foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

4.3.2. *Strongyloides venezuelensis*

Em todos os experimentos foi utilizada uma linhagem de *Strongyloides venezuelensis*, isolada de roedor silvestre *Holochilus brasiliensis* em 1986 e mantida em ratos *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.3.2.1. Obtenção das larvas filarióides (L3) de *Strongyloides venezuelensis* e infecção dos camundongos

As larvas filarióides (L3) foram obtidas por meio de cultura de fezes dos ratos infectados rotineiramente para manutenção de cepas de *S. venezuelensis*. As fezes foram coletadas, homogeneizadas em água filtrada (50 mL) e misturadas em carvão animal granulado (100g) para a neutralização do pH fecal. Em seguida, as culturas foram mantidas à temperatura de 37° C por 48h. Após esse período, as larvas filarióides foram concentradas pelo método de Rugai, Mattos & Brisola (1954), quantificadas em microscópio estereoscópico para infecção dos animais. Cada camundongo foi infectado individualmente com aproximadamente 1500 larvas filarióides (L3) por meio de injeção subcutânea na região abdominal.

4.4. Quantificação de ovos e das fêmeas parasitas

No 6º dia pós-infecção (d.p.i) os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para quantificação de ovos por grama de fezes e de fêmeas parasitas no intestino

dos animais. As fezes foram colhidas do reto para análise quantitativa pelo método de Cornell-McMaster (Georgi, 1974).

Para a quantificação das fêmeas parasitas, o intestino delgado de cada animal foi excisado em um comprimento de 15 cm, colocado individualmente em placa de Petri contendo solução salina 0,15M. Cada intestino foi seccionado longitudinalmente e colocado em estufa a 37°C por 1h. Em seguida as fêmeas foram coletadas, mortas pelo calor e conservadas em TAF até o momento da contagem.

4.5. Administração do EHA de *Chenopodium. ambrosioides* e do Tiabendazol (TBZ)

Tanto o EHA de *C. ambrosioides* como o TBZ (50mg Kg⁻¹/animal/dia) foi administrado, via oral, por gavagem em todos os experimentos. Ambos tiveram como veículo água filtrada e as concentrações foram ajustadas de acordo como os pesos corporais dos animais em cada experimento. No experimento em que o TBZ foi testado, utilizou-se o medicamento comercial TIABEN® (Uci-Pharma) sob forma de suspensão contendo 50 mg composto ativo/ mL.

4.6. Teste de diferentes concentrações do EHA liofilizado de *Chenopodium ambrosioides* sobre *Strongyloides venezuelensis*.

Inicialmente foi avaliado o efeito anti-helmintico de três concentrações do EHA liofilizado de *C. ambrosioides* sobre o número de ovos e de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*. Foram testadas as concentrações de 100mg, 250mg e 400mg Kg⁻¹/animal/dia

do EHA para determinação da concentração resposta para a diminuição ou eliminação das formas parasitárias de *S. venezuelensis*, Foram formados grupos de 10 camundongos para o teste das concentrações, sendo: GI: camundongos infectados e tratados com 100mg Kg⁻¹/animal/dia; GII: camundongos infectados e tratados com 250 mg Kg⁻¹/animal/dia; GIII: camundongos infectados e tratados com 400 mg Kg⁻¹/animal/dia e GC (controle): animais infectados e que receberam água filtrada. O tratamento dos grupos iniciou-se 24h após a infecção com duração de cinco dias. O OPG e número de fêmeas foram quantificados no 6º dia pós-infecção (d.p.i), Também foram analisadas a fecundidade, variação da fecundidade e de fêmeas de *S. venezuelensis* recuperadas e a eficácia dos tratamentos.

4.7. Estudo comparativo do efeito anti-helmíntico entre a concentração resposta do EHA de *Chenopodium. ambrosioides* e o Tiabendazol

Após a determinação da concentração resposta do EHA de *C. ambrosioides* para o número de ovos e número de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*, a mesma foi comparada com o Tiabendazol para o tratamento da estrogiloidíase em esquemas de tratamentos pós e pré-infecção dos animais com *S. venezuelensis*. Os procedimentos de infecção, quantificação de ovos e fêmeas parasitas e administração das drogas realizaram-se como descrito no item 4.5.

4.7.1.Tratamento

4.7.1.1. Pós-Infecção

Para a avaliação do efeito EHA de *C. ambrosioides* e do TBZ sobre o número de ovos e de fêmeas parasitas, os animais foram infectados com 1500 larvas filarióides de *S. venezuelensis* e tratados 24h pós-infecção durante cinco dias. Foram formados três grupos de 10 camundongos cada, para esta avaliação: GI: animais infectados e tratados com a concentração resposta do EHA de *C. ambrosioides*; GII: animais infectados e tratados com TBZ; GC: animais infectados e que receberam água filtrada. Os animais foram sacrificados no 6º d.p.i para contagem de ovos e das fêmeas parasitas, como mostra a **Figura 4**:

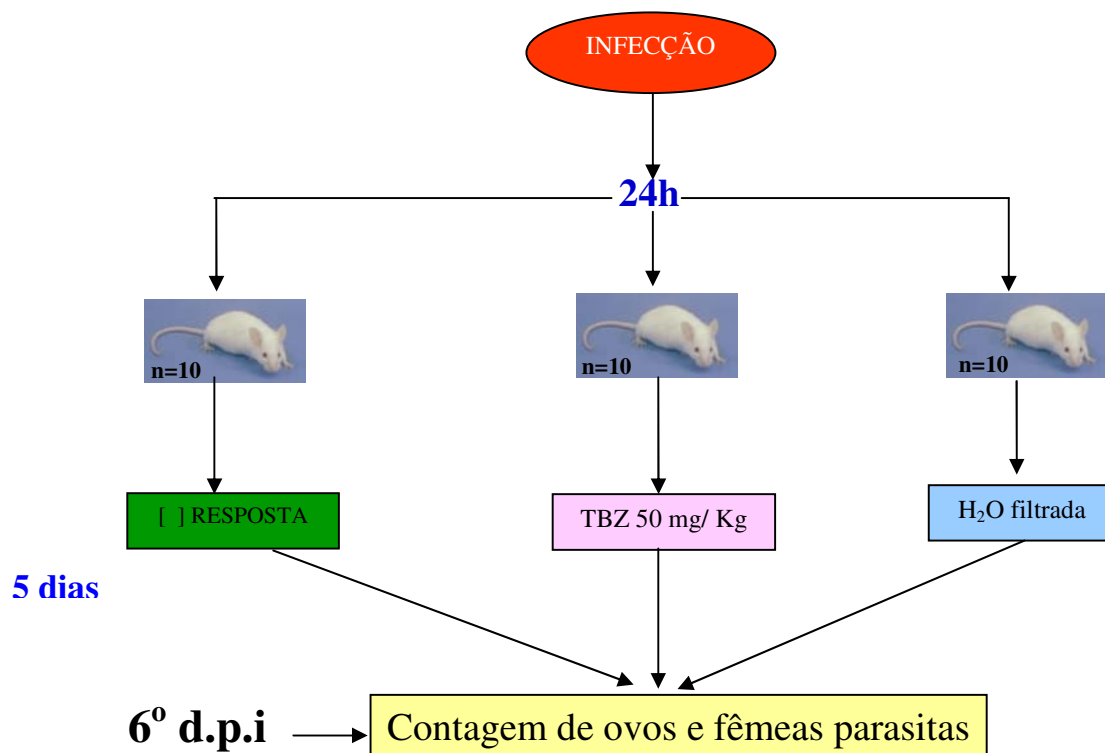


Figura 4. Desenho experimental do tratamento pós - infecção com a concentração resposta do EHA de *C. ambrosioides* e Tiabendazol (50mg Kg⁻¹/animal/dia).

4.7.1.2. Pré-Infecção

Foram formados dois grupos de 10 camundongos cada para a avaliação do efeito do EHA de *C. ambrosioides* e do TBZ: GI: animais que receberam o EHA de *C. ambrosioides* durante cinco dias, foram infectados 24h após o último tratamento; GII: animais que receberam TBZ durante cinco dias e infectados 24h após o último dia de tratamento. Como controles foram utilizados os animais controle do tratamento pós-infecção. Os grupos foram avaliados no 6º d.p.i. para contagem de ovos e fêmeas parasitas, como mostra a **Figura 5**.

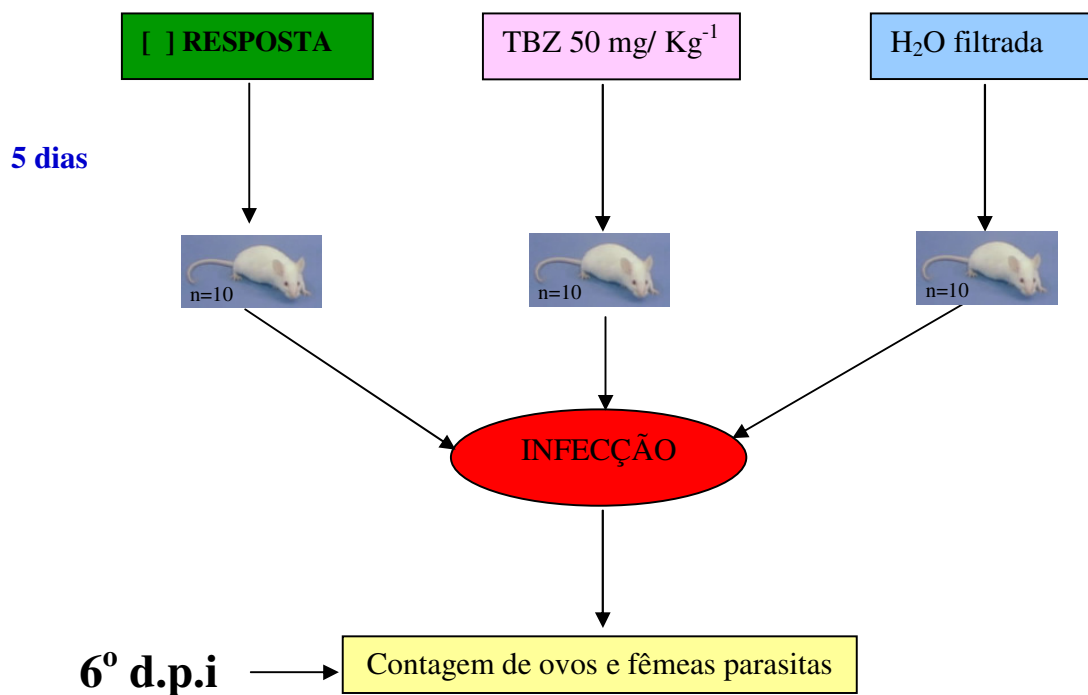


Figura 5. Desenho experimental do tratamento pré - infecção com a concentração resposta do EHA de *C. ambrosioides* e Tiabendazol (50mg Kg⁻¹/animal/dia).

4.8. Avaliação anti-helmíntica de frações de diferentes polaridades obtidas a partir do EHA liofilizado de *Chenopodium ambrosioides*

Neste experimento foram utilizadas frações de diferentes polaridades obtidas a partir do EHA de *C. ambrosioides*. Foram realizados experimentos em esquema de tratamento pós e pré-infecção, sendo formados grupos de 10 animais para cada tipo de tratamento e para cada fração, seguindo a mesma metodologia descrita nos itens 4.7.1.1 e 4.7.1.2 para os tratamentos e infecção dos animais.

4.9. Eficácia do EHA de *Chenopodium ambrosioides*:

A eficácia de cada concentração do EHA de *C. ambrosioides* sobre o número de vermes adultos no intestino e de ovos nas fezes foi calculada segundo a fórmula preconizada pela World Association for the Advanced in Veterinary Parasitology.- WAAVP (1995):

$$PE = \frac{\overline{X} \text{ DE PARASITOS CONTROLE} - \overline{X} \text{ DE PARASITOS TRATADOS}}{\overline{X} \text{ DE PARASITOS CONTROLE}} \times 100, \text{ onde,}$$

PE = percentagem de eficácia; $\overline{X}$ = média geométrica.

4.10. Cálculo da fecundidade (F) das fêmeas partenogenéticas parasitas de *Strongyloides venezuelensis*

A fecundidade das fêmeas foi calculada pela razão entre o (OPG) e o número de fêmeas parasitas recuperadas do intestino de cada animal. Para a estimativa da fecundidade de cada grupo submetido à administração do EHA de *C. ambrosioides* foi considerada a média geométrica das razões entre o OPG e o número de fêmeas parasitas. A variação da fecundidade (VF) entre os grupos tratados e o grupo controle foi estimada de acordo com a fórmula abaixo:

$$VF = \frac{\bar{X} F \text{ TRATADOS} - \bar{X} F \text{ CONTROLE}}{\bar{X} F \text{ CONTROLE}} \times 100, \text{ onde,}$$

VF = variação da fecundidade; F= fecundidade; X= média geométrica.

4.11. Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao Teste de Duncan ($p \leq 0,05$), para comparação das médias e análise de variância entre os grupos tratados com as drogas e o grupo controle. Foi avaliado o efeito de cada concentração e fração do EHA de *C. ambrosioides* e do tiabendazol sobre o OPG e número de fêmeas parasitas a de *S. venezuelensis*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento do EHA de *Chenopodium ambrosioides*

Foi obtido um rendimento de 20 % (m/m) para o extrato hidroalcólico de *C.ambrosioides* a partir da extração de 100g folhas secas e moídas de *C. ambrosioides* em etanol: água. Esse rendimento foi semelhante ao obtido em extração com etanol:água utilizando a mesma metodologia para a preparação do extrato de *Mikania* sp e *Mikania laevigata* por Yatsuda et al., 2005 e Bighetti et al., 2005.

5.2. Análise do extrato hidroalcólico de *Chenopodium ambrosioides*. por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após a análise do EHA de *C. ambrosioides* utilizando os diferentes eluentes , em diferentes concentrações: hexano: acetato de etila (80:20 v/v), hexano:acetato de etila (50:50), clorofòrmio:metanol (98:2),clorofòrmio:metanol (90:10) e acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100: 11:11:26) observou-se que o melhor resultado ocorreu quando foi utilizado o eluente clorofòrmio:metanol (90:10). Pela análise cromatográfica, observou-se a presença de diversas substâncias que absorvem no UV (254 e 366nm) e também são reveladas com solução de anisaldeído, evidenciando a presença de diversos compostos, dentre eles terpenos, que apresentam coloração lilás e uma boa separação em clorofórmi:metanol (90:10) ,Wagner e Bladt (1995), **Figura 6**.

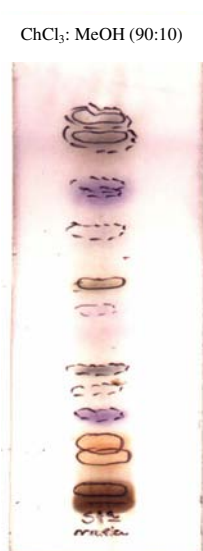


Figura 6. CCD do EHA de *C. ambrosioides*: eluente CHCl_3 : MeOH (90:10); Revelador: Luz UV 254 e 366 nm e Solução de anisaldeído.

O EHA de *C. ambrosioides* também foi analisado por Cromatografia Gasosa acoplada ao detetor seletivo de massas (CG-EM) para análise das substâncias voláteis presentes neste extrato. O composto majoritário observado no cromatograma, com tempo de retenção de 15 minutos e 31 segundos foi identificado como sendo o Fitol, cuja massa molecular é 296 ($\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$). O cromatograma gasoso e a estrutura química do Fitol encontram-se representados na **Figura 7**.

O Ascaridol um endoperóxido monoterpeneo (**Figura 8**) considerado composto majoritário do óleo essencial de *C. ambrosioides* não foi encontrado no EHA obtido neste estudo devido a sua alta volatilidade e ao fato de que a planta foi seca em estufa à 45° C por

48h e na preparação do extrato foi utilizado aquecimento na etapa de concentração, provocando sua volatilização.

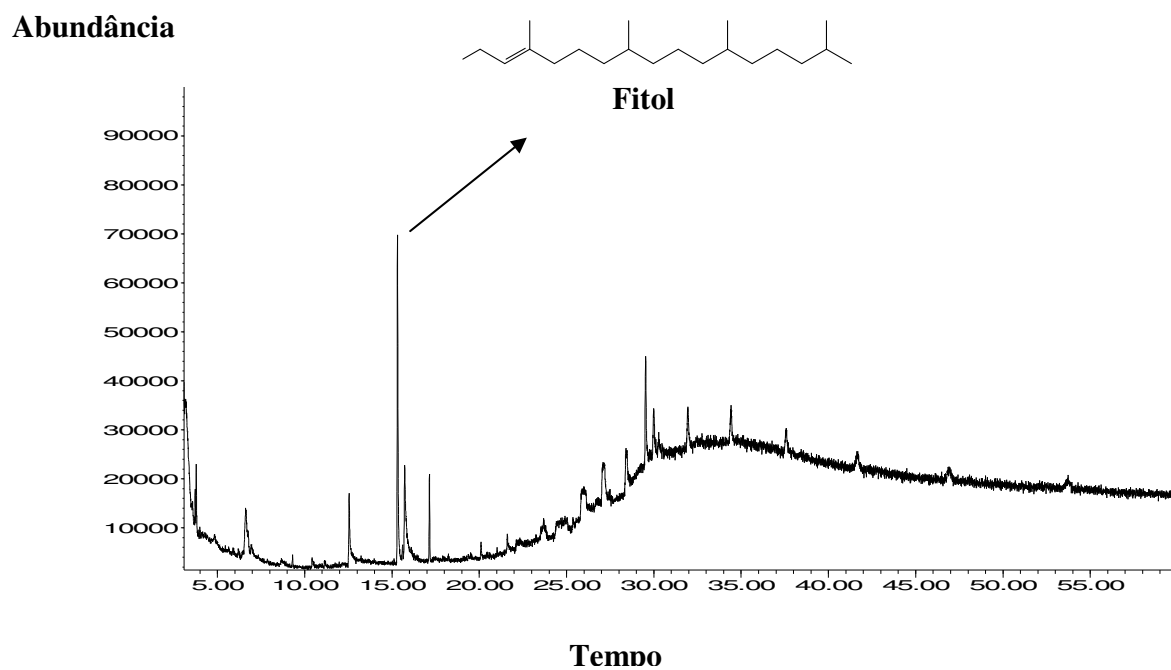


Figura 7: Cromatograma gasoso obtido para o EHA de *Chenopodium ambrosioides*

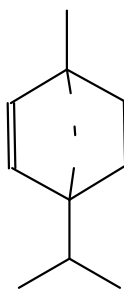


Figura 8. Estrutura química do Ascaridol

No presente estudo pode-se supor que o EHA de *C. ambrosioides* possui substâncias biotivas, diferentes do Ascaridol, contra a infecção por *S. venezuelensis* em camundongos Swiss, visto que o mesmo não foi detectado pelo método de cromatografia gasosa..Foi utilizada etanol:água (70:30) pode-se supor que a não detecção do Ascaridol na cromatografia gasosa se deva a etapa de evaporação à vácuo da solução etanol:água.

MacDonald et al., 2004, após testes com infusões do extrato aquoso de *C. ambrosioides* em alíquotas de 5 - 200 µL do extrato aquoso de *C. ambrosioides.in vitro* e do *Ascaridol* quimicamente sintetizado na concentração de 7,5µL em *Caenorhabditidis elegans* verificaram que a infusão aquosa *C. ambrosioides*, sem ascaridol ,representou 90 % da atividade nematocida contra *C. elegans*. Os autores verificaram que quando o extrato aquoso foi preparado a partir em hexano, todo o ascaridol permaneceu na solução de hexano e a solução aquosa do extrato testada reteve a fração que proporcionou a atividade antiparasitária contra *Caenorhabditidis elegans*.

5.3. Concentração resposta e eficácias das diferentes concentrações do EHA liofilizado de *C. ambrosioides* sobre *S. venezuelensis*.

Após o tratamento dos animais infectados com 1500 larvas filarióides de *S. venezuelensis*, com EHA de *C. ambrosioides* em três diferentes concentrações (100mg/ Kg, 250 mg/ Kg e 400mg/ Kg), 24h após infecção e durante cinco dias observou-se que a concentração com maior resposta para a redução de ovos por grama de fezes e de fêmeas parasitas foi a de 400mg Kg⁻¹/animal/dia..Os números médios de ovos por grama de fezes e fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* são apresentados nas **Figuras 9 e 10**.

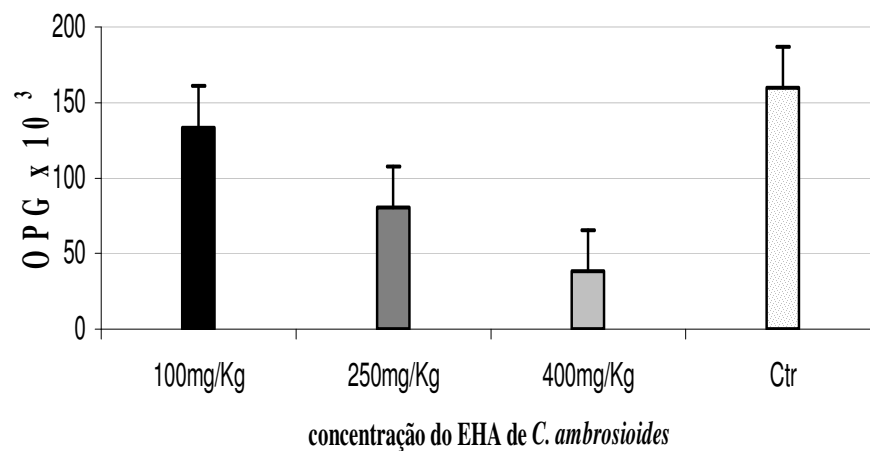


Figura 9. Nº. médio de OPG em camundongos infectados com *S. venezuelensis* e tratados com diferentes concentrações do EHA de *C.ambrosioides*; OPG: ovos por grama de fezes; Ctr: controle (dados anexo1)

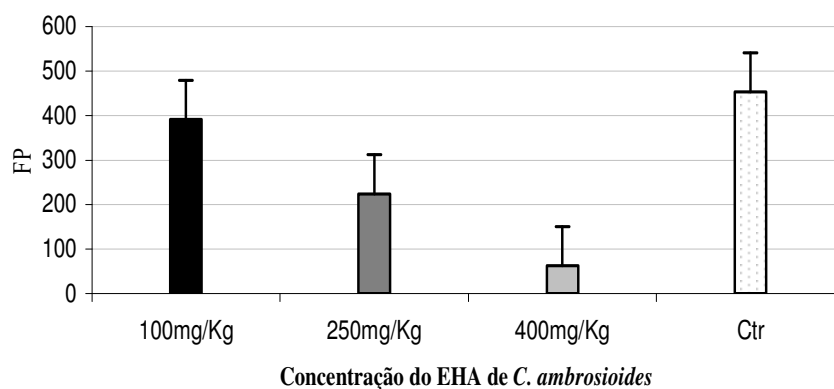


Figura 10. Nº. médio de FP em camundongos infectados com *S. venezuelensis* e tratados com diferentes concentrações do EHA de *C. ambrosioides*; FP: fêmeas parasitas; Ctr: controle (dados anexo1)

Na **Tabela 1** encontram-se as eficácias dos tratamentos e a fecundidade média das fêmeas parasitas, fecundidade e variação da fecundidade das fêmeas de *S. venezuelensis* após tratamento com as diferentes concentrações do EHA de *C. ambrosioides*. Após a avaliação do número de ovos e de fêmeas parasitas, observou-se uma eficácia de 86,31 % para fêmeas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino dos animais e de 75,89 % para ovos. A concentração média apresentou uma eficácia em torno de 50 % tanto para ovos e vermes recuperados e a concentração de 100mg foi a que apresentou menor eficácia para ovos e vermes, 15,29 % e 13,68 % respectivamente. Houve diferença estatística significativa tanto para o número de ovos nas fezes quanto para o número de vermes recuperados do intestino quando os grupos tratados foram comparados com o controle,

World Association for the Advanced in Veterinary Parasitology - WAAVP (1995) padronizou diferentes níveis de eficácia de drogas de uso veterinário: Nível Baixo para percentagens de redução de formas parasitárias que estejam abaixo de 80 %; Nível Moderado, para eficácias de 80 a 90 % e Nível Alto, acima de 90 % de redução de dessas formas.

Considerando os resultados obtidos após o a administração do EHA de *C. ambrosioides* a animais infectados com *S. venezuelensis*, apenas a concentração de 400mg apresentou eficácia moderada para o número de fêmeas parasitas e foi estatisticamente significativa em relação aos demais tratamentos, embora a percentagem para ovos tenha se apresentado dentro do nível considerado baixo. Portanto as concentrações de 100mg e 250mg foram ineficazes na redução de formas parasitárias em camundongos Swiss infectados com *S. venezuelensis*.

Tabela 1. Concentração e eficácia do extrato hidroalcolólico liofilizado de *C. ambrosioides* (EHA), $\bar{X}$ OPG, $\bar{X}$ de fêmeas parasitas e $\bar{X}$ e variação das fecundidades para *S. venezuelensis* após tratamento com o EHA, análise estatística.

CONCENTRAÇÃO	OPG				FÊMEAS PARASITAS				$\bar{X}$ F	VF %
	$\bar{X}$ *	DP	P	EF %	$\bar{X}$	DP	P	EF %		
100mg	133605	8747	A	15,29	396	68	A	13,68	344	-2
250mg	80545	12692	A	49,48	233	72	A	50,55	364	77
400mg	38530	7058	B	75,89	64	20	B	86,31	656	2
CONTROLE	159845	29267	A	----	460	92	A	----	350	----

OPG= ovos por grama de fezes; F= fecundidade; VF= variação da fecundidade; EF %: percentagem de eficácia; DP: desvio padrão; P: probabilidade x controle; $\bar{X}$: média aritmética; A, B: letras distintas significam que diferiram estatisticamente. (**anexo 1**).

5.3.1. Efeito do EHA de *Chenopodium ambrosioides* na concentração de 400mg Kg⁻¹/animal/dia sobre a fecundidade de *Strongyloides venezuelensis*.

Quando analisada a fecundidade de *S. venezuelensis* após o tratamento com as três concentrações do EHA de *C. ambrosioides*, observa-se que para a concentração mais baixa do EHA de *C. ambrosioides* a variação da fecundidade do grupo tratado e o controle aproximam-se de -2 %, ou seja, houve uma redução de fecundidade de apenas 2 %. Essa taxa de fecundidade comprova a ineficácia da concentração de 100mg Kg⁻¹animal (15,29 % para ovos e 13,68 % para as fêmeas parasitas). Para as concentrações de 250mg Kg⁻¹/animal e 400mg Kg⁻¹/animal as variações foram de 2 % e 77 % respectivamente. Esses valores podem representar a variação de cargas parasitárias dentro dos grupos e também demonstram que o EHA de *C. ambrosioides* não possui eficácia igual para ovos e para fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*. Isso fica bastante evidente quando a fecundidade para a concentração de 400mg/ Kg⁻¹ é analisada, o valor (656) é quase duas vezes maior que o

dos animais controle, embora o número de fêmeas tenha sido o menor das três concentrações administradas.

Pelos resultados obtidos pode-se afirmar que com as três concentrações do EHA de *C. ambrosioides* administradas em dose única 24h após a infecção dos animais com *S. venezuelensis*, a parasitemia diminui inversamente a concentração, embora esta redução não tenha sido expressiva nas concentrações de 100 e 250mg Kg⁻¹/animal, **Tabela 1**.

Embora a eficácia da concentração mais alta administrada seja considerada moderada, havendo uma redução de aproximadamente 76 % da forma de resistência do parasito, as fêmeas continuaram ovipondo uma quantidade significativa. Essa oviposição pode ser importante do ponto de vista epidemiológico, pois se estes ovos permanecerem viáveis poderá ocorrer a manutenção do ciclo de vida do parasito no meio externo, uma vez que, desses ovos surgirão novas larvas infectantes em condições adequadas de desenvolvimento.

Kliks (1985) avaliando uma comunidade de Chiapas (México) verificou o uso freqüente de *C. ambrosioides* sob forma de infusão ou chá e observou que na preparação caseira pelos moradores locais, a concentração da planta era muito variável: de 10 g a 50 g de folhas, sementes e/ou inflorescências frescas ou secas por litro de água sendo que em alguns casos a concentração máxima atingiu 300mg Kg⁻¹ para um adulto com 60 Kg. Após exame de 248 indivíduos pelo método de Kato-Katz foram detectadas prevalências de 85 % para *Necator*, 76 % para *Trichuris* e de 50 % para *Ascaris*. Os indivíduos positivos foram tratados com concentrações do extrato bruto que variaram de 240 a 6210mg Kg⁻¹ de três a cinco doses em um intervalo de 48h. Não houve efeito anti-helmíntico significativo para nenhuma das três helmintíases. Apesar de não ter havido cura dos indivíduos positivos decorridos 20 dias do tratamento o autor observou um decréscimo na produção de ovos.

Embora no presente estudo tenha sido avaliado o efeito de *C. ambrosioides* sobre infecção de *S. venezuelensis* em modelo experimental com murinos, o valor obtido para a eficácia das fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* na maior concentração administrada assemelha-se ao estudo realizado com humanos positivos para *Ascaris lumbricoides* e tratados com o suco de *C. ambrosioides* no estudo realizado por De Guimarães et al. (2001). A eficácia obtida para o número de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* (86,31 %) após a administração de 400 mg Kg⁻¹ confirma os resultados obtidos por De Guimarães et al. (2001) em ensaio terapêutico realizado com humanos. Os autores encontraram uma eficácia de 86,70 % após a administração do suco de *C. ambrosioides* nas doses de 1 mL Kg⁻¹ para indivíduos com menos de 10 anos e 2 mL Kg⁻¹ para indivíduos com mais de 10 anos no regime de uma dose durante três dias em 30 indivíduos positivos para *A. lumbricoides*. Em se tratando de *Hymenolepis nana*, os autores obtiveram uma eficácia de 100 % no tratamento.

Em outro estudo realizado em humanos, Nakazawa (1996) obteve uma eficácia global de 56 % dos 72 indivíduos parasitados por helmintos na região de San Martin (Peru). Os indivíduos parasitados foram avaliados oito dias após a ingestão, durante três dias, do suco de *Chenopodium ambrosioides* na concentração de 100 – 200 mL Kg⁻¹. Crianças com menos de 10 Kg foram tratadas com 2 mL/ Kg do suco da erva. Observou-se uma eficácia de 100 % para *H. nana*, *S. stercoralis*, *Ancylostoma duodenale* e *Trichuris trichiura* e de 50 % para *A. lumbricoides*.

É possível que fatores biológicos do parasito e hospedeiro, variação nas concentrações administradas, origem e forma de preparo da planta e posologia sejam responsáveis pela grande variação de resultados observados na literatura que vão de

eficácias que chegam a 100 % à ineficácia de *C. ambrosioides* como tratamento antiparasitário alternativo.

A concentração de 400mg foi a que proporcionou maior resposta na diminuição do número de ovos e de fêmeas parasitas em camundongos SWISS machos, embora somente a eficácia para vermes adultos possa ser considerada moderada pelos critérios da WAAVP (1995).

5.4. Estudo comparativo do efeito anti-helmíntico entre a concentração resposta do EHA de *Chenopodium ambrosioides* e o Tiabendazol sobre *Strongyloides venezuelensis*.

Após determinada a melhor concentração resposta do EHA liofilizado de *C. ambrosioides* (400mg Kg⁻¹ /animal/dia) para a diminuição do número de ovos e fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*, a mesma foi testada em esquema de tratamento pós e pré-infecção dos animais, com a finalidade de verificar a eficácia do extrato em diferentes regimes de administração e comparar com o tratamento padrão, Tiabendazol, na concentração de 50mg Kg⁻¹/animal/dia, também administrado pós e pré-infecção dos animais.

5.4.1 Eficácia do EHA de *Chenopodium ambrosioides* e do Tiabendazol sobre o número de ovos e de fêmeas parasitas e fecundidade de *Strongyloides venezuelensis* mediante o tratamento pós e pré-infecção.

Na **Tabela 2** encontram-se os resultados obtidos após a administração das drogas aos animais infectados com *S. venezuelensis*. Houve diferença estatística tanto para o OPG ($p = 0,0094$) quanto para o número de fêmeas parasitas ($p = 0,0054$) quando os animais tratados pré e pós-infecção foram comparados com os animais do grupo controle. Os valores de OPG ($p = 0,0008$) e número de fêmeas ($p = 0,0036$) também diferiram estatisticamente entre os tratamentos pré e pós-infecção.

Tabela 2. Estatística, médias do número de ovos, fêmeas parasitas e fecundidade após os tratamentos pós e pré – infecção com 400mg Kg⁻¹/animal/dia do EHA de *C. ambrosioides* e com 50mg Kg⁻¹/animal/dia do Tiabendazol .

DROGA	TRATAMENTO					
	PRÉ-INFECÇÃO			PÓS-INFECÇÃO		
	OPG	FP	F	OPG	FP	F
EHA <i>C. ambrosioides</i>	19300 ± 1654 ^{A,C}	55 ± 30 ^{A,C}	48 ± 47 ^A	40186 ± 1440 ^{A,D}	63 ± 14 ^{A,C}	561 ^A ± 290
CONTROLE	172700 ± 37611 ^B	468 ± 108 ^B	383 ± 112 ^B	172700 ± 37611 ^B	468 ± 108 ^B	383 ^A ± 112
TBZ	29380 ± 7267 ^A	66 ± 66 ^A	1283 ± 1246 ^A	Z	Z	Z
CONTROLE	53570 ± 18174 ^B	354 ± 103 ^B	169 ± 99 ^B	53570 ± 18174 ^B	354 ± 103	169 ± 99

* Os valores estão expressos em média aritmética e desvio padrão; Z= zero; OPG= ovos por grama de fezes; FP= fêmeas parasitas; F= variação da fecundidade; TBZ= tiabendazol; A, B: letras diferentes significam diferença entre tratados e controle; C, D: letras diferentes significam diferença entre o tratamento pré e pós-infecção (**anexo 2**).

5.4.1.1. Eficácia de *Chenopodium ambrosioides* sobre número de ovos e fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*.

A percentagem de eficácia para a concentração de 400mg Kg⁻¹ animal/dia nos camundongos submetidos ao tratamento pós-infecção foi de 79,60 % para o OPG e de 86,46 % para o número de fêmeas parasitas, **Tabela 3**.

Tabela 3. Grupos de animais, medicamento, concentrações usadas nos tratamentos, n^o médio de ovos por grama de fezes, média de fêmeas recuperadas do intestino, eficácia do medicamento utilizado em camundongos infectados com *S. venezuelensis* e tratados com EHA de *C. ambrosioides* ou TBZ e a variação de fecundidade para cada tipo de tratamento.

Droga	Tratamento	N ^o de camundongos	OPG*	FP*	EF %		VF %
					OPG	FP	
EHA de <i>C.a</i> (400mg)	Pós-infecção	Tratados (n = 10)	34506	62	79,60	86,46	51,62
	Pré-infecção	Tratados (n = 10)	1450	46	99,14	89,95	- 91,62
	Controle	H ₂ O filtrada (n = 10)	169191	458	----	----	----
TBZ (50mg)	Pós-infecção	Tratados (n = 10)	0	0	100	100	0
	Pré-infecção	Tratados (n = 10)	28550	37	39,91	89,54	442,85
	Controle	H ₂ O filtrada (n = 10)	47517	354	----	----	----

*: **média geométrica** para cálculo da eficácia; EHA: extrato bruto hidroalcoólico liofilizado; *C. a*: *C. ambrosioides*; OPG: ovos por grama de fezes; FP: fêmeas parasitas; VF: variação da fecundidade (**dados anexo 2**)

Quando analisada a eficácia para o número de ovos no tratamento pré-infecção observa-se um aumento de 19,54 % na eficácia (99,14 %) em relação ao tratamento pós-

infecção, (**Tabela 3**). O valor da percentagem de eficácia atingiu, nesta condição, o nível considerado alto pela WAAVP (1995).

Quanto à redução de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* ocorreu um aumento de apenas 3 % quando comparados os tratamentos pós-infecção (86,46 %) e pré-infecção (89,95 %), **Tabela 3**.

Pode-se afirmar que a concentração de 400mg do EHA de *C. ambrosioides* quando administrada em regime de tratamento durante cinco dias pré-infecção foi altamente eficaz para o controle de ovos de *S. venezuelensis* de acordo com os parâmetros recomendados pela WAAVP (1995), que se situam entre 90-100 % de eficácia. No entanto, para as fêmeas parasitas a eficácia se encontra dentro do nível moderado.

5.4.1.2. Eficácia do Tiabendazol sobre o número de ovos e fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*

Nos animais submetidos ao tratamento pós-infecção com 50mg/ Kg⁻¹ animal/dia de TBZ a eficácia do medicamento foi de 100 % para o OPG e para o número de fêmeas parasitas . Houve diferença estatística significativa tanto no número de ovos por grama de fezes (p = 0,0001) quanto para o número de fêmeas parasitas (p = 0,0001) de *S. venezuelensis* quando comparados ao controle (**Tabela 3**).

Por outro lado, o tratamento pré-infecção com a mesma concentração de TBZ mostrou-se ineficaz na redução de OPG (39,91 %). Em se tratando das fêmeas parasitas, a eficácia foi de 89,54 %. Este percentual se enquadra dentro dos padrões de eficácia considerados moderados (80 a 90 %) pela WAAVP (1995), **Tabela 3**.

Além disso, a porcentagem de eficácia do TBZ para as fêmeas parasitas assemelhou-se à eficácia do regime de tratamento pós-infecção com a concentração de 400mg do EHA de *C. ambrosioides* para o número de fêmeas parasitas. Diante da semelhança de porcentagem desses tratamentos pré-infecção e levando em consideração o uso contínuo da erva de Santa Maria pelas populações como meio de tratamento contra as parasitoses pode-se inferir que esse uso resulta em diminuição da prevalência de *Strongyloides*. No entanto são necessários testes complementares para avaliação mais acurada.

5.4.2. Efeito do EHA de *C. ambrosioides* e do Tiabendazol sobre a fecundidade das fêmeas de *S. venezuelensis*

Quando a fecundidade dos grupos tratados pós e pré-infecção com o EHA de *C. ambrosioides* e TBZ foram analisadas, observou-se que para o tratamento pós-infecção com *C. ambrosioides* a variação de fecundidade das fêmeas parasitas dos animais tratados foi 51,62 % maior que a fecundidade das fêmeas parasitas do grupo controle e para o grupo tratado pós-infecção com o TBZ a fecundidade foi zero. A fecundidade das fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* do grupo tratado pré-infecção com *C. ambrosioides*, foi de - 91,62 %, ou seja, uma redução de cerca de 92 % e pode ser explicada pela alta eficácia do EHA de *C. ambrosioides* sobre os ovos (99,14 %) e de 89,95 % sobre as fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* (**Tabela 3**).

As fêmeas parasitas do grupo tratado pré-infecção com TBZ apresentaram uma variação de fecundidade cerca de 440 % mais alta que a do grupo controle. Este aumento pode estar associado com a baixa eficácia sobre o OPG e à variação na produção individual

de ovos pelas fêmeas. Embora a eficácia sobre as fêmeas tenha sido próxima a 90 % (89,54%) parece ter ocorrido eliminação de vários ovos por um número baixo de fêmeas por um mecanismo que poderia estar associado à compensação de produção para manutenção do ciclo do parasito. Para o tratamento com TBZ pré-infecção nota-se que há uma média de 37 fêmeas produzindo um total de 28550 ovos neste grupo (**Tabela 4**).

Em um estudo com TBZ administrado via oral, nas concentrações de 5mg Kg⁻¹ e 10mg Kg⁻¹ em ratos Sprague-Dawley fêmeas infectadas com 7000 L3 de *Strongyloides ratti* foi obtida, no quarto d.p.i uma redução de 57,1 % e 69 %, respectivamente (Armson et al., 1995b). Os autores verificaram que não houve diferença entre as duas concentrações de TBZ administradas.

No presente estudo, houve redução total tanto de fêmeas parasitas como de ovos de *S.venezuelensis* em camundongos Swiss tratados durante cinco dias pós-infecção com 1500 L3 de *S. venezuelensis*. Talvez essa diferença esteja relacionada ao aumento na concentração do TBZ utilizada nesse estudo, ao menor número de larvas utilizadas na infecção (1500) e ao tipo de hospedeiro, nesse caso camundongos e não ratos.

Grove (1982b), após administrar 50mg/ Kg⁻¹/animal/dia de TBZ em camundongos C57BL/6 infectados com 500 L3 de *S. ratti* verificou que não houve diferença no número de larvas presentes nas fezes após avaliação, no quinto dia pós-infecção. Esse mesmo autor obteve uma eficácia de 94 % para fêmeas parasitas de *S. ratti* quando os animais foram infectados com 500 L3 e tratados com a mesma concentração nos dias 3 e 4 pós-infecção e avaliados no 6º d.p.i. Quando o autor combinou os tratamentos pré e pós-infecção (administração da droga nos dias -1, 0, 1 e 2) de camundongos C57BL/6 infectados com 3000 L3 de *Strongyloides ratti* e tratados com 50mg de TBZ, os animais avaliados no 5º d.p.i também não mostraram efeito do fármaco sobre a redução de fêmeas.

No presente estudo, obteve-se uma redução significativa de fêmeas para o tratamento pré-infecção com TBZ durante cinco dias que antecederam a infecção de camundongos Swiss machos com 1500 L3 de *S. venezuelensis*. Nessas condições de estudo os dados diferiram, dos resultados de Grove (1982b).

Esses resultados sugerem que o *S. venezuelensis* seja mais susceptível ao derivado benzimidazólico que o *S. ratti* ou que o aumento da eficácia do composto possa estar associado à mudança no esquema de tratamento. Satou et al. (2002) atribuíram a diferença de eficácia de um mesmo medicamento para *S. venezuelensis* e *S. ratti* devido ao fato das vias de migração daqueles parasitos serem diferentes no hospedeiro natural. Os autores avaliaram a atividade nematocida, *in vitro*, de alcalóides de Isoquinoline [isolado de *Macleaya cordata* L. (Ranunculales, Papaveraceae)] e do TBZ, albendazol e ivermectina para *S. ratti* e *S. venezuelensis*.

No presente estudo, embora a redução no número de fêmeas tenha sido próxima a 90 %, o número de ovos eliminados pelas mesmas não reduziu na mesma proporção. Supõe-se, que o fato de existir menor quantidade de fêmeas em um mesmo habitat competindo por nutrientes do hospedeiro pode ter possibilitado uma alta produção de ovos, compensando assim a menor quantidade de fêmeas ovipondo, o que possibilita à espécie uma compensação para a manutenção do parasito no meio externo. Apesar de não existirem estudos relacionados ao padrão hormonal de fêmeas parasitas expostas ao extrato de *C. ambrosioides* pode-se pressupor que exista alguma alteração no padrão de produção de ovos relacionada ao sistema reprodutor de *S. venezuelensis*.

Embora o plasma dos animais não tenha sido avaliado para a presença das drogas testadas, o tratamento pré-infecção com o Tiabendazol proporcionou uma eficácia moderada contra fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* provavelmente devido a sua meia

vida no organismo dos animais. Tocco et al., (1966) após administrar, via oral, 1,0 Gm de tiabendazol radiomarcado detectou a droga 72h após, no plasma e urina de humanos e animais.

Pode-se supor que para o EHA de *C. ambrosioides*, as eficácias também atingiram níveis moderados e altos para *S. venezuelensis* devido a permanência de compostos bioativos no plasma, ou no próprio intestino dos animais, o que possibilitou a não instalação dos parasitos.

5.5. Frações do EHA liofilizado de *Chenopodium ambrosioides*

5.5.1 Análise por CCD

Demonstrada a atividade anti-helmintica do EHA de *C. ambrosioides*, este foi fracionado em coluna seca, metodologia simples utilizada no fracionamento de extratos vegetais (Kassuya et al., 2005). Utilizou-se como eluente uma mistura de CHCl₃: MeOH (90:10). Após eluição da coluna, foram obtidas 6 frações de diferentes polaridades, que foram extraídas individualmente com solução de CHCl₃: MeOH (90:10).. Os maiores rendimentos foram obtidos com as frações 5 e 6. O rendimento para as frações, em ordem decrescente foi de 2,06g (41,24 %) para a fração 6; 0,84 (16,78 %) para a fração 5; 0,71g (14,25 %) para a Fração 4; 0,47 (9,33 %) para a Fração 3 e 0,08g (1,67 %) para as frações 1 e 2, que foram agrupadas. A fração 5 apresentou-se parcialmente insolúvel durante a extração com CHCl₃: MeOH (90:10), utilizando-se, neste caso, metanol 100 %, obtendo-se 0,84 g (16,8 %). A fração 6 também foi extraída com metanol 100 %, devido a maior polaridade dos compostos presentes nesta fração. Na **Figura 11** mostra a análise por CCD do EHA de *C. ambrosioides* e das frações obtidas em coluna seca.

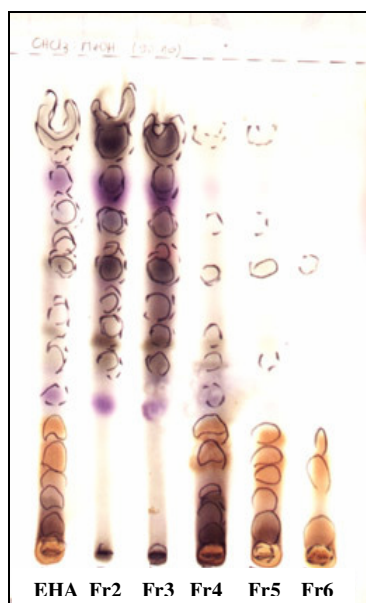


Figura 11. CCD do EHA de *Chenopodium ambrosioides* e das frações 2, 3, 4, 5 e 6 :Eluente CHCl₃: MeOH (90:10); Revelador: Luz UV 254 e 366 nm e Solução de anisaldeído.

A CCD das frações obtidas em coluna seca revelou uma separação eficiente, onde as frações Fr2 e Fr3 apresentam compostos de baixa e média polaridade, a fração Fr4 compostos de média e alta polaridade e as frações Fr5 e Fr6 compostos de alta polaridade.

Para avaliar a composição química dos compostos polares presentes nas frações 5 e 6 a análise das frações Fr5 e Fr6 e do extrato EHA foi utilizada em a CCD em AcOEt: Ac. Fórmico: HOAc:H₂O (100:22:11:26v/v), eluente de maior polaridade, comumente utilizado na análise de compostos fenólicos como flavonóides, (Wagner e Bladt, 1995). A utilização deste eluente promoveu a separação de diversos compostos que apresentaram coloração amarela após a revelação com solução metanólica de ácido difenil boranicoetilamina - NP, **Figura 12.**



Figura 12: Cromatografia em Camada delgada (CCD) do EHA de *Chenopodium ambrosioides* e das frações Fr4+Fr5 e Fr6 resultantes da coluna cromatográfica seca do EHA, utilizando como eluente: AcOEt: Ac.Fórmico: HOAc:H₂O (100: 22: 11:26v/v) e revelador: solução NP (difenil boranicoetilamina), seguido de análise com luz UV (254 e 366 nm).

Na **Figura 13** encontra-se a análise comparativa, por CCD, entre a Fr 6 e o EHA de *C. ambrosioides* com os seguintes padrões de flavonóides: vitexina (Vit.), Isovitexina (Isov.), Vitexina – 2 – Raminosídeo (Vit – 2R), Isoquercetina (Isoq.), Rutina (Rut.). Os padrões de flavonóides utilizados evidenciaram que os compostos presentes na Fr 6 apresentam semelhanças com esses padrões.

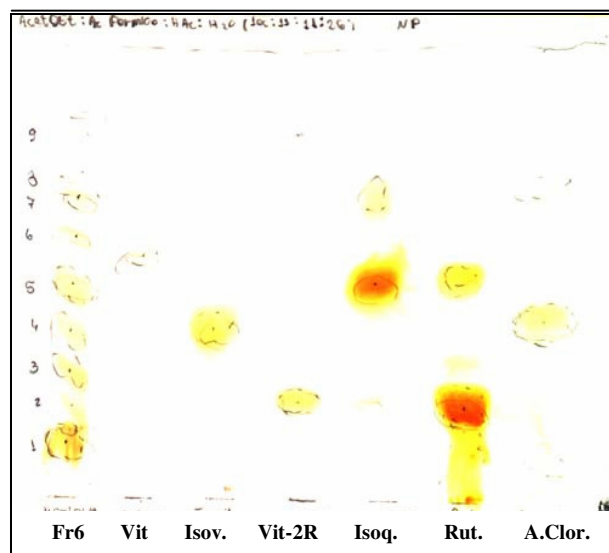


Figura 13: Cromatografia em Camada delgada (CCD) da fração 6 resultante da coluna cromatográfica seca do EHA de *Chenopodium ambrosioides* e dos padrões de vitexina (Vit), isovitexina (Isov), Vitexina-2-Raminosideo (Vit-2R), Isoquercetina (Isoq.), Rutina (Rut.) e Ácido clorogênico (A.clor.), utilizando como eluente: AcOEt: Ac.Fórmico: HOAc:H₂O (100:22:11:26v/v) e revelador: solução NP (ácido difenil borânico), seguido de análise com luz UV (254 e 366 nm).

Diferentes tipos de flavonóides têm sido descritos para *Chenopodium* sp. Gohar e Elmazar (1997) identificaram o Kaempferol-3,7-diraminosideo, um flavonóide com atividade hipotensiva. Kaempferol-3-*O*-β-D-glucopiranosideo-7-*O*-α-L-ramnoside e

Kaempferol-3-*O*-[4- β -D-apiofuranosil]- α -L-raminopiranosideo-7-*O*- α -L-Raminopiranoside, outros dois flavonóides foram descritos para *Chenopodium murale* por Gohar et al., 2000.

Outros compostos fenólicos da classe das flavonas estão presentes em *C. graveolens* (Mata et al., 1987), flavonas metoxiladas em *Chenopodium botrys* (De Pascual et al., 1980) e flavonol 3-*O*-glicosídeo em *Chenopodium quinoa* e *C. ambrosioides* (Jain et al., 1990; De Simone et al., 1990).

5.5.2. Avaliação anti-helmíntica: eficácia das frações Fr 4, Fr 5 e Fr 6 sobre o número de ovos, número de fêmeas parasitas e fecundidade de *S. venezuelensis*.

Após a identificação de algumas classes de compostos químicos presentes nas frações de maior rendimento, obtidas a partir do EHA de *C. ambrosioides*, estas frações foram testadas sobre o número de ovos e fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* em esquemas de tratamento pós e pré-infecção de camundongos com 1500 L3. As frações foram administradas na concentração de 250 mg Kg⁻¹/animal/dia devido ao baixo rendimento obtido no fracionamento do EHA de *C. ambrosioides*.

Na **Tabela 4** são apresentados os valores de OPG, fêmeas parasitas recuperadas do intestino dos animais no 6º d.p.i, fecundidade média, variação da fecundidade e eficácias para cada fração nos tratamentos pós e pré-infecção com as frações 4, 5 e 6 do extrato hidroalcolólico liofilizado de *C. ambrosioides*.

Os valores para OPG apresentaram diferença estatística para todas as frações administradas tanto nos tratamentos pós e pré-infecção quando comparados ao controle. Quando analisado, o tratamento pós-infecção, a fração 6 foi a que apresentou maior eficácia

em relação as outras frações, dentro do mesmo tratamento e entre os tratamentos em geral, tanto para o número de ovos (94,51 %) quanto para o número de fêmeas parasitas (90,55%), **Tabela 4**. No entanto apresentou eficácias abaixo das recomendadas pela WAAVP (1995), 79,73 % para ovos e 42,39 % para fêmeas parasitas para o tratamento pré-infecção. Neste caso, a fração 6 não serviu como preventivo do desenvolvimento da infecção por *S. venezuelensis*

A Fração 4 foi a que apresentou menor eficácia para as fêmeas parasitas (5,76 %) no tratamento pós-infecção e entre todos os tratamentos com as três frações testadas e a eficácia para ovos foi de 79,18 %.

Tabela 4. Frações, condição de tratamento, número médio de OPG e fêmeas parasitas, eficácia e variação de fecundidade de *Strongyloides. venezuelensis* após administração de 250mg Kg⁻¹/animal/dia do EHA de *Chenopodium ambrosioides* e análise estatística

Fr	TRATAMENTO	$\bar{X}$ OPG*	$\bar{X}$ FP*	EF %		$\bar{X}$ F*	VF %
				OPG	FP		
Fr4	PRÉ-INFEC (n=10)	42710 ± 12808 ^A	230 ± 94 ^A	76,40	51,61	228 ± 18 ^A	-51,12
	PÓS-INFEC (n=10)	38015 ± 11494 ^A	422 ± 110 ^B	79,18	5,76	96 ± 44 ^A	-77,80
Fr5	PRÉ-INFEC (n=10)	20810 ± 10909 ^A	191 ± 136 ^A	90,84	67,28	160 ± 79 ^A	-72,07
	PÓS-INFEC (n=10)	19230 ± 11303 ^A	158 ± 64 ^A	92,57	66,35	134 ± 94 ^A	-78,05
Fr6	PRÉ-INFEC (n=10)	35775 ± 6686 ^A	263 ± 90 ^A	79,73	42,39	146 ± 40 ^A	-64,83
	PÓS-INFEC (n=10)	10705 ± 5525 ^A	50 ± 28 ^A	94,51	90,55	281 ± 199 ^B	-42,39
Ctr	H ₂ O FILTRADA (n=10)	178750 ± 45044 ^B	452 ± 145 ^B	----	----	418 ± 13 ^B	----

Fr: Frações; POS-INFEC: pós-infecção; PRÉ-INFEC: Pré-infecção; Ctr: controle; Fr4: fração 4; Fr5: fração 5; Fr6: fração 6; OPG: ovos por grama de fezes; FP: fêmeas parasitas, F: fecundidade; VF: variação da fecundidade; X= média aritmética; cálculo das eficácias foi utilizada média geométrica (dados anexo 3)

Após análise das fecundidades das fêmeas de *S. venezuelensis* observou-se que a média da fecundidade do grupo controle foi maior quando comparada com a média

dos grupos tratados com as três frações do EHA de *C. ambrosioides* tanto no tratamento pós-infecção como no tratamento pré-infecção. Essa diferença na média das fecundidades é mais evidente quando analisado o tratamento pós-infecção para todas as frações administradas.

Considerando número de ovos e fêmeas parasitas, a fecundidade dos grupos tratados pós-infecção com as frações 4, 5 e 6 houve uma redução de 77,80 % 78,05 % e 42,39 % respectivamente (**Tabela 4**). O tratamento pré-infecção foi o que apresentou menor redução de fecundidade quando analisadas as três frações administradas, sendo a fração 6 a que apresentou maior redução (64,83 %), apesar da eficácia para esta fração está abaixo do nível moderado considerado pela WAAVP (1995).

A fração 4 reduziu mais o número de ovos produzidos pelas fêmeas, embora não tenha havido uma diminuição expressiva no número de fêmeas. Parece ter ocorrido a produção de poucos ovos por muitas fêmeas, visto que a redução para o número de fêmeas foi muito baixa.

Considerando a ação das plantas sobre seus hospedeiros ou predadores admite-se que metabólitos secundários como taninos e ligninas, que possuem uma alta massa molecular, reduzam a digestibilidade, mas não agem como toxinas. Outros compostos, como os terpênicos e alcalóides, que podem ser tóxicos e serem biologicamente ativos (Stepp e Moerman, 2001, Coley et al., 1985).

Mediante os resultados obtidos nessa pesquisa e levando em consideração o uso popular de *C. ambrosioides*, sob as formas de chás, infusões, sucos ou mesmo como condimento é possível considerar que se a ingestão de *C. ambrosioides* for uma prática freqüente e periódica, esse hábito pode vir a assegurar a manutenção de baixos níveis de parasitemia e conseqüente diminuição da morbidade causada por *Strongyloides* sp. No

geral, a eficácia é moderada na prevenção da patogenia quando avaliada a redução no número de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*.

No presente estudo foi avaliado o efeito antihelmíntico do extrato hidroalcólico liofilizado (EHA) de *C. ambrosioides*, que é uma forma mais elaborada quando comparados com outros estudos que levam em consideração o uso empírico da planta sob forma de chá, infusão ou decocção da planta fresca ou seca e que em alguns casos não obtiveram eficácia contra helmintos (De Guimarães, 2001; Kliks, 1985).

6. CONCLUSÕES

1. O extrato bruto hidroalcólico liofilizado (EHA) de *Chenopodium ambrosioides* apresentou maior eficácia na concentração de 400mg Kg⁻¹/animal/dia em camundongos infectados por *Strongyloides venezuelensis*;
2. Em camundongos, *C. ambrosioides* mostrou atividade profilática contra *S. venezuelensis* quando administrado na concentração de 400 mg Kg⁻¹/animal/dia, por apresentar maior eficácia quando administrado pré – infecção;
3. O EHA de *C. ambrosioides* na concentração de 400mg Kg⁻¹/animal/dia administrado pós-infecção apresenta eficácia moderada como vermífugo, mas aumenta o número de ovos. Se esses ovos forem viáveis, o tratamento não é conveniente do ponto de vista epidemiológico. Mesmo efeito foi apresentado pela fração 6 do EHA;
4. O tiabendazol é medicamento que atua eficientemente sobre adultos de *S. venezuelensis*, já instalados no intestino. A fração 6 do EHA de *C. ambrosioides* também atua da mesma forma. A eficácia é moderada para adultos quando administrado pré-infecção e mesmo não atuando como preventivo diminui consideravelmente a instalação de adultos.

5. A fração 6, administrada pré-infecção, tem importância na epidemiologia pela diminuição da fecundidade das fêmeas, mas não diminui o número de adultos. Essa fração mostrou-se rica em flavonóides por CCD
6. Compostos da classe dos flavonóides e terpenos foram detectados por CCD sendo o fitol o composto majoritário do EHA de *C. ambrosioides*, detectado em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. CG – EM. O ascaridol, composto majoritário do óleo essencial de *C.ambrosioides* não foi detectado em CCD e CG - ME

ANEXO 1. Dados brutos referentes a Figura 9 e Figura 10 e Tabela 1, número de ovos por grama de fezes (OPG), número de fêmeas parasitas e fecundidade

Camundongos	Tratados									Controle		
	100mg/Kg			250mg/Kg			400mg/Kg			OPG	FP	F
	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F			
1	123200	388	318	87850	212	414	41550	91	457	127000	412	308
2	127150	314	405	82700	169	489	36800	73	504	164150	483	340
3	130100	357	364	77250	167	462	32950	44	749	190850	441	433
4	135850	370	367	83900	267	314	33400	59	566	137400	378	363
5	122600	406	302	87150	240	363	39500	44	898	160700	492	327
6	131550	338	389	95600	383	250	46250	41	1128	170250	503	338
7	142250	350	406	67850	193	352	51150	94	544	201300	669	301
8	133550	432	309	77250	312	248	42200	49	861	193350	494	391
9	150650	467	322	93100	234	398	34250	63	544	125600	397	316
10	139150	538	359	52800	153	345	27250	87	313	127850	337	379
$\bar{X}^*$	133352	391	341	79518	224	355	37948	62	616	157424	453	348

* valores expressos em média geométrica

ANEXO 2. Dados do tratamento pré e pós – infecção com 400 mg Kg⁻¹/animal/dia com o EHA de *C. ambrosioides* e com 50 mg Kg⁻¹/animal/dia de tiabendazol (Tabela 3): numero de ovos (OPG), fêmeas parasitas (FP) e fecundidade

Animais	EHA <i>C. ambrosioides</i>									TBZ								
	Tratamento						Controle			Tratamento						Controle		
	Pré-infecção			Pós-infecção						Pós-infecção			Pré-infecção					
	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F
1	1450	94	15	46050	79	583	133650	373	358	0	0	0	17750	60	296	71950	322	223
2	5800	50	116	37250	67	556	155950	578	270	0	0	0	34550	79	437	62200	459	136
3	500	69	7	4060	71	57	134000	498	269	0	0	0	28400	194	146	7900	292	27
4	1700	103	16	34150	41	833	177850	386	461	0	0	0	25250	73	346	45850	461	99
5	3700	73	50	55650	52	1070	224350	687	326	0	0	0	42550	163	261	64800	433	149
6	1200	49	24	46050	74	623	161800	527	307	0	0	0	21600	21	1028	66200	223	297
7	1350	29	46	44250	45	983	137800	449	307	0	0	0	30450	13	2342	61650	168	367
8	2250	15	150	46150	61	756	155950	363	427	0	0	0	26000	17	1529	55700	375	148
9	500	18	28	39200	82	478	229600	463	496	0	0	0	31100	11	2827	45850	357	128
10	850	47	18	49050	58	846	216050	355	608	0	0	0	36150	10	3615	53600	454	118
$\overline{X}^*$	1450	46	31	34506	62	561	169191	458	370	0	0	0	28550	37	760	47517	354	140

* valores expressos em média geométrica

ANEXO 3. Dados referentes ao tratamento pré e pós – infecção com as frações 4, 5 e 6 obtidas do EHA de *C. ambrosioides* na concentração de 250 mg Kg⁻¹/animal/dia; * dados expressos em média geométrica (Tabela 3)

Animais	FRAÇÕES																				
	Fr4						Fr5						Fr6						Controle		
	TRATAMENTO						TRATAMENTO						TRATAMENTO								
	PÓS-INFECÇÃO			PRÉ-INFECÇÃO			PÓS-INFECÇÃO			PRÉ-INFECÇÃO			PÓS-INFECÇÃO			PRÉ-INFECÇÃO					
	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F	OPG	FP	F
1	34000	474	72	39600	229	173	29400	234	126	27950	195	143	6500	26	250	33400	190	176	132600	361	367
2	54100	350	154	24000	102	235	27300	99	276	22500	414	54	12600	46	274	30100	438	69	161350	554	291
3	52900	545	97	68750	94	731	17150	112	153	24850	122	204	19050	32	595	30100	210	143	133150	354	376
4	47300	258	183	31950	144	222	1050	98	11	10800	102	106	9650	69	140	34350	243	141	184250	428	430
5	36650	286	137	55600	392	142	1750	166	10	18250	28	652	6200	9	689	33500	148	226	263050	789	333
6	16950	346	49	34650	263	132	17250	253	68	1300	54	24	10100	52	194	50100	316	158	171150	556	308
7	41650	577	72	38700	256	151	13550	83	163	36500	333	110	4550	27	168	44450	378	118	135450	438	309
8	36300	527	69	50500	314	161	23900	231	103	30050	232	130	6150	84	73	36950	228	162	163250	327	499
9	27850	438	64	44200	233	190	26600	185	144	27050	352	77	11400	52	219	35600	264	135	202100	380	532
10	31450	425	74	39150	268	146	34350	119	289	8850	81	109	20850	99	211	29200	213	137	241150	329	733
$\bar{X}^*$	36223	409	89	41054	210	196	12915	146	88	15929	142	112	9544	41	231	35270	250	141	174019	434	401

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZIZ E. M. *Strongyloides stercoralis* infestation: Review of the literature and report of 33 cases. **South. Med. J.** v. 62, p. 806–810, 1969

AMATO NETO, V.; CARIGNANI, F. L.; MATSUBARA, L.; BRAZ, L. M. A. Tratamento de ratos, experimentalmente infectados pelo *Strongyloides venezuelensis*, através da ivermectina administrada por via oral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 30, n. 6, p. 481- 484, 1997.

ANTHONY, J-P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **T. Parasitol.**, v.21, n. 10, Oct., 2005.

ARMSON, A., GRUBB, W. B., MENDIS, A. H. W. The effects of electron transport (ET) inhibitors and thiabendazole on the fumarate reductase (FR) and succinate dehydrogenase (SDH) of *Strongyloides ratti* infective (L3) larvae. **Int. J. Parasitol.**, v.25, p. 261- 263, 1995a.

ARMSON, A.; CUNNINGHAM, G. A.; GRUBB, W. B.; MENDIS, A. H. Murine strongyloidiasis: the effects of Cyclosporin A and Thiabendazole administered singly and in combination. **Int. J. Parasitol.**, v. 25, n. 4, p. 533-535, 1995b.

BARANSKI, M. C., SILVA, A. F., KOTAKA, P. I., GOMES, N. R., GOVANNONI, M. TELLES, J. E. Q. Tratamento da estrongiloidíase humana com novo anti-helmíntico, co cambendazole. Estudo duplo cego. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v.20, n.4, p. 213 – 218, 1978.

BARNISH, G.; ASHFORD, R.W. *Strongyloides cf fuelleborni* in Papua New Guinea: epidemiology in an isolated community, and results of an intervention study. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 83, n. 5, p. 499 – 506, Oct., 1989.

BLANCO, E.; MACÍA, M. J.; MORALES, R. Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia, Northwest Spain). **J. Ethnopharmacol.**, v. 65, p. 113 – 124, 1999

BONZANI, N. E., BARBOZA, G. E., BUGATTI, M. A., ARIZA ESPINAR, L. Morpho-histologica studies in the aromatic species of *Chenopodium* from Argentina. **Fitoterapia**, v.74, p. 207 – 225, 2003

BROWN, H. D.; MATZUK, A. R.; ILVES, I. R.; HARRIS, S. A.; SARETT, L. H.; EGERTON, J. R.; YAKTIS, J. J.; CAMPBELL, W. C.; CUCKLER, A. C. Antiparasitic drugs-IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. **J. Chem. Soc.**, v. 83, p. 1764-1765, 1961

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med Biol. Res**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N., Phytotherapy and quality of herbal medicine. **Fitoterapia**, v. 71, p. 58 – 65, 2000.

COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S. Resource availability and plant anti-herbivore. **Science**, v. 230, p. 895 – 899, 1985

CONWAY, G. A.; SLOCUMB, J. C. Plants used as abortifacients and emmenagoges by Spanish New Mexicans. **J. Ethnopharmacol.**, v. 1, p. 241 – 261, 1979.

COSTA CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. R F.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 39, p. 313 - 317, 1997.

CROFT, S. L. The current status of antiparasite chemotherapy. **Parasitology**., v. 114, p. 3-15, 1997.

DALTRY, A.; HILMARSDOTTIR, I.; MAYORGA-SAGASTUME, R.; LYAGOUBI, M., GAXOTTE, P.; BILIGUI, S.; CHODAKEWITZ, J.; NEU, D.; DANIS, M. & GENTILINI, M. Treatment of *Strongyloides stercoralis* infection with Ivermectin compared with Albendazole: results of an open study of 60 cases. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 344 – 345, 1994.

DAWKINS, H. J. S.; GROVE, D. I. Kinetics of primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice. **Int. J. Parasitol.**, v. 11, p. 89-96, 1981.

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non – clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**, v. 86, p. 141 – 159, 2003.

DE FEO, V.; SANTORE, F. Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. **J. Ethnopharmacol.**, v. 39, p.39 – 51, 1993

DE GUIMARAES, D. L.; LLNOS, R. S. N., ACEVEDO, J. H. R. Ascaridiasis: comparación de la eficacia terapêutica entre paico y albendazol em niños de Huaraz. **Rev. Gastroenterol. Perú**, v. 21, n. 3, Jul./Set., 2001

DE PASCUAL, T. J., TORRES, B. C., PEREZ, M. A. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Rev. Ital. Essenze, Profiumi. Plante Officinale Arome Cosmetica Aerosol**, v. 62, p. 123 -125, 1980.

DE SIMONE, F., DINI, A., PIZZA, C., SATURNINO, P., SCHETTINO, O. Two flavonol glycosides from *Chenopodium quinoa* **Phytochemistry**, v. 20, n.9, p. 3690.- 3692, 1990

DELARQUE, A. E.; HADENGUE, A.; DEGOTT, C.; VOLGRAIN, V.; ERLINGER, S.; BENHAMOU, J. P. Biliary obstruction resulting from *Strongyloides stercoralis* infection. Report of a case. **Gut**, v. 35, n. 5, p. 705 – 706, May, 1994.

DELOBEL, A.; MELONGA, P. Insecticidal properties of six plants materials against *Caryedon serratus* (Ol.) (Coleoptera: Bruchidae). **J. Stored Prod. Res.**, v. 23, p. 173 – 176, 1987

DINAN, L.; WHITING, P.; SCOTT, A. J. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of chenopodiaceae. **Bioch. Syst. Ecology**, v. 26, p. 53 – 576, 1998.

DUMONTET, C., BRANIMIR, I. S. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport and cell death. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, p. 1060 – 1070, 1999.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (viannia) brasiliensis* in endemic area of Bahia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, n. 3, p. 229 -232, Mai./Jun, 1996

FRANZ, I, Z H. Clinical trials with thiabendazole against human strongyloidiasis. **Am. J.. Trop. Med. Hyg.**, v.12, p. 211-214, 1963

FRAYHA, G. J., SMYTH, J. D., GOBERT, J. G., SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **Gen. Pharmac.**, v. 28, n. 2, p. 273 – 299, 1997.

GADANO, A.B.; GURNI, A. A.; CARBALLO, M. A. Argentine Folk Medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 246 – 251, 2006.

GADANO, A.; GURNI, A.; LOPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 11 –16, 2002.

GANN, P. H., NEVA, F. A.; GAM, A. A. A randomized trial of single and two-dose ivermectin versus thiabendazole for treatment of strongyloidiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 1076 – 1079, 1994.

GARCÍA, R.; LEMUS, I.; RIVERA, P.; ERAZO, S. Biological and chemical study of paico (*Chenopodium chilense*, Chenopodiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 57, p. 85-88, 1997.

GENTA, R.M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Rev. infect. Dis.**, v.11, n. 5, p. 755 – 67, 1989.

GENTA, R. M.; DOUCE, R. W.; WALZER, P.D. Diagnostic implications of parasite specific immune responses in immunocompromised patients with strongyloidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, n. 6, p. 1099-1003, Jun., 1986

GEORGI, J. R. **Parasitology for Veterinarians**. W. B. Saunders Company, 2^a. ed., 1974. 386pp.

GOHAR, A. A. & ELZAMAR, M. M. A. Isolation hypotensive flavonoids from *Chenopodium* species growing in Egypt. **Phytotherapy Res.**, v.11, 564 – 567, 1997.

GOHAR, A. A.; MAATOOQ, G. T.; NIWA, M. Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*. **Phytochemistry**, v. 53, p 299 – 303, 2000.

GROVE, D. I. **A history of human helminthology**: capítulo 3: The discovery and development of anthelmintics: Wallingford: CAB International, 1990, 851pp,

GROVE, D. I. *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis*: the effects of thiabendazole, mebendazole, and cambendazole in infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, n. 31, v. 3, p. 469 - 476, 1982a.

GROVE, D. I. Treatment of strongyloidiasis with thiabendazole: an analysis of toxicity and effectiveness. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 1, 1982b.

GROVE, D. I. Human Strongyloidiasis. **Adv. Parasitol.**, v. 38, p. 251 - 309, 1996.

GROVE, D. I., Northern, C. *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis*: effects of cambendazole, thiabendazole and mebendazole *in vitro*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 2, p. 97 – 103, 1986.

GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, p. 344 - 349, 1981.

GRUPTA, G. S.; BEHARI, M. Chemical investigation of *Chenopodium ambrosioides*. **J. Indian Chem. Soa**, v. 49, p. 317 – 319, 1972

HAGELSKJAER, L. H. A fatal case of systemic strongyloidiasis and review of the literature. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, p. 1069 – 1074, 1994.

HAMAMOUCI, M.; LAHLOU, M.; AGOUMI, A. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 71, n. 3, p. 308-314, 2000.

HERNÁNDEZ, N. E.; TERESCHUK M. L.; ABDALA, L. R.. Antimicrobial activity of flavonoides in medicinal plants from Tafi Del Valle (Tucumán, Argentina. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 317 – 322, 2000.

HIRA, P. R.; PATEL, B. G. Human strongyloidiasis due to the primate species *Strongyloides fulleborni*. **Trop. Geog. Med.**, v. 32, p. 23 - 29, 1980.

HOFF, D.R., FISHER, M.H., BROCHIR, R.J., LUSI, A., WAKSMUNSKI, F. EGERTON, J. R. UAKSTIS, J. J., CUCKLER, A.C., CAMPBELL, W.C. – A new broad-spectrum anthelmintic: 2-(4-Thiazolyl-5-isopropoxycarbonylamino-benzimidazole). **Experientia**, v. 26, p. 500 – 551, 1970.

ISLAM, M. K.; MATSUDA, K.; KIM, J. H.; BAEK, B. K. Effects of *in vitro* culture methods on morphological development and infectivity of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae. **Kor J. Parasitol.**, v. 37, n. 1, p. 13-19, 1999

JAIN, N., SARWAR-ASLAM, M., KAMIL, M., ILYAS, M., NIWA, M., SAKAE, A. Two flavonols glycosides from *Chenopodium ambrosioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3988-3991, 1990

JASMER, D. P., YAO, C., REHMAN, A. JONSON, S. Multiple letal effects induced by benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of nematode *Haemonchus contortus*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 105, p. 81 – 90, 2000.

JIMÉNEZ-OSORNIO, F. M. V. Z. J.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Bioch. Syst. Ecology**, v. 24, n. 3, p. 195 – 205, 1996

JONES, F.A. Herbs – useful plants. Their role in history and today. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, p. 1227 – 1231, 1996

JOUAD, H.; HALOUI, M.; RHIOUANI; HILALY, J. EL; EDDOUKS, M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez – Boulemane). **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 175-182, 2001.

KETZIS, J. K.; TAYLOR, A.; BOWMAN, D. D.; BROWN, D. L.; WARNICK, L. D.; ERB, H. N. *Chenopodium ambrosioides* and its oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. **Small Rum. Res.**, v. 44, p. 193 – 200, 2002

KISHORE, N.; MISHRA, A. K.; CHANSOURIA, J. P. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, p. 211 – 215, 1993

KIUCHI, F.; ITANO Y.; UCHIYAMA, N.; HONDA, G.; TSUBOUCHI, A.; SHIMADA, J. N.; AOKI, T. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 509-512, 2002.

KLIKS, M. M. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. **Soc. Sci. Med.**, v. 21, n. 8, p.879 -886, 1985

LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. **Parasitol. Today**, v. 6, p. 112- 115, 1990
Lacey, E., Gill, J. H. Biochemistry of benzimidazole resistance. **Acta Tropica**, v. 56, p. 245 – 262, 1994

LALL, N. MEYER, J. J. M. in vitro inhibition of drug-resistant and drug sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 347 – 354, 1999.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2. Ed. Mineapolis: Burgess, 1979, 2427p. Cap. 1: Intoduction to the Nematoda, p. 42 - 43.

LIEPMAN, M. Disseminated *Strongyloides stercoralis*. A complication of immunossuppression. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 231, p. 287 – 300, 1975.

LITTLE, M. D. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. **J. Parasitol.** , v. 52, n. 1, fev. 1966.

LUBEGA, G. W. GEARY, T. G.; KLEIN, R. D.; PRICHARD, R. K. Expression of cloned beta tubulin genes of *Haemonchus contortus* in *Escherichia coli*: interaction of beta tubulin with native tubulin and mebendazole. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 62, p. 281 – 292, 1993.

MACDONALD, K. V.; HARRISON, P.; RANGACHARI, P. K.; ROSENFELD, J.; WARREN, C.; SORGER, G. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide (s) that is (are) not toxic to mammalian smooth muscle. **J. Ethnopharmacol.**, v. 92, p. 215 – 221, 2004

MACHADO, E., R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, n.2, p. 161 – 164, Mar./Apr., 1998

MARTIN, R. J., ROBERTSON, A. P., BJORN, H. Target sites of anthelmintics. **Parasitology**, v. 114, S111 – S124, 1997.

MARTIRANI,I., SOARES,W., RODRIGUES, L. D., FERREIRA, L. E., AYRES, N., AGUIAR FILHO, E. – Cambendazol – um novo antihelmintíco. Estudos de bioavaliabilidade. **Folha Méd.**, v. 73, p. 11 – 14, 1976.

MARUYAMA, H., NADA, S., NAWA, Y. Emerging problems of parasitic diseases in Southern Kyushu, Japan. **Jap. J. Parasitol**, v. 45, p. 192-200, 1996.

MATA, R.; NAVARRETE, A.; ALVAREZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; DELGADO, G.; ROMO DE VIVAR, A. Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens* **Phytochemistry**, v. 26, n. 1, p.191-193, 1987

MELVILLE, L. A.; SYKES, A. M.; MCCARTHY, J. S. The β -tubulin genes of two *Strongyloides* species. **Exp. Parasitol.**, v. 112, n. 3, p. 144 – 151, 2006

The Merck index (Edited by Windholtz M.) 9^a ed. Merck & Co., Rahway, N. J, 1976.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 1655 – 1660, 2002.

MORS, W. B. DO NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627 – 642, 2000.

MOST H, YOELI M, CAMPBELL W, CUCKLER A. The treatment of *Strongyloides* and *Enterobius* infections with thiabendazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 14 n.3, p. 379-382, 1965.

NAKAZAWA, R. A. G. Medicina tradicional en el tratamiento de enteroparasitosis. **Rev. Gastroenterol. Perú**, v. 16, n. 3, p. 197 - 202, 1996.

NAQUIRA, C.; JIMENEZ, G.; GUERRA, J. G.; BERNAL, R.; NALIN, D. R.; NEU, D.; AZIZ, M. Ivermectin for human strongyloidiasis and other intestinal helminths. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p. 304-309, 1989.

NELSON, E. K. The composition of oil of *Chenopodium* from various sources. **Am. J. Chem. Soc.**, v. 42, p. 1204 – 1208, 1920

NJOROGE, J. M.; SCOTT, M. E.; JALILI, F. The efficacy of ivermectin against laboratory strains of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda). **Int. J. Parasitol.**, v. 27, n. 4, p. 439 – 442, 1997.

NOLAN, T. J.; BHOPALE, V. M.; SCHAD, G. A. Hyperinfective strongyloidiasis: *Strongyloides stercoralis* undergoes an autoinfective burest in neonatal gerbils. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 286-289, 1999.

NOUMI, E.; YOMI, A. Medicinla plantas used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon. **Fitoterapia**, v. 72, p. 246 – 254, 2001

OKUYAMA, E., UMEYAMA, K., SAITO, YAMAZAKI, M., SATAKE, M. Ascaridole as a pharmacologically active principle of “Paico”, a medicinal Peruvian Plant. **Chem. Pharm. Bull.**,v. 41, n. 7, p. 1309 – 1311, 1993.

ORDÓÑEZ, M. G.; IDAVOY, D. T.; POL, L. M. Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 2, p. 48 51, 2001.

OTTSEN, E. A. & CAMPBELL, W. C. Ivermectin in human medicine. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, p. 195 – 203, 1994

PETERSEN, M. B., FRIIS, C. BJORN, H. A new *in vitro* assay of benzimidazole activity against adult *Oesophagostomum dentatum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 1333 – 1339, 1997

PETERSON, G. S.; KANDIL, M. A., ABDALLAH, M. D.; FARAG, A. A. Isolation and characterization of biologically-active compounds from some plant extracts. **Pesticide Sci.**, v. 25 p. 343 -353, 1989

PETROVICK, P. R.; MARQUES, L. C.; DE PAULA, I. C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 51-55, 1999.

PHILIPINSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237 – 243, 2001.

PIRES, M. L. Como eu trato: parasitoses intestinais. **Bras. Med.**, v. 26, n. 14, p. 9 - 19, Jan./Dez., 1989.

PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 175 – 182, jul./ago., 1993.

PITSITTITHUM, P., CHINDANOAD, W. S. A randomized comparative study of albendazole na thiabendazole in chronic strongyloidiasis. Southeast **Asian J. Trop. Med. Pub. Health**, v.26, p. 735 – 738, 1995

POLLACK, Y.; SEGAL, R.; GOLENSER, J. The effect of ascaridole on the *in vitro* development of *Plasmodium falciparum*. **Parasitol. Res.** , v. 76, p. 570-572, 1990.

PRICHARD, R.K. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p. 409 – 417, 1973

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603 – 613, 2001

ROBINSON, M. W.; MCFERRAN, N.; TRUDGETT, A.; HOEY, L.; FAIRWEATHER, L.; A possible model for benzimidazole binding to beta tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. **J. Mol. Grap. Model.**, v. 22, p. 275 – 284, 2004

RODRIGUES, L. S.; MARTIRANI, I.; CABEÇA, M.; SOARES, W.; BRANDÃO, J. A. Cambendazol: novo anti-helmíntico na terapêutica da estrogiloidíase. Experimentação clínica. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 19, n. 1, p. 57 – 67, Jan./Fev., 1977.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas e nematóides das fezes - modificação do método de Baerman. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 14, n. 5 - 8, 1954.

SAGRERO-NIEVES, L.; BARTLEY, J. P. Volatile constituents from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. **J. Essent. Oil Res.**, v. 7, p. 221 – 223, 1995.

SANTAYANA, M. P., BLANCO, E., MORALES, R. Plants known as *té* in Spain: An ethno-pharmaco-botanical review. **J. Ethnopharmacol.** V. 98, p. 1- 19, 2005.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **Int. J. Parasitol.**, v. 20, n.1, p.57 – 62, 1990.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J; SHIROMA, Y. Seridiagnosis of strongylidiasis: the application and significance **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, p. 35 - 41, 1995.

SATOU , T., KOGA, M., MATSUHASHI, R. KOIKE, K., TADA, I., NIKAIDO, T. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 104, p. 131 – 138, 2002.

SATOU, T., KOGA, M., KOIKE, K., TADA, I., NIKAIDO, T. Nematocidal activities of thiabnedazole and ivermectin against the larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 99, p. 311- 322, 2001.

SHINWARI, M. I.; KHAN, M. A. Folk use of medicinal herbs of Margalla Hills National Park, Islamabad. **J. Ethnopharmacol.**, v. 69, p. 45 – 56, 2000.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SHUSHUA, X.; TANNER, M.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; BERQUIST, R.; MINGGANG, C.; JIANG, Z. Recent investigations of atemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Tropica**, v. 82, p. 175 – 181, 2002.

SHUSHUA, X.; CHOLLET, J.; WEISS, N. A.; BERQUIST, R. N.; TANNER, M. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Int.**, v. 49, p. 19 – 24, 2000.

SLAM, M. K.; MATSUDA K.; KIM, J-H.; BAEK B –K. Effects of in vitro culture methods on morphological development and infectivity of *Strongyloides venezuelensis* filariforme larvae. **Korean J. Parasitol.**, v. 37, n. 1, Mar., 1999.

SMILIE, W. G.; PESSOA, S. B. A study of anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 24, p. 359-370, 1924.

STEPP, J. R.; MOERMAM, D. E. The importance of weeds in ethnopharmacology. **J. ethnopharmacol.**, v. 75, p. 19 – 23, 2001

STRATTON, C. W. Strongyloidiasis. **Antimicrobics Infect. Dis.** Newsletter, v.18, n. 3, p. 20 – 24, 2000.

TAIRA, N.; HIROOKA, M.; SAEKI, H. Isolation of *Strongyloides venezuelensis* from *Rattus norvegicus* in Kagoshima Prefecture. **Jap. J. Vet. Med. Sci.** v. 56, p. 255 – 258, 1994

TAVARES, M. A. G. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade da erva de Santa Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots (Coleóptera : Curculionidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 34, n. 2, p. 319 – 323, 2005.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. The effects of stage – specific selection on the development of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 109, n. 1 – 2, p. 29 – 43, Oct., 2002

TINGA, N.; DE NGUYEN, V².; VIEN, H. .V.; CHAU, L. V.; TOAN, N. D.; PAGER., P. A.; DE VRIES, P. J. Little effect of praziquantel or artemisinin on clonorchiasis in northern Vietnam. A pilot study. **Trop. Med. Int. Health**, v. 4, n. 12, p. 814 – 818, 1999.

TOCCO, D. T.; ROSENBLUM, C; MARTIN, C. N.;ROBINSON, J.H. Absortion, metabolism and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals. *Tox. Appl. Pharmacol.*, v. 9, p. 31- 39, 1966

VIEIRA, L. D. S., GONÇALVES, P. C., COSTA, C.A. F., BERNE, M. E. A. *In vitro* activity benzimidazoles oxfenbendazole, fenbendazole, albendazole and thiabnedazole in goat intestinal nematodes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p. 1201 – 1209, 1989

WAAVP - World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine), **Vet. Parasitol.**, v. 58, p. 181 – 213, 1995.

WAGLAND, B. M.;JONES, W. O. HRIBAR; L.BENDIXSEN, T; EMERY, D. L. A new simplified assay for larval migration inhibition. **Int. J. Parasitol.** V. 22, n. 8, p. 1183 – 1185, 1992

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: A thin layer chromatography atlas. 2^a ed., Germany, 1995, 384pp.

WHITFIELD, P. J. Medicinal plants and control of parasites. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 596-600, 1996.