



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TERCILA NOEMÍ QUIÑONES MORÓN

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE**  
*Salvia sagittata* (Lamiaceae) **SOBRE** *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda,  
**Rhabditoidea)**

Campinas, SP

2022

**TERCILA NOEMÍ QUIÑONES MORÓN**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Salvia sagittata* (Lamiaceae) SOBRE *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda,  
Rhabditoidea)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. SILMARA MARQUES ALLEGRETTI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA TERCILA  
NOEMÍ QUIÑONES MORÓN, E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.  
SILMARA MARQUES ALLEGRETTI.

**Campinas**

**2022**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Q45a Quiñones Morón, Tercila Noemí, 1992-  
Avaliação da atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Salvia sagittata* (Lamiaceae) sobre *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditoidea) / Tercila Noemí Quiñones Morón. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Silmara Marques Allegretti.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Strongyloides venezuelensis*. 2. Óleos voláteis. 3. Linalol. 4. *Salvia sagittata*. I. Allegretti, Silmara Marques, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Anthelmintic activity evaluation of *Salvia sagittata* (Lamiaceae) essential oil against *Strongyloides venezuelensis* (Nematode, Rhabditoidea)

**Palavras-chave em inglês:**

*Strongyloides venezuelensis*

Oils, Volatile

Linalool

*Salvia sagittata*

**Área de concentração:** Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

**Titulação:** Mestra em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Silmara Marques Allegretti [Orientador]

Marlene Tiduko Ueta

Adilson Sartoratto

**Data de defesa:** 27-10-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3696-9660>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/9124434604495399>

Campinas, 27 de outubro de 2022.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti.

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Prof. Dr. Adilson Sartoratto.

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Biologia Animal da Unidade UNICAMP/ Instituto de Biologia.

## DEDICATORIA

A mis padres **Guadalupe** y **José Apolinar**, han sido siempre mi ejemplo de lucha. Han sabido salir adelante en medio de la adversidad. La vida no me alcanzará para agradecer y retribuir tanto amor.

A mis hermanos, **Beto** y **Williar**, mis amigos incondicionales, siempre han creído en mí, me han apoyado de mil maneras y han sabido iluminar mi vida con muchas alegrías. ¡Los quiero!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui, por cuidar de mim e me proteger em tempos tão difíceis durante a pandemia.

À Professora Silmara Marques Allegretti, pela orientação, a oportunidade e pela compreensão mesmo quando a língua fazia difícil a comunicação. Seus ensinamentos contribuíram muito no meu crescimento acadêmico.

A Tiago Manoel Fernandes Mendes, pela ajuda nos experimentos, pelas sugestões e pelo auxílio com os testes estatísticos. Sem dúvida alguma, sua contribuição foi muito importante para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Adilson Sartoratto, por ter me acolhido na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (CPQBA) – UNICAMP. Pelo auxílio com as cromatografias e pelas sugestões para melhorar meu trabalho.

A todo o CPQBA, especialmente a Adriana pela ajuda no fracionamento do óleo essencial.

A Professora Marlene Tiduko Ueta, pela ajuda proporcionada e sua disponibilidade. Admiro muito sua dedicação e o ímpeto com que faz as coisas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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

Ao Laboratório de Métodos instrumentais (Engenheira Química) da Universidad Nacional de Trujillo- Perú, pela oportunidade para realizar a extração do óleo essencial. Agradeço ao Professor Noe pela supervisão, a Frank e Silvia pela ajuda na extração do óleo.

À Álvaro, agradeço pelo carinho, amizade e compreensão, por fazer que meus dias se tornem mais fáceis.

À Melissa, pela amizade e pela ajuda no meu estabelecimento no Brasil.

A meus amigos do grupo “vizinhança”, por serem como minha família Brasileira, compartilhamos tantos momentos, experiências e aprendizagem que vou guardar para sempre no meu coração.

À todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!!

## RESUMO

A estrogiloidíase é uma doença de difícil controle, principalmente por possuir capacidade de autoinfecção. No tratamento de pessoas infectadas, são utilizados benzimidazóis ou ivermectina, porém estes apresentam taxas de cura muito variáveis. Surge, por isso a necessidade de novas fontes de tratamento, sendo o uso de plantas medicinais uma opção viável. Neste estudo, a planta *Salvia sagittata* (Lamiaceae), um pequeno arbusto nativo da Cordilheira dos Andes, foi avaliado *in vitro* e *in vivo*, quanto ao seu potencial anti-helmíntico sobre *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditoidea). O óleo essencial de *S. sagittata* foi fracionado em três Frações (F1, F2, F3). Mediante cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) foi feita a caracterização do óleo essencial e frações, sendo o linalol o composto majoritário de *S. sagittata* e da F2 e o segundo composto majoritário da F3. Para a parte *in vitro*, as três frações e OE de *S. sagittata* foram avaliados frente fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* nas concentrações de 0,128 µl/ml, 0,064 µl/ml; 0,032 µl/ml, 0,016 µl/ml e 0,008 µl/ml, 0,004 µl/ml. Foram observadas por 7 dias com intervalos de 24h, após à incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 37 °C. Os resultados *in vitro* demonstraram bom potencial para o OE e para duas frações (F2 e F3), ao matar 100% de fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* entre as 5 - 48 horas de incubação nas concentrações de 0,128 µl/ml, 0,064 µl/ml; 0,032. É por isso que estes compostos foram selecionados para a realização de testes *in vivo*, além do composto principal da *Salvia sagittata*, linalol. Foram formados grupos de quatro camundongos e tratados com uma única concentração de 100 µl/animal de OE e F2, 150 mg/kg/animal de linalol, 200 µg/kg/animal de ivermectina e um grupo sem tratamento. A avaliação da atividade antiparasitária foi realizada pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) a partir do 5° ao 10° dia após da infecção. No último dia foi feita a eutanásia e as fêmeas parasitas foram coletadas dos intestinos dos camundongos para serem contadas. Os resultados *in vivo* mostraram que o OE e F2 provocaram uma maior produção de ovos (OPG) e permitiram a sobrevivência de uma grande quantidade de fêmeas parasitas até o final de experimento (dia 10 p.i), sendo significativamente diferentes ( $p < 0,005$ ) do grupo controle. O linalol, apresentou valores semelhantes ao grupo controle tanto no número de OPG e de fêmeas parasitas. A ivermectina reduziu significativamente o número de ovos e consequentemente o número de fêmeas parasitas como esperado. Os resultados mostram que o óleo essencial de *S. sagittata* apresentou efeito anti-helmíntico *in vitro*, porém não apresentou o mesmo efeito *in vivo*.

**Palavras-chaves:** *Strongyloides venezuelensis*, óleos essenciais, *Salvia sagittata*, linalol.

## ABSTRACT

Strongyloidiasis is a complex disease to control, mainly because it has the capacity for autoinfection. In the treatment of infected people, benzimidazoles or ivermectin are used, but these have very variable cure rates. Therefore, the need for new sources of treatment arises, and the use of medicinal plants appears as a viable option. In this study, the plant *Salvia sagittata* (Lamiaceae), a small shrub native to the Andes, was evaluated *in vitro* and *in vivo* for its anthelmintic potential against *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditoidea). The essential oil (EO) of *S. sagittata* was fractionated into three fractions (F1, F2, F3). Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used to characterize the EO and fractions, we found that Linalool (LI) was the major compound for EO and F2, and the second for F3. For the *in vitro* part, the three fractions and the EO were evaluated against female parasites of *S. venezuelensis* at concentrations of 0.128 µl/ml, 0.064 µl/ml; 0.032 µl/ml, 0.016 µl/ml and 0.008 µl/ml, 0.004 µl/ml. They were observed for 7 days at 24h intervals, after incubation in a CO<sub>2</sub> oven at a temperature of 37 °C. The *in vitro* results showed good potential for EO and for two fractions (F2 and F3), since they killed 100% of female parasites of *S. venezuelensis* between 5 – 48 hours of incubation at concentrations of 0.128 µl/ml, 0.064 µl/ml; 0.032, so these compounds were selected for *in vivo* tests. For the *in vivo* part, LI also was tested. In this stage, groups of four mice were formed and treated with a single concentration of 100 µl/animal of OE and F2, 150 mg/kg/animal of linalool, 200 µg/kg/animal of ivermectin and an untreated group. The evaluation of antiparasitic activity was performed by counting eggs per gram of feces (EPG) from the 5th to 10th day after infection. The last day, euthanasia was performed and the female parasites were collected from the mice intestines to be counted. The *in vivo* results showed that OE and F2 produced higher EPG than F1 and LI and they allowed a big number of female parasites until the end of the experiment, values were significantly different to the control group (P<0.005). LI presented similar EPG and number of female parasites to control group. Ivermectin reduced significantly the number of eggs and consequently the number of female parasites as expected. The results showed that the EO of *S.sagittata* presented an anthelmintic effect *in vitro*, contrary to what happened *in vivo*.

**Keywords:** *Strongyloides venezuelensis*, essential oils, *Salvia sagittata*, linalool.

## LISTA DE ILUSTRACOES

<b>Figura 1.</b> Prevalência estimada da estrogiloidíase. Tomado de Buonfrate et al.(2020) .....	15
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico de <i>Strongyloides</i> Spp. Adaptado de CDC .....	20
<b>Figura 3.</b> Localização do material vegetal, <i>Salvia sagittata</i> .....	29
<b>Figura 4.</b> Material vegetal, <i>Salvia sagittata</i> .....	30
<b>Figura 5.</b> Extração do óleo essencial mediante hidrodestilação .....	31
<b>Figura 6.</b> Fracionamento do óleo essencial mediante coluna cromatográfica tipo seca (A), dessorção de cada fração (B) .....	32
<b>Figura 7.</b> Desenho experimental do tratamento <i>in vivo</i> pós - infecção em dose única com os compostos F2, OE, 100µl/animal, linalol com 150 mg/kg <sup>-1</sup> e a ivermectina com 200µg/ Kg <sup>-1</sup> (Created with BioRender.com) colocar la unidad de medida correcta.....	36
<b>Figura 8.</b> CCD do OE de <i>Salvia sagittata</i> e das frações 1,2,3. Fase móvel: diclorometano (CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub> ), Fase estacionaria: sílica (SiO <sub>2</sub> ). Revelador: Luz UV 254 e 366 nm e Solução de anisaldeído .....	38
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas gasosos obtidos do óleo essencial (OE) e fração 1 (F1) de <i>Salvia sagittata</i> . Compostos majoritários: OE, Linalol - F1, Trans-cariofileno.....	42
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas gasosos obtidos da Fração 2 (F2) e fração 3 (F3) do óleo essencial de <i>Salvia sagittata</i> . Compostos majoritários: F2, Linalol - F3, α-terpinol.....	43
<b>Figura 11.</b> Estrutura molecular do Linalol .....	44
<b>Figura 12.</b> Gráficos da mortalidade acumulada ao longo do tempo em concentrações de 0,004 µl/ml (A); 0,008 µl/ml (B); 0,016 µl/ml (C); 0,032 µl/ml (D); 0,64 µl/ml (E); 0,128 µl/ml (F) para óleo essencial de <i>Salvia sagittata</i> em bruto (OE) e Frações F1, F2, F3.....	48
<b>Figura 13.</b> Mortalidade de fêmeas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em diferentes concentrações de ivermectina.....	50
<b>Figura 14.</b> Número de ovos por grama de fezes de camundongos infectados com <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados com F2 e OE de <i>Salvia sagittata</i> (100µl/animal), Linalol (150mg/kg <sup>-1</sup> ), ivermectina (200µg/ kg <sup>-1</sup> ). OE (óleo essencial), F2 (fração 2), IMV (ivermectina), CTRL (controle), dpi (dias pós-infecção). Linhas horizontais superiores representam diferenças estatísticas.....	53
<b>Figura 15.</b> Número de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos infectados com <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados com F2 e OE de <i>Salvia sagittata</i> (100µl/animal), Linalol (150mg/kg <sup>-1</sup> ), ivermectina (200µg/ kg <sup>-1</sup> ). OE (óleo essencial), F2 (fração 2), IMV (ivermectina), CTRL (controle), p.i (pós infecção) .....	54

**Figura 16.** Número médio de fêmeas adultas de *Strongyloides venezuelensis* recuperados do intestino delgado de camundongos tratados com F2 e OE de *Salvia sagittata* (100µl/animal), Linalol (150mg/kg<sup>-1</sup>), ivermectina (200µg/ kg<sup>-1</sup>). OE (óleo essencial), F2 (fração 2), IMV (ivermectina), CTRL (controle). Linhas horizontais superiores demonstram diferenças estatísticas entre os grupos. ....55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Compostos detectados no óleo essencial e frações da <i>Salvia Sagittata</i> .....	39
<b>Tabela 2.</b> Fecundidade calculada entre a razão de a média geométrica de ( X ) OPG (ovos por grama de fezes) e média geométrica ( X ) fêmeas parasitas. ....	56

## SUMÁRIO

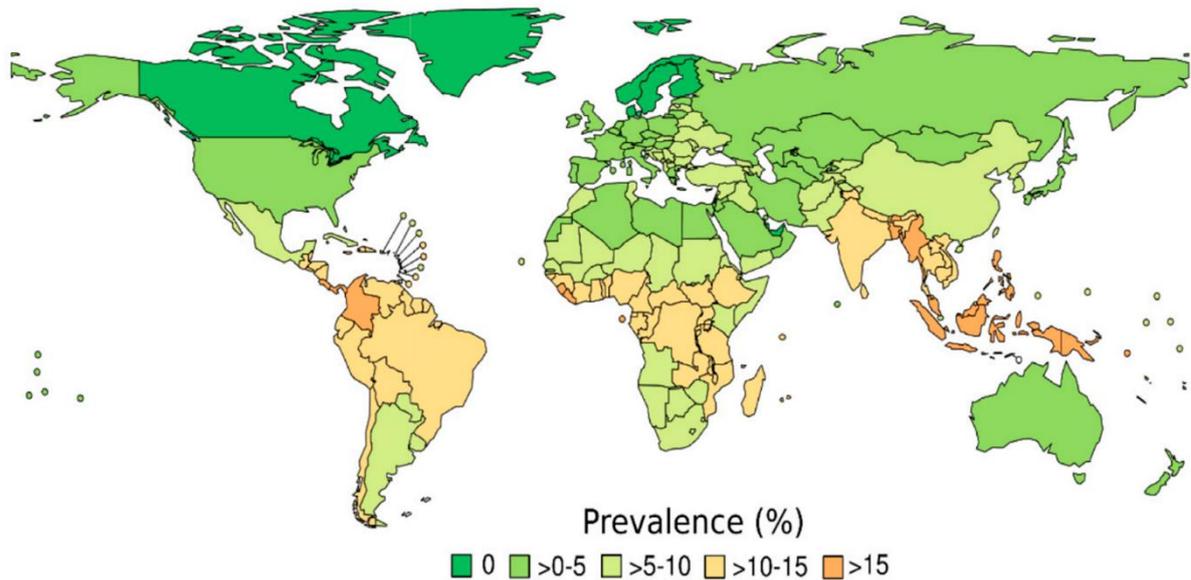
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Parasita.....	18
2.2 Modelo experimental .....	18
2.3 Ciclo de vida de <i>Strongyloides</i> spp.....	19
2.4 Patologia .....	20
2.5 Tratamento .....	22
2.6 Plantas medicinais .....	23
2.7 Óleos essenciais .....	24
2.8 Salvia .....	25
2.8.1 Salvia sagittata.....	26
2.9 Justificativa.....	27
3 OBJETIVOS .....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.1 Material vegetal .....	29
4.2 Extração do óleo essencial.....	30
4.3 Fracionamento em coluna cromatográfica do tipo seca.....	31
4.4 Cromatografia de camada delgada (CCD).....	33
4.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) .....	33
4.6 Modelo biológico.....	34
4.7 Considerações éticas no uso de animais .....	34
4.8 Teste <i>in vitro</i> . .....	34
4.8.1 Infecção do modelo animal .....	34
4.8.2 Coleta de fêmeas parasitas.....	34
4.8.3 Preparo das concentrações e placa de cultura.....	34

4.9 Testes <i>in vivo</i> .....	35
4.9.1 Camundongos .....	35
4.9.2 Infecção dos camundongos.....	35
4.9.3 Tratamento de camundongos .....	35
4.9.4 Quantificação de ovos.....	36
4.9.5 Quantificação de fêmeas .....	36
4.10 Análise estatística .....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1 Análise por Cromatografia de camada delgada (CCD). .....	38
5.2 Identificação de analitos mediante cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG/EM).....	39
5.3 Testes <i>in vitro</i> .....	45
5.3.1 Atividade antiparasitária de OE de <i>S. sagittata</i> e frações <i>in vitro</i> . .....	45
5.3.2 Atividade antiparasitária da ivermectina <i>in vitro</i> .....	49
5.4 Testes <i>in vivo</i> .....	51
5.4.1 Atividade anti-helmíntica <i>in vivo</i> de OE de <i>S. sagittata</i> , frações e composto majoritário. ....	51
5.4.2 Efeito anti-helmíntico na redução de ovos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	51
5.4.3 Efeito anti-helmíntico na redução de fêmeas parasitas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	54
5.4.4 Eficácia da ivermectina sobre o número de ovos e fêmeas parasitas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	58
6 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS .....	61
ANEXOS .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

A Estrongiloidíase, cujo principal agente etiológico é *Strongyloides stercoralis* em humanos, é uma helmintíase transmitida pelo solo, junto com os ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*), sendo a estrongiloidíase considerada a parasitose mais negligenciada. Até agora não foi realizada nenhuma ação no implemento de estratégias de controle da infecção nas áreas endêmicas (BLANTON, 2007; KEISER; HÄBERLI, 2021; OLSEN et al., 2009), apesar de ter alta prevalência, principalmente nos climas tropicais e subtropicais (HALL et al., 1994). Algumas das prováveis razões poderia ser a falta de dados básicos sobre a endemicidade e epidemiologia (OLSEN et al., 2009), ou deficiências no diagnóstico de infecções causadas pelo parasita (MENDES et al., 2017; PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

*S. stercoralis*, é um problema de saúde pública. Se estima que este parasita infecta entre 30 a 100 milhões de pessoas no mundo (SCHÄR et al., 2013). Porém, esses dados têm gerado muitos questionamentos devido aos poucos estudos no diagnóstico que muitas vezes não são adequados ao encontro das larvas do parasita, o que faz que os dados sejam subestimados. No entanto, um grupo de pesquisadores que estimaram a prevalência mundial da estrongiloidíase para o ano 2017, acharam que há 613,9 milhões de pessoas infectadas com o parasita (Figura 1), número dez vezes maior em relação aos dados que conhecemos. O maior número de pessoas infectadas vivem na região do sul da Ásia, seguida da região de Pacífico Ocidental, África e a região Americana (BUONFRATE et al., 2020). Sendo comum em áreas onde o saneamento básico é deficiente, o que favorece a presença de larvas infectantes no solo (HALL et al., 1994).



**Figura 1.** Prevalência estimada da estrogiloidíase. Tomado de Buonfrate et al.(2020).

O que diferencia *Strongyloides stercoralis* de outros parasitas helmínticos é a capacidade de autoinfecção. O parasita permanece dentro do hospedeiro por anos, enquanto produz sintomas mínimos ou nulos, porém em indivíduos imunossuprimidos (pessoas infectadas com o vírus linfotrópico das células T1, alcoólicos, pessoas que consomem corticosteroides frequentemente, ou que foram transplantadas), o número de parasitas pode aumentar e gerar a síndrome de hiperinfecção que pode levar a uma infecção disseminada, onde os parasitas vão atingir diferentes órgãos do corpo (pulmões, fígado, cérebro entre outros), o que pode ser mortal (GANN; NEVA; GAM, 1994). A sepse sistêmica é uma complicação comum devido a translocação das bactérias entéricas do trato intestinal, junto com os parasitas para outros locais do organismo (GREAVES et al., 2013).

Quando a infecção causada por *Strongyloides stercoralis* é aguda, a pessoa apresenta sintomas gastrointestinais (diarreia, anorexia e dor abdominal) e pulmonares (irritação traqueal, tosse e bronquite), quando é crônica, geralmente não apresenta sintomas, mas em pessoas sintomáticas podem ocorrer problemas gastrointestinais crônicos ou manifestações dermatológicas causadas pela migração das larvas (PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

Espécies que parasitam roedores, *Strongyloides ratti* e *Strongyloides venezuelensis*, são consideradas como modelos experimentais mais adequados para o estudo da estrogiloidíase humana (SATO; TOMA, 1990) e animal. Devido a semelhanças com o

*Strongyloides stercoralis*, como no caso da rota migratória, que é semelhante em ambas espécies de parasitas (MARRA et al., 2011). Neste trabalho o *Strongyloides venezuelensis* será utilizado como modelo experimental.

Para o tratamento da estrogiloidíase, usam-se diferentes anti-helmínticos disponíveis. Compostos das classes benzimidazoles (tiabendazol, mebendazol, cambendazol e albendazol), imidotiazol (levamisol) e lactonas macrocíclicas (ivermectina) (KEISER; HÄBERLI, 2021; ZAHA et al., 2000) . No entanto, estes anti-helmínticos tem gerado muitas controvérsias, devido as taxas irregulares de cura (55 a 100%) e apresentam efeitos colaterais como desorientação, fadiga, náuseas, anorexia, dor abdominal, constipação, tontura (GANN; NEVA; GAM, 1994; MENDES et al., 2017; ZAHA et al., 2000), alta incidência de disfunções hepáticas (ZAHA et al., 2000), e a maioria dos fármacos apenas atua contra formas adultas do parasita (MCKELLAR; JACKSON, 2004; PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

As plantas representam um recurso terapêutico alternativo. Achados arqueológicos revelaram que o uso das plantas como medicina tradicional remonta ao período paleolítico médio aproximadamente 60,000 anos (SOLECKI, 1975). Se estima que existem aproximadamente 420,000 espécies de plantas na Terra das quais se conhece pouco. Elas são utilizadas com fins alimentares, medicinais, entre outros. A OMS estima que os medicamentos à base de plantas são usados na atenção primária de aproximadamente 35 a 40 milhões de pessoas no mundo (PAN et al., 2013).

As plantas são conhecidas por terem um papel importante no controle e tratamento de doenças, isso é devido ao grande número de compostos biológicos ativos que exercem bons efeitos terapêuticos e que permitiram a descoberta de muitos medicamentos importantes (MARIDAS; BRITO, 2008). Aproximadamente 50% da origem de todos os fármacos da terapêutica moderna derivam de produtos vegetais (PAN et al., 2013). As plantas foram e continuam sendo a base para o descobrimento de novos fármacos (SCHMIDT et al., 2008).

Atualmente há um grande interesse nos produtos derivados de plantas. Acredita-se que muitos deles apresentam menores efeitos adversos ou tóxicos, comparados com os produtos sintéticos, além das vantagens ao meio ambiente, por serem biodegradáveis (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Nesse contexto, o uso de derivados de plantas, como os óleos essenciais poderia significar uma alternativa eficaz no tratamento da estrogiloidíase. É por isso que com este estudo se pretendeu encontrar na *Salvia sagittata* uma planta com potencial anti-*Strongyloides*.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos anti-helmínticos *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial de *Salvia sagittata*, frações e seu o composto majoritário, linalol contra *Strongyloides venezuelensis*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Parasita

O gênero *Strongyloides*, pertence à ordem de Rhabditoidea. Compreende aproximadamente 50 espécies de parasitas gastrointestinais (SPEARE; GROVE, 1989) que infectam mamíferos, aves, répteis e anfíbios (VINEY, 2015).

Existem duas espécies que parasitam o homem: *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides fuelleborni* (SCHAD, 1989). O *S. stercoralis* é a espécie de maior prevalência nos humanos (SPEARE; GROVE, 1989), porém também foram encontradas infecções de *S. stercoralis* em cães, e várias espécies de macacos (GENTA; GROVE, 1989).

Existem outras espécies que podem acometer animais de produção, dentro delas *S. papillosus*, *S. ransomi*, *S. westeri* que infectam ruminantes, porcos e cavalos respectivamente; com maior frequência em animais jovens. A literatura tem poucos relatos referente a estes parasitas. Pode ser devido a que essas infecções são geralmente de baixa importância, provavelmente pelo uso extensivo de anti-helmínticos nas fazendas (THAMSBORG et al., 2017). Há alguns relatos antigos que falam que o *S. papillosus* está relacionado com mortes súbitas em bezerros (TAIRA; URA, 1991), mas cujos mecanismos que levam a morte súbita, ainda não foram elucidados (THAMSBORG et al., 2017).

### 2.2 Modelo experimental

Para melhor entendimento da estrogiloidíase humana e animal, se utilizam modelos experimentais que infectam roedores. *S. venezuelensis* é um dos modelos mais utilizados para estudar a infecção com *Strongyloides* (SATO; TOMA, 1990).

*Strongyloides venezuelensis* é um nematóide parasita de roedores que tem sido utilizado como modelo para estudar as relações parasita-hospedeiro em infecções humanas e/ou animais, aspectos moleculares durante a infecção, eficácia de novas terapias e muitos eventos imunológicos relacionados à estrogiloidíase (PAULA et al., 2013).

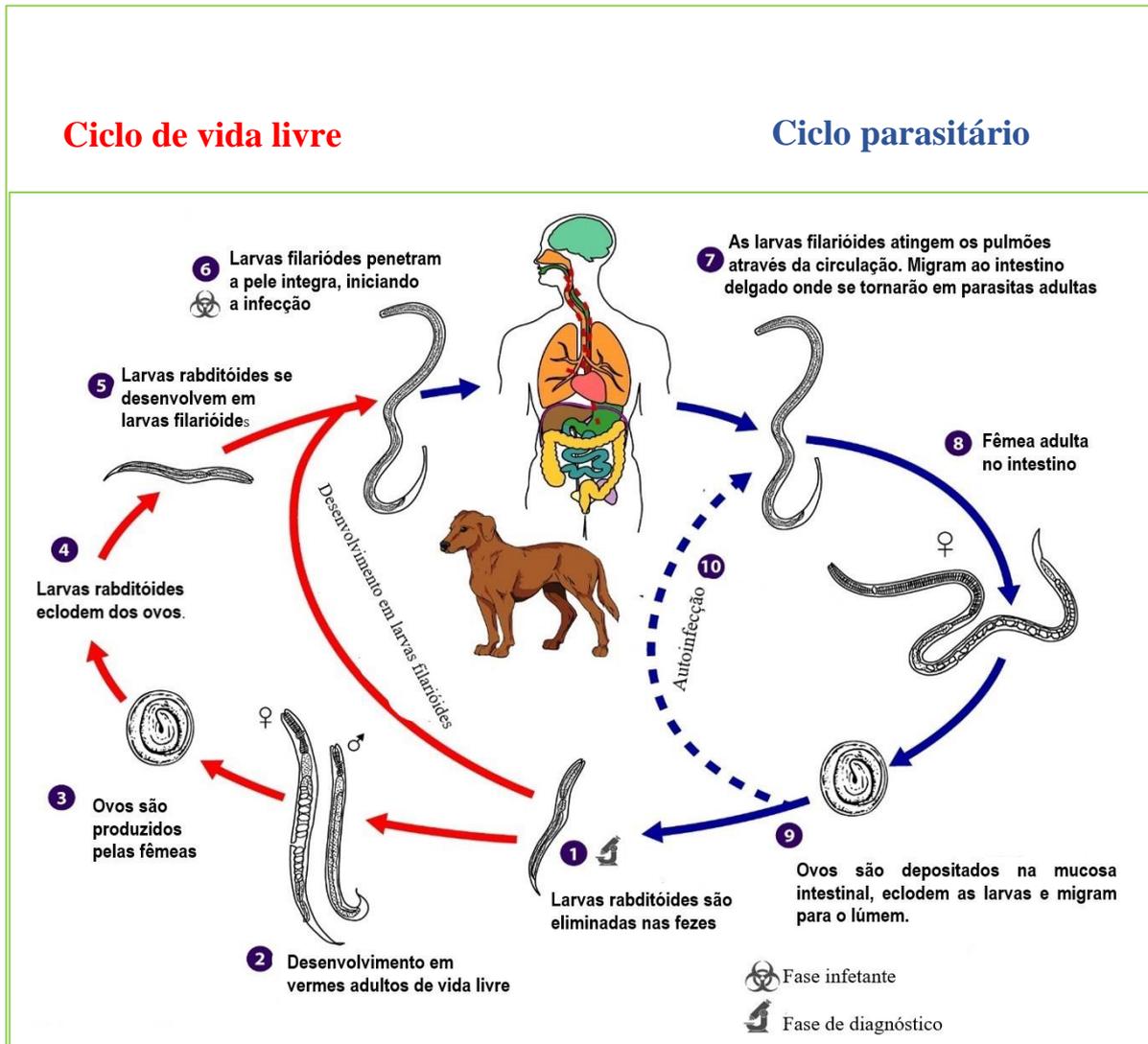
*S. venezuelensis*, diferente do *S. stercoralis* elimina ovos nas fezes e *S. stercoralis* elimina larvas (BRELOER; ABRAHAM, 2017), porém a rota de migração das larvas infecciosas de *S. venezuelensis* no roedor é semelhante a observada durante a migração de *S. stercoralis* em humanos. As larvas infectantes migram aos pulmões antes de se instalar na mucosa intestinal (GONÇALVES et al., 2012, MARRA et al., 2011).

### 2.3 Ciclo de vida de *Strongyloides* spp

O ciclo de vida de *Strongyloides* spp. (Figura 2) é complexo, podendo ocorrer tanto no solo (ciclo de vida livre) como em hospedeiros vertebrados (ciclo parasitário).

No ciclo de vida livre, as larvas rabditoídes são excretadas nas fezes, podendo desenvolver o ciclo indireto ou direto. No ciclo indireto as larvas excretadas nas fezes se desenvolverão em adultos, machos e fêmeas de vida livre, terão reprodução sexuada (GREAVES et al., 2013; VINEY, 2015 e a fêmea produzirá ovos fertilizados. As larvas vão eclodir em larvas rabditoídes, que se tornarão em larvas filariídes infectantes (L3). No ciclo direto as larvas rabditoídes eliminadas nas fezes se desenvolverão no solo diretamente para larvas filariídes (L3). As larvas L3 penetrarão a pele do hospedeiro, e darão início à fase parasitária (BARROS; MONTES, 2014; GREAVES et al., 2013; VINEY, 2015).

No ciclo parasitário, as larvas L3 que penetraram a pele do hospedeiro serão transportadas por via sanguínea até os pulmões, atingem a traqueia e logo serão deglutidas. No intestino delgado ocorrerão duas mudas para se tornarem fêmeas adultas, elas se reproduzirão por partenogênese e darão origem as larvas rabditoídes, que podem ser excretadas nas fezes ou tornarem-se larvas filariídes infectantes e autoinfetar o hospedeiro (*Strongyloides stercoralis*), mediante a penetração pela mucosa intestinal ou pela cavidade perianal (BARROS; MONTES, 2014; GREAVES et al., 2013; VINEY, 2015).



**Figura 2-** Ciclo biológico de *Strongyloides Spp.* Adaptado de CDC

## 2.4 Patologia

As manifestações clínicas podem ser agudas, as que estão relacionadas com a rota de migração das larvas dos pulmões até o intestino delgado. Os indivíduos infectados podem apresentar irritação no local de penetração das larvas infectantes. Uma semana depois da infecção os indivíduos podem ter sintomas respiratórios (tosse seca, irritação traqueal) ou sintomas gastrointestinais como diarreias, constipação, dores abdominais (NUTMAN, 2017) que começam 2 semanas depois da infecção, e com larvas detectáveis nas fezes depois de 3 a 4 semanas (KEISER; NUTMAN, 2004)

Quando a infecção é crônica, geralmente não apresentam sintomas (GENTA; GROVE, 1989), porém em casos sintomáticos, podem apresentar manifestações gastrointestinais, como diarreia, constipação, vômitos intermitentes. Também são comuns manifestações dermatológicas, coceira no ânus, urticaria crônica e erupções cutâneas, estrias lineares de coceira na parte inferior do tronco, coxas e nádegas ( larva currens ) (KEISER; NUTMAN, 2004)

### **Síndrome de hiperinfecção/infecções disseminadas**

O aumento excessivo da migração larvária pelo organismo, gera a síndrome de hiperinfecção que pode desencadear uma infecção disseminada. A migração pode ser não disseminada, quando se limita aos órgãos normalmente envolvidos no ciclo pulmonar (trato gastrointestinal, peritônio e pulmões) ou pode ser infecção disseminada, em que as larvas migram para outros órgãos do corpo como a pele, gânglios linfáticos mesentéricos, vesícula biliar, fígado, diafragma, coração, pâncreas, músculo esquelético, rins, ovários, e cérebro (NUTMAN, 2017).

As pessoas com hiperinfecção apresentam sintomas gastrointestinais e pulmonares de maneira exacerbada. Há um grande número de larvas nas fezes e/ou escarro (NUTMAN, 2017). A estrogiloidíase disseminada causa hemorragia ao romper os capilares, provoca respostas inflamatórias e bactérias entéricas são transportadas junto com as larvas provenientes do intestino para outros órgãos. O resultado da estrogiloidíase disseminada se manifesta com diarreias intensas, sepses, hemorragia pulmonar, broncopneumonia e com menor frequência, meningites, abscessos cerebrais, hepatites, esplenites e púrpura (GENTA, 1992). As consequências da hiperinfecção podem ser fatais (~70% de mortalidade) (GHOSH; GHOSH, 2007).

Algumas das condições associadas com a hiperinfecção e disseminação, são a administração de corticosteroides, infecção pelo vírus HTLV-1 (vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1), transplante de órgãos e alcoolismo (GREAVES et al., 2013; KEISER; NUTMAN, 2004; NUTMAN, 2017). O fator de risco mais forte parece ser a administração de corticosteroides (NUTMAN, 2017). Um exemplo de hiperinfecção disseminada é o caso exposto por IGRA-SIEGMAN et al., (1981) em que uma pessoa hiperinfectada por *Strongyloides stercoralis* que recebia esteroides suprarrenais apresentou serias complicações, sepses bacteriana e meningite. Existem casos de hiperinfecção em pessoas tratadas com

corticosteroides, incluindo por períodos curtos de tempo entre 6 a 17 dias (GHOSH; GHOSH, 2007).

Genta (1992), sugere que os corticosteroides podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de estrogiloidíase disseminada. Há um efeito direto no parasita acelerando o processo de muda das larvas rabditoides para larvas filarioides e como consequência o aceleração da autoinfecção.

## 2.5 Tratamento

Para o tratamento da estrogiloidíase, se usa diferentes anti-helmínticos disponíveis no mercado, como compostos das classes benzimidazois e a ivermectina (KEISER; HÄBERLI, 2021; ZAHA *et al.*, 2000). Os benzimidazois (albendazol e tiabendazol) ligam-se à tubulina do nematoide, inibindo assim a formação de microtúbulos, isso acaba desestabilizando o equilíbrio tubulina-microtúbulos, dificultando o transporte de grânulos de secreção ou enzimas secretoras no citoplasma da célula do parasita com a consequente lise celular (MCKELLAR; JACKSON, 2004). A ivermectina atua sobre os canais iônicos de cloreto, ativados por glutamato, que se limita aos nematoides, reduz o movimento corporal do parasita e morte (G. GEARY; MORENO, 2012; MCKELLAR; JACKSON, 2004).

Numa revisão, onde se coleta informações de diferentes trabalhos para tentar comparar a eficácia da ivermectina frente ao albendazol e tiabendazol em pessoas com estrogiloidíase crônica, mostra-se que: a taxa de cura pela ivermectina é maior que o albendazol, porém ambos apresentam efeitos adversos leves e ao comparar a ivermectina com o tiabendazol, ambos têm uma taxa de cura equivalente, porém os efeitos adversos são maiores nas pessoas tratadas com tiabendazol. Portanto, se conclui que a ivermectina tem melhor taxa de cura e melhor tolerabilidade (HENRIQUEZ-CAMACHO *et al.*, 2016).

Pessoas com infecção crônica por *S. stercoralis*, foram tratadas com albendazol com doses de 400 mg/kg, duas vezes ao dia, durante 7 dias. Outro grupo de pessoas foi tratado com uma dose única e outro grupo com dose em dobro de ivermectina (200 µg/kg). Os indivíduos tratados com albendazol apresentaram uma taxa de cura de 63,3%, diferente dos indivíduos tratados com ivermectina, cuja taxa de cura foi de 96,8% para os da dose única e 93,1% para os da dose em dobro (SUPUTTAMONGKOL *et al.*, 2011).

GANN; NEVA; GAM, (1994) compararam a eficácia do tratamento da ivermectina (200 µg/kg) frente ao tiabendazol (50 mg/kg/dia) em indivíduos com infecção crônica. Ambos tiveram eficácia equivalente na taxa de cura, porém quase 95 % dos indivíduos

tratados com tiabendazol mostraram efeitos adversos (tonturas, náuseas e desorientação) frente a 18 % com ivermectina.

BISOFFI et al., (2011), também, fizeram um ensaio clínico aleatório, para comparar a eficácia e avaliar a segurança e tolerabilidade de fármacos utilizados para tratar a estrogiloidíase. A ivermectina foi usada em dose única (200 µg/kg) e o tiabendazol em duas doses diárias de 25mg/kg administradas durante 2 dias. Não encontraram diferença significativa na eficácia entre os tratamentos, porém foram relatados efeitos adversos, embora leves, em 20 a 73% das pessoas tratadas com ivermectina e tiabendazol respectivamente.

Estes anti-helmínticos tem gerado muita controvérsia, devido as taxas de cura irregulares (entre 55% e 100%) e apresentam efeitos colaterais adversos na população (GANN; NEVA; GAM, 1994; MENDES et al., 2017; ZAHA et al., 2000) e a maioria dos fármacos apenas atua contra formas adultas do parasita (MCKELLAR; JACKSON, 2004; PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

O número de trabalhos publicados sobre novos compostos contra *Strongyloides* spp é limitado (MENDES et al., 2017) e a procura de novas alternativas de tratamento é cada vez mais relevante. Neste contexto, as plantas medicinais e seus derivados podem significar novos alvos terapêuticos.

## **2.6 Plantas medicinais**

As plantas são utilizadas como medicamentos através da história, foram adaptadas as necessidades pessoais imediatas: são acessíveis e muitas vezes econômicas (BRUNETON, 2012).

As plantas medicinais são fonte importante para melhorar a saúde. Elas vêm sendo utilizadas desde há muito tempo na medicina tradicional e contribuíram ao longo do tempo no descobrimento de princípios ativos que hoje são fármacos utilizados na terapêutica moderna. Uma conquista importante e que permitiu o começo da era dominada pela indústria farmacêutica, foi o descobrimento do primeiro fármaco sintético (1897), a aspirina (ácido acetilsalicílico), sintetizada a partir de ácido salicílico, um ingrediente ativo dos remédios herbais analgésicos, como é a casca da árvore de salgueiro (SCHMIDT et al., 2008).

As plantas são cada vez mais apreciadas na pesquisa farmacêutica, como um recurso importante para novos medicamentos, e com um corpo cada vez maior de literatura médica que respalda a eficácia clínica dos tratamentos a base de ervas (BRUNETON, 2012)

As plantas contêm metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários (enzimas, proteínas, lipídios, carboidratos e clorofila) participam na nutrição e processos metabólicos da planta. Os metabólitos secundários, influenciam nas interações da planta com seu entorno. No meio natural os metabólitos secundários desempenham funções de defesa contra herbívoros (insetos, vertebrados), defesa contra patógenos de plantas e são compostos que atuam para atrair polinizadores e dispersores de sementes. Os metabólitos secundários são conhecidos por terem diversas propriedades medicinais. (BAKKALI et al., 2008; BRUNETON, 2012).

## **2.7 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais são um grupo de metabólitos secundários das plantas aromáticas. São uma mistura complexa de terpenos/terpenoides, constituintes aromáticos e alifáticos. Os óleos essenciais podem conter entre 20 – 60 compostos, com dois ou três constituintes principais, que representam entre 30 e 60 % do total do óleo essencial (BAKKALI et al., 2008).

Para serem isolados das plantas se utilizam diversos métodos, os mais usados são os métodos de destilação, geralmente a hidrodestilação e destilação a vapor. A hidrodestilação consiste em colocar o material vegetal em água seguido de aquecimento até que alcancem o ponto de ebulição. Os compostos voláteis são arrastados pelo vapor, condensados e coletados como óleos essenciais (AZIZ et al., 2018). Os óleos essenciais são compostos líquidos, oleosos, insolúveis em água, normalmente incolores, voláteis, e de aromas fortes (BRUNETON, 2012).

A composição de um óleo essencial pode variar de maneira drástica dentro de uma mesma espécie, isso significa que de uma espécie vegetal se pode obter óleos essenciais com diferentes composições químicas, farmacológicas e toxicológicas (BRUNETON, 2012). São muitos os fatores que intervêm na variação da composição do óleo, estes podem depender do órgão da planta (folhas, flores, sementes, raízes) utilizado para a extração, as condições ambientais ou geográficas onde cresce a planta, o tempo de coleta ou o método de extração do óleo essencial (AZIZ et al., 2018).

As atividades biológicas dos óleos essenciais geralmente são atribuídas aos compostos majoritários, mas tem casos onde os compostos minoritários são os responsáveis pela ação bioativa ou contribuem com efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. (KATIKI et al., 2017).

Os óleos essenciais possuem propriedades favoráveis para os humanos e animais (CHÁVEZ-SOTO et al., 2021). São utilizados na indústria farmacêutica, agrônômica, alimentar, sanitária, cosmética e de perfumaria (BAKKALI et al., 2008). Dentre as propriedades farmacêuticas os óleos essenciais apresentam potencial contra bactérias (ARNALSCHNEBELEN et al., 2004), fungos (KALEMBA; KUNICKA, 2003), vírus (SCHNITZLER, 2019) e parasitas (OLOUNLADÉ et al., 2012; QI et al., 2015). No campo veterinário, melhoram a conversão alimentar, o sabor das rações, estimulam as enzimas digestivas e melhoram a fermentação ruminal (CHÁVEZ-SOTO et al., 2021).

Os óleos essenciais têm mostrado potencial contra nematóides como *Haemonchus contortus*. O óleo essencial de *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* apresentaram uma potente atividade nematicida, inibiram em torno de 98% da eclosão de larvas ( $1,25 \text{ mg. ml}^{-1}$ ) e 90% do desenvolvimento larvário ( $10 \text{ mg. ml}^{-1}$ ) de *Haemonchus contortus* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007). A atividade de óleos essenciais contra *Strongyloides* spp, embora escassa, também tem sido reportada. Testes *in vitro* relataram a efetividade do óleo essencial de *Siparuna guianensis* ( $0,2-1,0 \text{ mg/ml}$ ) ao inibir a eclosão de larvas e a motilidade de larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis* (CARVALHO et al., 2020). Os óleos de *Zanthoxylum zanthoxyloides* e *Newbouldia laevis* inibiram a eclosão de larvas de *Strongyloides ratti* com  $\text{IC}_{50}$  de 19,5 e 18,2  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Também inibiram a migração de larvas com  $\text{IC}_{50}$  semelhantes ( $\text{IC}_{50} = 46$  e  $51 \mu\text{g/ml}$  para *Z. zanthoxyloides* e *N. laevis* respectivamente) (OLOUNLADÉ et al., 2012).

## 2.8 Salvia

Salvia pertence à família das laminaceas (anteriormente labiatae), compreendendo 220 gêneros e 4000 espécies (WU et al., 2012). Distribuídas principalmente no mediterrâneo, alguns pequenos grupos estão distribuídos em regiões da Austrália, sudoeste da Ásia e América do Sul, em forma de plantas anuais e perenes (KOKKINI; KAROUSOU; HANLIDOU, 2003).

Salvia, cujo nome provém do latim *salvare* que significa “salvar/curar”, é o maior gênero da família das laminaceas. Compreende aproximadamente 900 espécies conhecidas mundialmente, muitas destas espécies são utilizadas com fins culinários e algumas são utilizadas com fins medicinais (ALTINDAL; ALTINDAL, 2016). Como exemplos medicinais, temos a salvicine um derivado farmacologicamente ativo da *Salvia prionitis* hance, que apresenta potente atividade anticancerígena ao inibir a angiogênese (ARAUJO et al., 2011; ZHANG et al., 2013). A raiz seca de *Salvia miltiorrhiza* (Danshen em chinês) é uma das plantas

medicinas tradicionais mais populares nos países asiáticos e tem sido usada amplamente para o tratamento de doenças cardiovasculares, hepatites, insuficiência renal, doenças inflamatórias como edemas, artrite, entre outras. Mais de 700 companhias farmacêuticas produzem preparações de Danshen na China (WU et al., 2012). Danshen também está sendo utilizada para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares em diferentes partes do mundo (CHEN; CHEN, 2018; GAO et al., 2012; WU et al., 2012).

As plantas de *Salvia* spp. contêm uma grande variedade de metabólitos secundários. Sete tipos de compostos estão presentes na *Salvia* spp.: sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterpenoides, triterpenoides, esteroides, polifenóis e outros. No caso dos óleos essenciais se encontram principalmente monoterpenos e sequiterpenos (WU et al., 2012).

São diversas as propriedades bioativas relatadas com respeito da *Salvia*. Este gênero demonstrou ter atividade antibacteriana, antioxidante, anticancerígena, antiviral (WU et al., 2012) e antiparasitária. Dentro das propriedades antiparasitárias, relata-se a *Salvia sahendica* que apresentou atividade biológica contra *Plasmodium falciparum* (CI50 0,8 – 8,8 um ) e ao *Trypanosoma brucei* (0,8 - 32,3 uM) (EBRAHIMI et al., 2013). Extrato de *Salvia fruticosa* matou *in vitro*, 100% de vermes adultos de *Schistosoma haematobium* entre as 12 e 24 horas de incubação em concentrações de 500, 250 e 125 µg/ml (FADLADDIN, 2021).

### 2.8.1 *Salvia sagittata*

A *Salvia sagittata* é uma planta herbácea perene, de 1-1,60 m de altura que é endêmica na cordilheira dos andes no Peru e Equador, entre os 2800 e 3000 metros de altitude. Seu habitat são encostas de baixa inclinação, formações arbustivas de baixo crescimento, margens de riachos. A *Salvia sagittata* é conhecida popularmente como “Salvia Azul”, devido a cor azul brilhante de suas flores. As folhas têm forma de seta e são de cor verde amarelado, tem inflorescências pegajosas na parte apical da planta. Segundo relatos etnobotânicos, as folhas de *Salvia sagittata* são utilizadas em infusões para curar diferentes afeções como espasmos, diarreias, gripe, flatulências, dor de estomago, dores articulares entre outras (DE-LA-CRUZ; VILCAPOMA; ZEVALLOS, 2007; GONZALES DE LA CRUZ et al., 2014; LOJA HERRERA, 2002; TUBON et al., 2019). Na pesquisa científica, a *Salvia sagittata* (extrato etanólico) mostrou ter efeito anti-inflamatório *in vitro* (TUBON et al., 2019).

A motivação para a realização deste trabalho baseia-se no interesse em encontrar novas alternativas terapêuticas contra parasitas. As plantas são uma alternativa promissora. *Salvia sagittata* representa uma planta com possível potencial antiparasitário. Os relatos

etnobotânicos são um importante suporte que abre caminho para a busca das possíveis propriedades benéficas desta planta. Apesar da literatura científica não apresentar estudos da *Salvia sagittata* contra helmintos, há indícios que pode apresentar um potencial eficaz, levando em consideração testes preliminares a este estudo, em que o óleo essencial de *Salvia sagittata* foi avaliado *in vitro* contra os vermes adultos do *Schistosoma mansoni*. O óleo essencial de *Salvia sagittata* matou 100% dos vermes em 24 horas de exposição do parasita ao óleo em concentrações de 100 - 200 µg/ml. Levando em conta esses resultados, presumiu-se que a ação anti-helmíntica poderia ocorrer também contra *Strongyloides* spp, nematódeo causador da doença tropical mais negligenciada, que, além de humanos, infecta animais.

## **2.9 Justificativa**

A estrogiloidíase é a doença parasitária tropical mais negligenciada, representando um problema de saúde pública, particularmente nas populações mais carentes (OLSEN et al., 2009).

Os fármacos sintéticos utilizados atualmente têm uma resposta irregular e podem apresentar efeitos colaterais adversos na população. A necessidade de uma nova alternativa no controle e tratamento da estrogiloidíase é relevante. Os compostos derivados de plantas vêm recebendo cada vez mais atenção devido aos relatos de terem potencial anti-helmíntico, podendo ser eficazes para tratamento desta parasitose que difere de outras por se multiplicar dentro do hospedeiro humano ou animal.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-helmíntico do óleo essencial de *Salvia sagittata* (Lamiaceae) contra *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditoidea), modelo laboratorial de *S. stercoralis*.

#### Objetivos específicos

- Obtenção de óleo essencial de *Salvia sagittata*.
- Fracionamento químico do óleo essencial para testar a atividade *in vitro* e *in vivo* do óleo e frações frente a *Strongyloides venezuelensis*.
- Avaliar *in vivo* os compostos que apresentem a melhor atividade *in vitro*.
- Identificar os compostos presentes nas frações obtidas a partir do óleo essencial de *Salvia sagittata*. Identificar o composto majoritário do óleo e testá-lo puro frente a *Strongyloides venezuelensis*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

A planta utilizada neste estudo foi coletada no mês de janeiro de 2020, na colina chamada “La Botica” em Cachicadán (Santiago de Chuco) - La Libertad - Peru (Figura 3). Nestes locais cresce como planta endêmica entre os 2 800 a 3 000 metros de altitude.

As partes aéreas da planta (folhas) de *Salvia sagittata* (Figura 4) foram coletadas e depois identificadas no Herbário Trujixense (HUT), no qual uma exsicata encontra-se depositada sobre o número de 57844 no laboratório número 140051 da Universidad Nacional de Trujillo-Perú.



**Figura 3**-Localização do material vegetal, *Salvia sagittata* no Peru



**Figura 4.** Material vegetal, *Salvia sagittata*

#### **4.2 Extração do óleo essencial**

A extração do óleo essencial foi realizada a partir das folhas frescas de *Salvia sagittata*. Foi utilizada a técnica de hidrodestilação, mediante o uso do equipamento *clevenger simax* (6000 ml) por 4 horas. O óleo obtido foi armazenado em frascos âmbar para evitar degradações químicas por ação da luz, calor e do ar e mantido a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  até o uso.



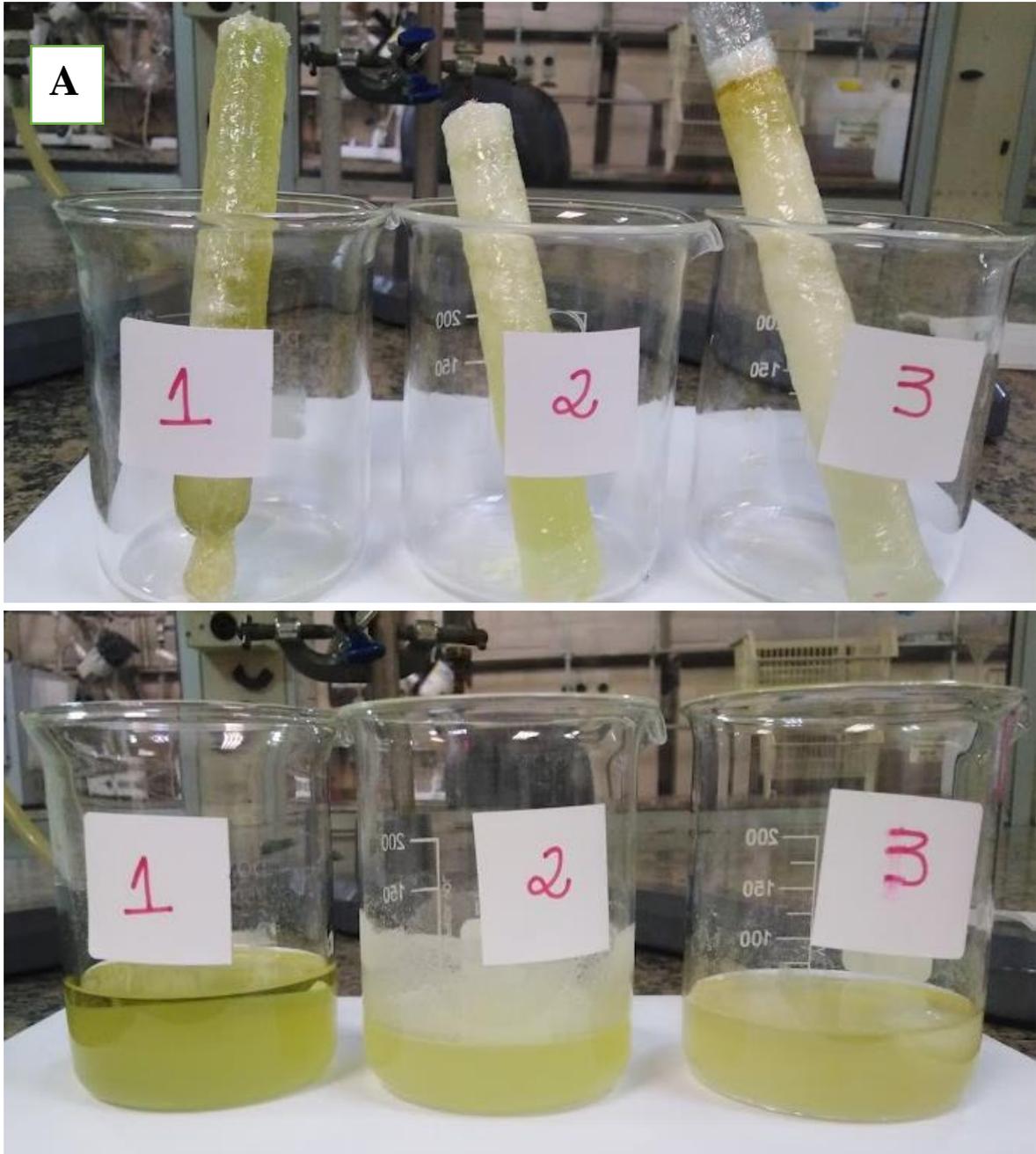
**Figura 5.** Extração do óleo essencial mediante hidrodestilação

#### **4.3 Fracionamento em coluna cromatográfica do tipo seca**

Para o fracionamento do óleo essencial foi seguindo a metodologia de GALVÃO et al., (2012). Para preparar a coluna seca, utilizou-se como suporte, membrana de acetato de celulose de 40 cm de comprimento e 1,8 cm de diâmetro, previamente lavada com hexano.

O empacotamento foi feito utilizando 70 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), depois foi adicionado 5,01 g de OE na parte superior da coluna e eluido com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (fase móvel), selecionado após a análise por cromatografia de camada delgada. A coluna foi cortada em três frações de 14 cm (F1), 13 cm (F2) e 14 cm (F3).

Com a finalidade de extrair os compostos da sílica, as frações obtidas foram filtradas a vácuo em filtro de placa porosa e lavadas com diclorometano.



**Figura 6.** Fracionamento do óleo essencial mediante coluna cromatográfica tipo seca (A), dessorção de cada fracção (B)

#### 4.4 Cromatografia de camada delgada (CCD)

O óleo essencial bruto e as frações obtidas em coluna seca foram analisadas por CCD, usando-se cromatoplasas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm) e diclorometano como eluente (fase móvel).

As amostras foram solubilizadas em acetato de etila e, com auxílio de uma microseringa foram aplicadas na placa de sílica gel. Em seguida a placa de CCD foi colocada em uma cuba de vidro contendo diclorometano para eluição dos compostos.

A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada ultravioleta de 254 nm e 366nm. Em seguida a placa foi borrifada com solução de anisaldeído para revelação dos terpenos segundo o método de WAGNER; BLADT (1995)

Após análise das frações por CCD, as mesmas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

#### 4.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

A análise das amostras foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detetor seletivo de massas Agilent modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25 µm) nas seguintes condições: Temperatura do injetor = 220 °C, coluna =60°C, taxa de aquecimento de 3°C ·min<sup>-1</sup> até 240°C e detetor = 250°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 1mL·min<sup>-1</sup>. Detetor seletivo de massas operando a 70 eV, m/z = 30 a 500 u.m.a. (unidade de massa atômica)

As amostras foram solubilizadas em acetato de etila e a identificação foi realizada através do cálculo dos índices de retenção dos analitos, utilizando-se a co-injeção de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos (C8 a C24), comparação com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-11) e com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Os procedimentos de fracionamento do óleo essencial e análises cromatográficas foram realizadas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP (CPQBA), localizado em Paulínia (SP) com a supervisão do Dr. Adilson Sartoratto.

## 4.6 Modelo biológico

*Strongyloides venezuelensis* foi o modelo experimental usado nos testes. Foram utilizadas apenas as fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*, linhagem isolada de roedor silvestre, *Bolomys lasiurus* em 1986 e mantida em *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, no biotério do Departamento de Biologia Animal – área Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP

## 4.7 Considerações éticas no uso de animais

Os procedimentos com animais cumpriram com as normativas de experimentação animal. A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas aprovou os procedimentos que se utilizaram neste estudo (protocolo 5869-1/2022 e protocolo 5961-1/2022)

## 4.8 Teste *in vitro*.

### 4.8.1 Infecção do modelo animal

Larvas filarioides (L3) foram obtidas por meio de coprocultura das fezes dos ratos infectados com *S. venezuelensis*. As fezes coletadas foram maceradas e homogeneizadas utilizando água deionizada e carvão animal granulado e mantidas em estufa por 48 horas a 27° C. As larvas foram concentradas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (RUGAI; MATTOS; BRISOLA, 1954) e utilizadas para infectar ratos Wistar machos, por meio de injeção subcutânea na região abdominal, contendo aproximadamente 1500 larvas filarioides (L3).

### 4.8.2 Coleta de fêmeas parasitas

A eutanásia dos ratos foi feita 15 dias após a infecção por injeção de xilazina e quetamina. Após a eutanásia uma porção de aproximadamente 15 cm de intestino foi excisado e aberto longitudinalmente, lavado com solução salina, colocado em placa de Petri e mantido em estufa a 37°C por um período de uma hora (BASTOS et al., 2017, BERNA et al., 2022)

As fêmeas partenogênicas parasitas foram coletadas, lavadas em solução salina e transferidas a placa de cultura de 24 poços (3-4 fêmeas/poço)

### 4.8.3 Preparo das concentrações e placa de cultura

O óleo essencial bruto e frações foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações para o óleo bruto (OE), fração 1 (F1), fração 2 (F2), e fração 3 (F3), foram de 0,004 µl/ml; 0,008 µl/ml; 0,016 µl/ml; 0,032 µl/ml; 0,64 µl/ml; 0,128 µl/ml e para a ivermectina foram usadas as concentrações de 0,38 µg/ml; 0,75 µg/ml; 1,5 µg/ml; 3 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 20 µg/ml; 30µg/ml.

Foram colocadas aproximadamente 3 a 4 fêmeas parasitas por poço, com RPMI/antibiótico (500ul de penicilina-estreptomicina /50 ml de RPMI) mais o composto a ser testado solubilizado em DMSO. Cada composto foi testado em triplicata.

A placa foi incubada em estufa a 37°C com CO<sub>2</sub> a 5% (Thermo electron corporation - Revco) e as observações foram feitas em microscópio óptico invertido (Leica DMIL) durante 7 dias com intervalos de 24 horas.

#### **4.9 Testes *in vivo***

Os compostos com a melhor atividade *in vitro* foram testados *in vivo* (OE, F2). Além disso foi testado o composto majoritário do óleo essencial de *S. sagittata*, linalol (LI). Este composto foi comprado de Sigma Aldrich.

##### **4.9.1 Camundongos**

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos machos isogênicos *Mus musculus* da linhagem BALB/cAnUnib, com 31 dias de idade e peso aproximado de 20 gramas. Os animais foram provenientes do Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos no biotério da área de Parasitologia do departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia UNICAMP.

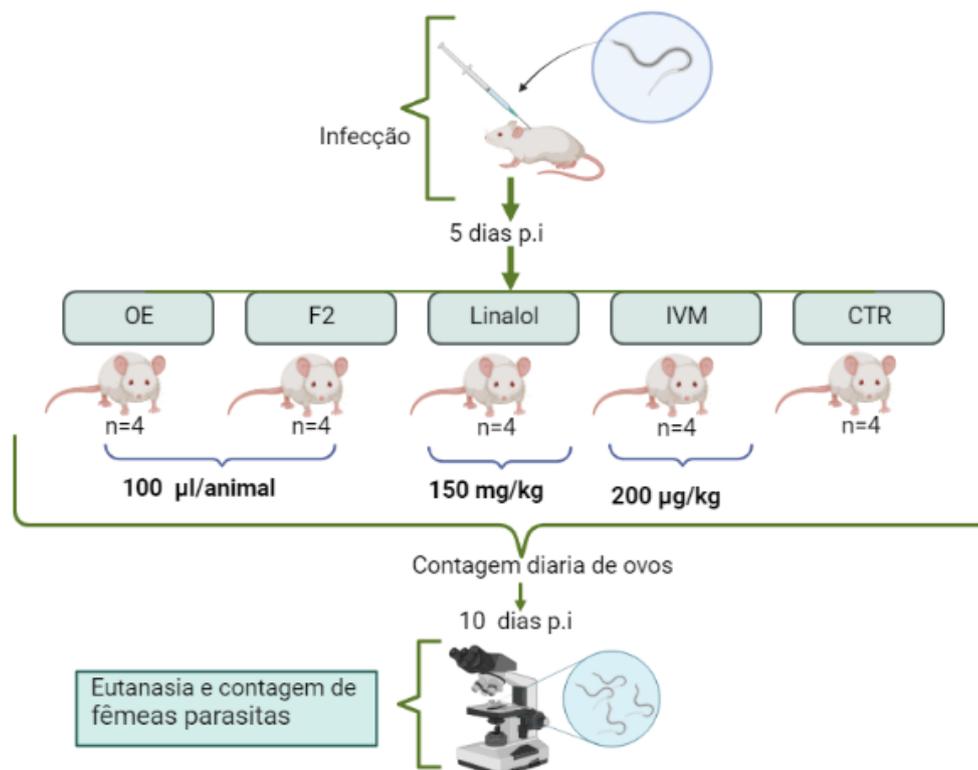
##### **4.9.2 Infecção dos camundongos**

As larvas filarioides foram obtidas por meio de cultura de fezes, seguindo o procedimento descrito no item 4.8.1.

Os camundongos foram infectados por injeção subcutânea na região dorsal, com aproximadamente 2000 larvas filarioides (L3) de *Strongyloides venezuelensis*.

##### **4.9.3 Tratamento de camundongos**

Após 3º dia pós-infecção (p.i), iniciou-se a avaliação das fezes dos camundongos, com a finalidade de contar os ovos de *Strongyloides venezuelensis*. A ovipostura começou a partir do 5º dia p.i. Nesse mesmo dia foram feitos os tratamentos dos camundongos. Os animais foram tratados com a administração oral em dose única de 100 µl/animal de OE e F2, 150 mg/kg de linalol, 200µg/kg de ivermectina e um grupo de animais não foi tratado. Cada grupo foi formado por 4 camundongos.



**Figura 7-** Desenho experimental do tratamento *in vivo* pós - infecção em dose única com os compostos F2, OE, 100µl/animal, linalol com 150 mg/kg<sup>-1</sup> e a ivermectina com 200µg/ Kg<sup>-1</sup> (Created with BioRender.com)

#### 4.9.4 Quantificação de ovos

As fezes dos camundongos, foram coletadas antes do tratamento (dia 5 p.i) e depois diariamente durante 5 dias após o tratamento. As fezes de cada grupo foram pesadas, homogeneizadas e contadas pela técnica modificada de Cornell-McMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939). A contagem de ovos nas fezes foi feita pelo conjunto de fezes dos camundongos de cada grupo tratado, foram feitas duas contagens por grupo e depois foi calculada a média.

#### 4.9.5 Quantificação de fêmeas

No 10º dia foram realizadas as eutanásias dos camundongos mediante deslocamento cervical. O intestino delgado de cada animal foi retirado, excisado e colocado em uma placa de Petri contendo solução salina 0,15M. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e posteriormente as fêmeas parasitas foram contadas em placas de Petri em lupa estereoscópica

binocular. A contagem de fêmeas foi feita de maneira individual por camundongo e depois foi calculada a média.

#### **4.10 Análise estatística**

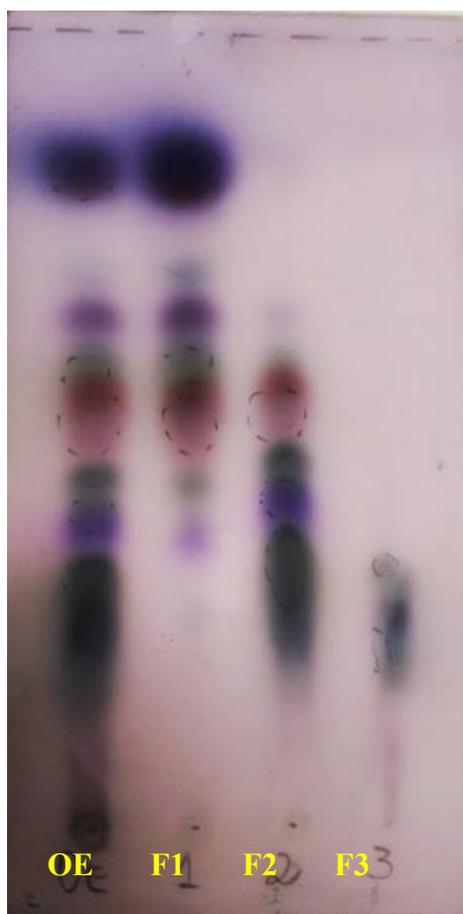
As diferenças entre os grupos foram feitas por análise de variância (two-way ANOVA, comparação múltipla de TUKEY) com auxílio do software GraphPad Prism 8.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise por Cromatografia de camada delgada (CCD).

A Figura 8, mostra as análises feitas para o óleo essencial bruto de *Salvia sagittata* e suas frações mediante CCD. Com esta técnica os compostos com diferentes propriedades se separam uns dos outros aproveitando as interações com o absorvente (fase estacionária) e a fase móvel. A fase móvel transporta os solutos através da fase estacionária. As moléculas se movem através da placa, e se separam dependendo da polaridade, os solutos mais polares se movem mais lentamente e permanecem perto da origem e os solutos menos polares se movem mais rápido e percorrem maiores distancias na placa (SANTIAGO; STROBEL, 2013)

Observa-se que a F1 apresenta compostos de média e baixa polaridade, F2 apresenta compostos de alta e média polaridade e a F3 tem compostos de alta polaridade.



**Figura 8-** CCD do OE de *Salvia sagittata* e das frações 1,2,3. Fase móvel: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), Fase estacionaria: sílica ( $\text{SiO}_2$ ). Revelador: Luz UV 254 e 366 nm e Solução de anisaldeído.

## 5.2 Identificação de analitos mediante cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG/EM)

Os compostos identificados no óleo essencial e frações de *Salvia sagittata* são apresentados na Tabela 1. As figuras 9 e 10 mostram os cromatogramas obtidos mediante a análise de CG/EM.

Foram identificados compostos da classe dos terpenos, principalmente monoterpenos, distribuídos em todas as frações. De um total de 52 compostos, 32 foram identificados, representando 72,07% do total do óleo essencial de *Salvia sagittata*. Dos compostos identificados, 22 foram identificados na F1, 15 compostos foram identificados na F2 e 9 compostos na F3.

O composto majoritário observado no cromatograma do óleo essencial foi o linalol (11,40%), ele também foi majoritário na fração 2 (33,96%) e o segundo mais abundante depois do alfa-terpineol (29,68%) na fração 3 com 23,4%. Os compostos majoritários da F1 foram o trans-cariofileno (12,34%) e beta-pineno (11,47%).

Uma quantidade significativa de compostos não foi identificada nas bases de dados pesquisadas (biblioteca de NIST11 e no livro de Adams,2007), estes representam uma porcentagem de 27,94 % no OE; 26,66 % da F1; 38,51% da F2; 12,5% da F3.

**Tabela 1-**Compostos detectados no óleo essencial e frações da *Salvia Sagittata*.

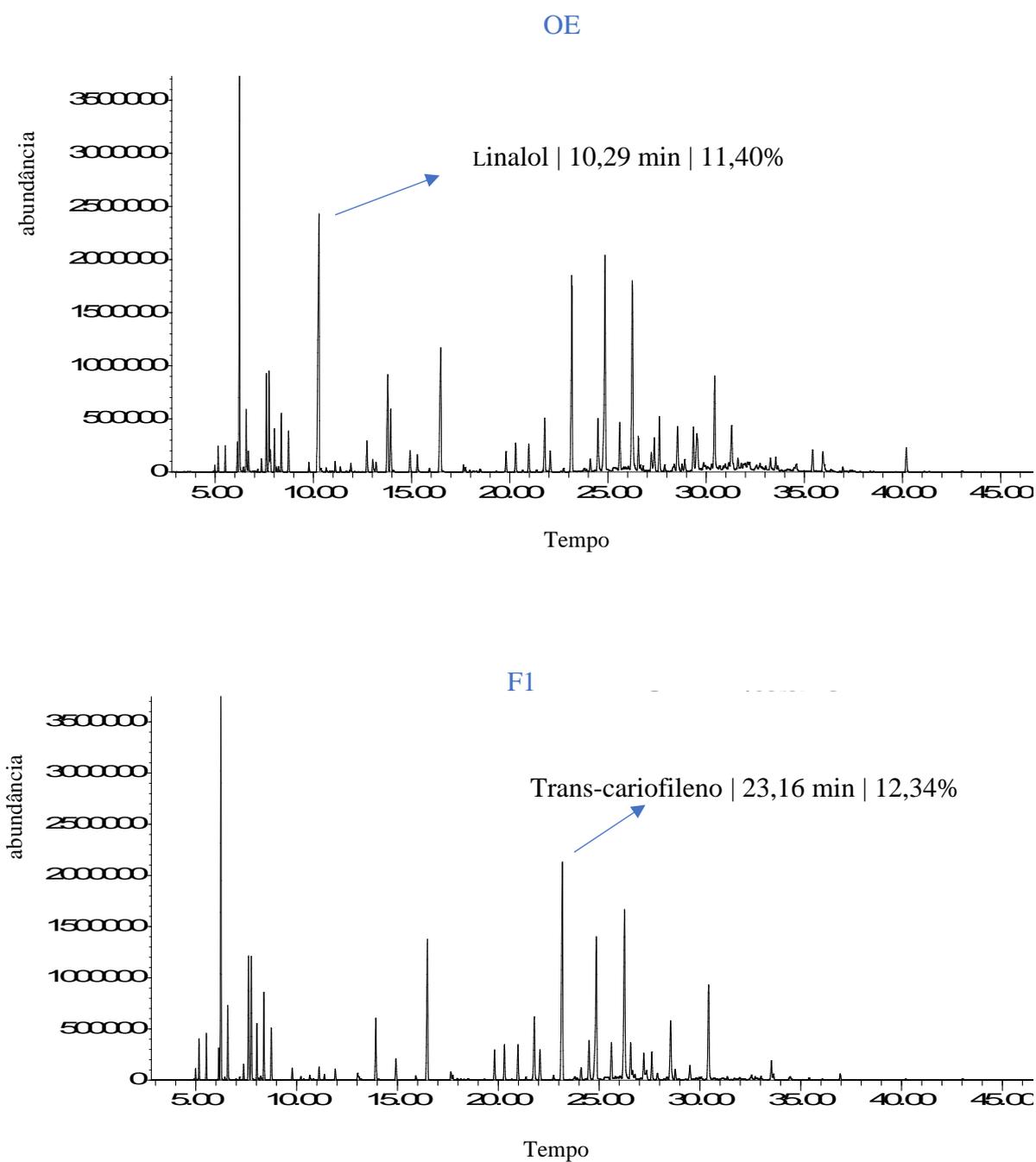
IR	COMPOSTO	OE (%)	F1(%)	F2(%)	F3(%)
932	alfa-pineno	0,47	1,04	-	-
946	canfeno	0,50	1,2	-	-
971	sabineno	0,61	0,91	-	-
975	beta-pineno	8,65*	11,47*	0,63	1,41
989	beta-mirceno	1,40	2,14	-	-
994	3-octanol	0,45	-	-	1,09
1015	alfa-terpineno	0,30	0,5	-	-
1023	para-cimeno	2,30	3,98	-	-
1027	limoneno	2,45	4,16	-	-
1029	1,8-cineol (eucaliptol)	0,51	-	0,48	-

1035	cis-beta-ocimeno	0,97	1,76	-	-
1045	trans-beta-ocimeno	1,39	2,89	-	-
1056	gama-terpineno	1,04	1,79	-	-
1102	Linalol	11,40*	-	33,96*	23,4*
1164	endo-borneol	0,99	-	1,29	6,79
1171	cis-pinocanfona	0,43	-	0,94	-
1176	4-terpinol	-	-	0,96	-
1190	alfa-terpineol	3,61	-	1,29	29,68*
1194	mirtenol	2,09	2,63	2,96	-
1218	beta-ciclocitral	0,66	0,92	0,79	-
1227	nerol (geraniol)	0,54	-	0,76	3,78
1255	acetato de linalila	5,50	6,53	3,58	13,68
1335	delta-elemeno	0,66	1,33	-	-
1347	alfa-acetato de terpenila	0,97	1,56	0,72	-
1363	M = 154	0,91	1,55	-	-
1383	M = 204	1,90	3,1	1,36	-
1389	beta-elemeno	0,72	1,41	-	-
1416	trans-cariofileno	7,34	12,34*	-	-
1445	M=220	-	-	4,57	-
1449	alfa-humuleno	2,17	2	-	-
1458	M = 218	9,17*	8,74	1,17	-
1477	germacreno D	1,63	1,7	-	-
1493	biciclogermacreno	8,48*	9,88*	-	-
1501	M = 204	0,99	1,49	-	-
1518	M = 204	0,68	0,84	-	-
1522	M = 220	1,32	-	-	-
1529	M = 220	1,92	1,31	5,63	-
1553	M = 218	2,06	3,63	1,17	-
1563	trans-nerolidol	-	-	1,92	-
1574	espatulenol	1,66	-	5,53	3,34
1578	óxido de cariofileno	2,18	0,76	6,06	4,35
1588	M = 222	-	-	1,36	-

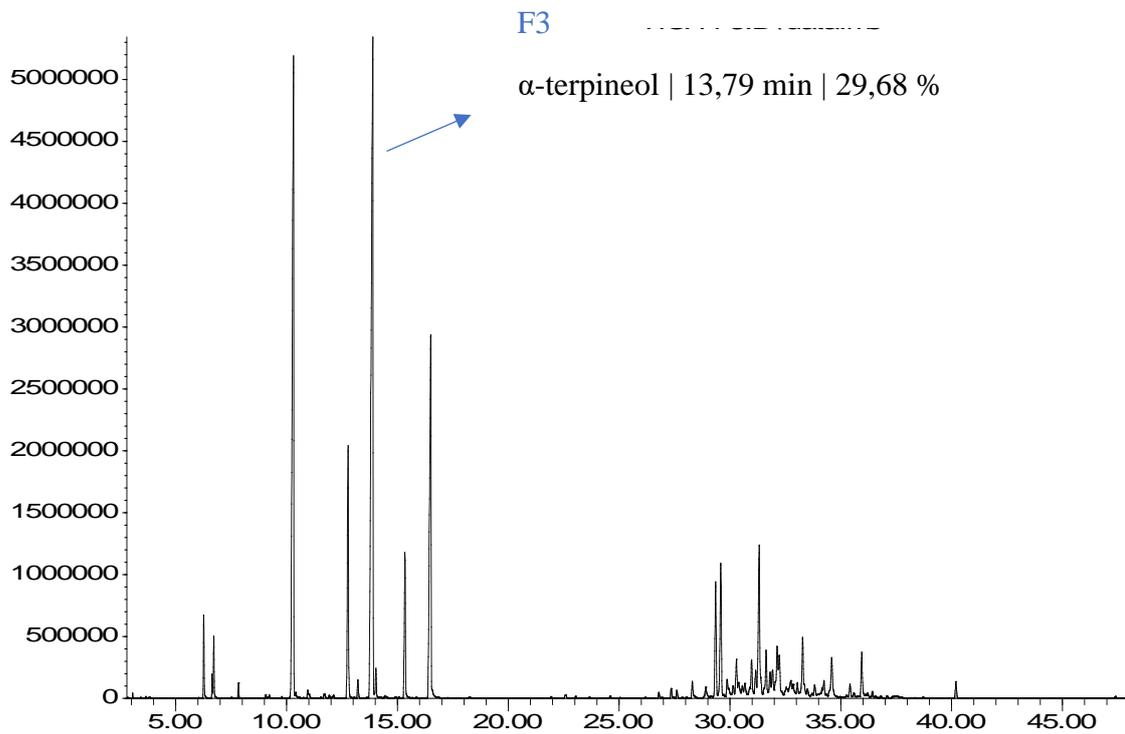
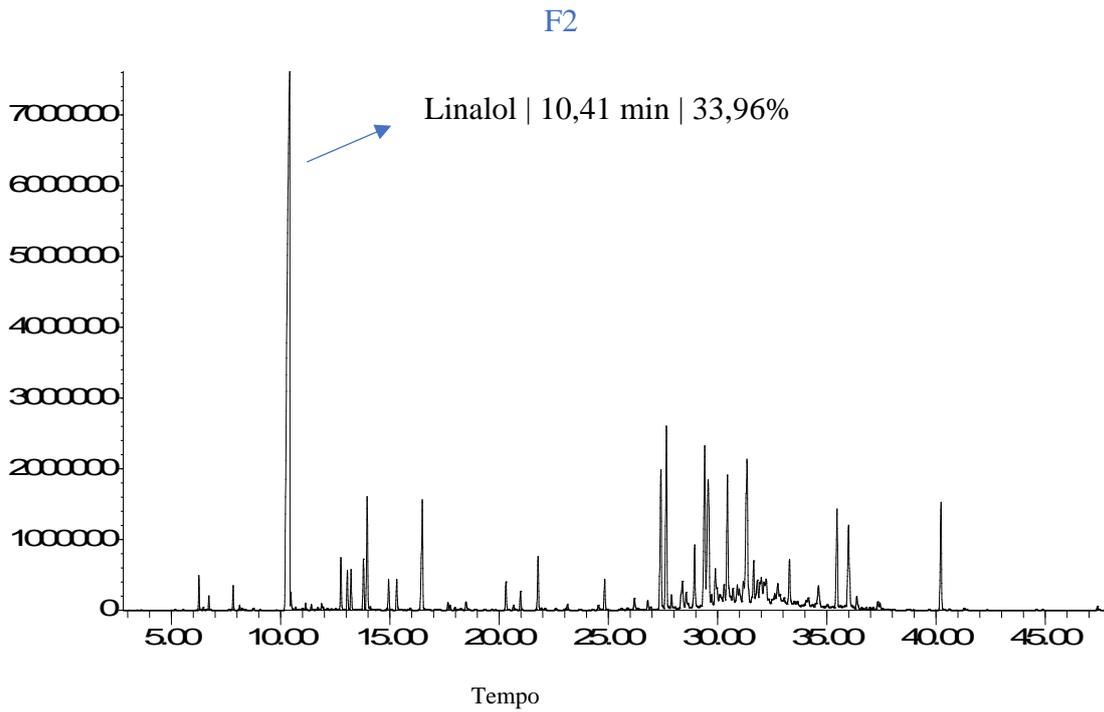
1602	M = 234	3,68	5,23	4,12	-
1625	M = 234	2,23	-	6,52*	5,49
1635	M = 220	-	-	1,19	1,36
1639	M = 220	-	-	0,6	-
1648	M = 222	-	-	-	0,73
1686	M = 216	0,42	0,77	1,37	1,93
1715	M = 220	-	-	-	1,62
1739	M = 234	0,81	-	2,98	-
1754	M = 220	0,96	-	3,32	1,37
1880	M = 216	0,89	-	3,15	-

Índice de retenção (IR). Porcentagem da área total integrada para o cromatograma de óleo essencial (OE), fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3). Massa molar (M) de compostos não identificados (20 compostos): M:154(1), M:204 (3), M:220 (7), M:218(2), M:222 (2), M:234(3), M:216(2).

\* Compostos majoritários que representam entre 30% - 50% do total de compostos do óleo essencial de *Salvia sagittata* e frações



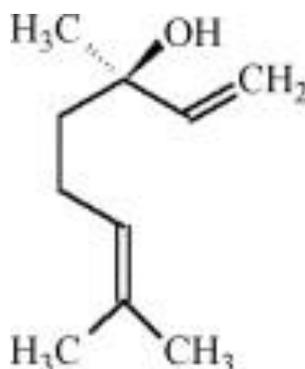
**Figura 9.** Cromatogramas gasosos obtidos do óleo essencial (OE) e fração 1 (F1) de *Salvia sagittata*. Compostos majoritários: OE, Linalol - F1, Trans-cariofileno.



**Figura 10.** Cromatogramas gasosos obtidos da Fração 2 (F2) e fração 3 (F3) do óleo essencial de *Salvia sagittata*. Compostos majoritários: F2, Linalol - F3,  $\alpha$ -terpinol

O composto majoritário do óleo essencial de *Salvia sagittata* neste estudo foi o linalol, ele também foi majoritário na F2 e o 2º mais abundante na F3. O linalol (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) é um monoterpenoide, presente nos óleos essenciais de muitas plantas aromáticas (GONÇALVES; MANSINHOS; ROMANO, 2020). É o principal composto de diferentes plantas como: *Croton cajucara* (ROSA et al., 2003), *Piper aduncum* (VILLAMIZAR et al., 2017), *Cinnamomum camphora* (YANG et al., 2014), *Coriandrum sativum* (HELAL et al., 2020), *Ocimum basilicum* (SOUSA et al., 2021).

A literatura mostra que o linalol é composto majoritário de algumas espécies de *Salvia* como a *Salvia sclarea* (38,6%-42,3%) (KUŽMA et al., 2009) ou *Salvia sharifii* (20,74%) (AGHAEI et al., 2022). Em contraste, nossos resultados diferem dos resultados obtidos em uma cromatografia anterior de *Salvia sagittata* feita para o projeto N° 075-2018-Fondecyt – BM-IADT-UM-Peru, onde o óleo essencial de *Salvia sagittata* apresentou o biciclogermacreno (12,16%) como o principal composto e o linalol apareceu apenas em uma porcentagem de 4,90% (dados ainda não publicados). Para ambas análises, a planta foi coletada no mesmo local, foram utilizadas as mesmas condições de extração, o mesmo órgão vegetativo (folhas frescas), mas a época de coleta da planta foi diferente. Ou seja, a composição química dos óleos essenciais pode variar drasticamente mesmo na mesma espécie vegetal. (BRUNETON, 2012) dependendo, como neste caso, a época em que as plantas foram coletadas. Tendo em conta essas variações, além da mistura complexa de compostos em um óleo essencial, torna-se importante realizar o fracionamento para se aproximar do metabólito ou metabólitos que intervêm na atividade biológica de um determinado óleo essencial.



**Figura 11.**Estrutura molecular do Linalol

### 5.3 Testes *in vitro*

#### 5.3.1 Atividade antiparasitária de OE de *S. sagittata* e frações *in vitro*.

Foram testadas seis concentrações de OE e frações nas concentrações de 0,004 µl/ml; 0,008 µl/ml; 0,016 µl/ml; 0,032 µl/ml; 0,64 µl/ml; 0,128 µl/ml com um tempo de incubação máximo de sete dias.

Os resultados obtidos demonstraram as mortalidades acumuladas das fêmeas parasitas ao longo do tempo (desde as 5h até 7 dias) nas diferentes concentrações de óleo essencial de *Salvia sagittata* e frações, tal como se observa na Figura 12

As Figuras 12a e 12b mostram que as fêmeas parasitas expostas as concentrações menores de 0,004 µl/ml e 0,008 µl/ml tiveram uma mortalidade menor de 20% durante todo o experimento. Portanto, estas concentrações apresentam atividade anti-helmíntica muito baixa.

Na Figura 12c (0,016µl/ml) as análises mostram que as fêmeas parasitas expostas a F2 apresentaram uma taxa de mortalidade 78%, bem superior as demais frações e OE bruto, que atingiram taxas de mortalidade menor de 17%.

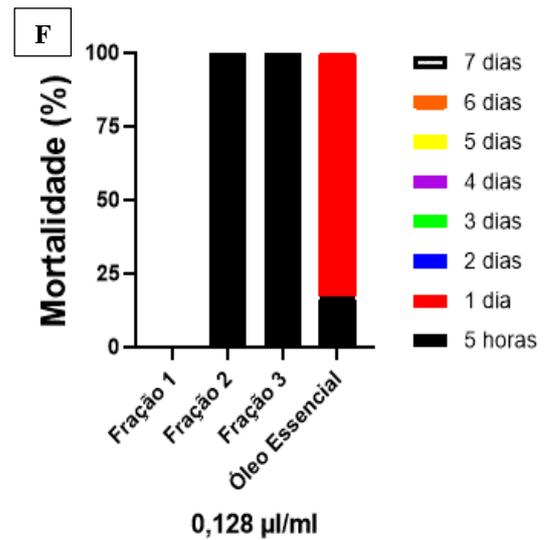
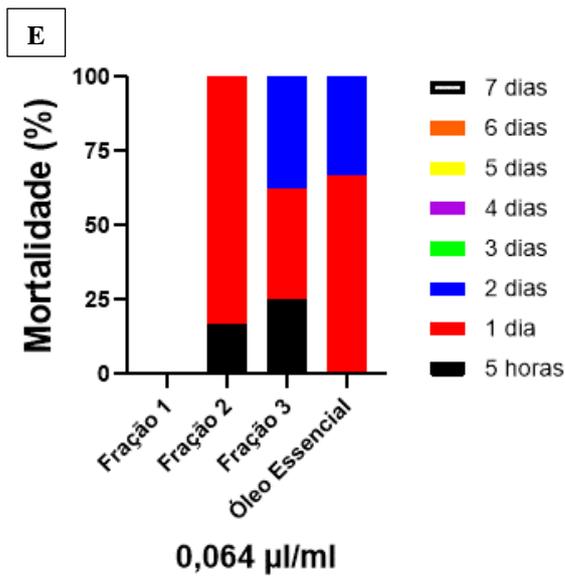
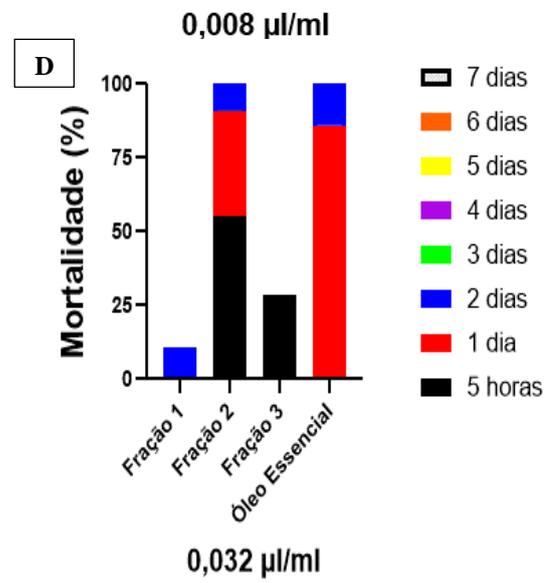
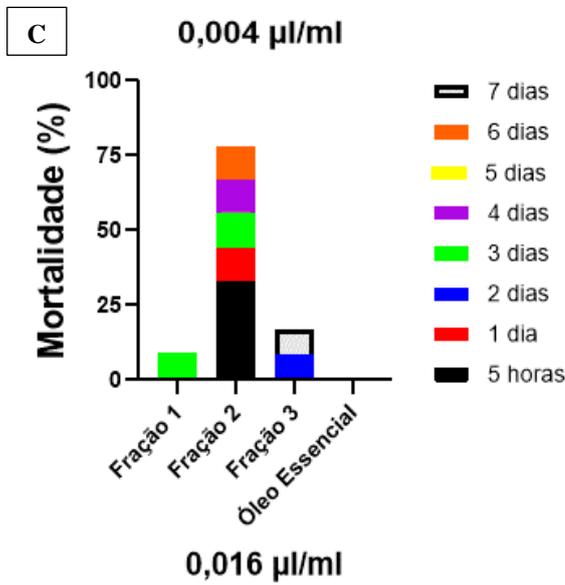
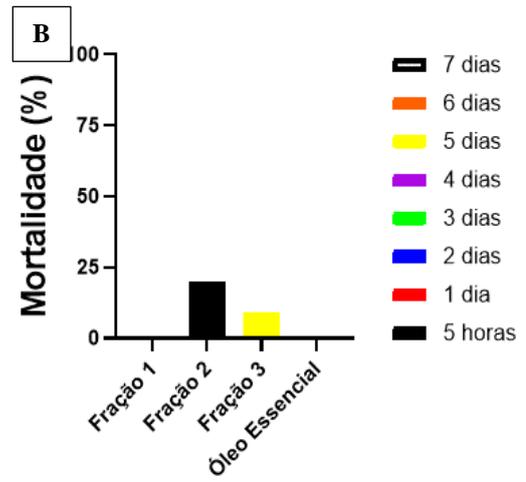
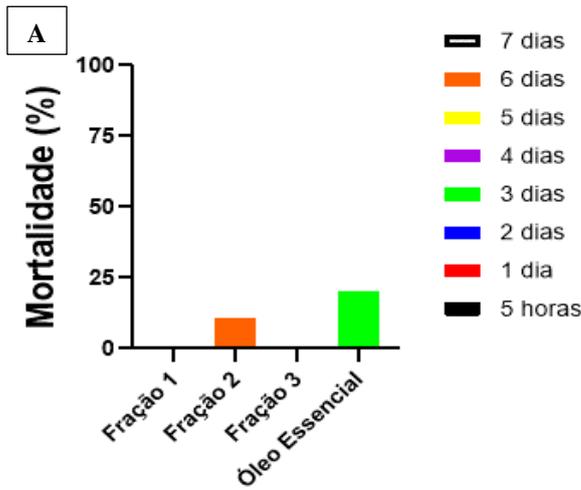
Na concentração de 0,032 µl/ml, somente a F2 e F3 tiveram ação na mortalidade das fêmeas parasitas durante as cinco primeiras horas com 55% e 29% respectivamente. A F2 e OE mataram 100% das fêmeas em até 48 horas. A F3 matou apenas 29% das fêmeas até o último dia de observação e a F1 matou menos de 11%. (Figura 12d).

A Figura 12e mostra que na concentração de 0,064 µl/ml a mortalidade das fêmeas não foi significativa dentro das primeiras cinco horas. Porém, a F2 teve uma mortalidade das fêmeas acumulada significativa de 100% em 24 horas. Dentro do mesmo período, a F3 e o OE apresentaram mortalidades das fêmeas similares e maiores a 50%. Aos dois dias, F3 e OE mataram a totalidade das fêmeas parasitas.

Finalmente, a Figura 12f mostra que nas cinco primeiras horas de incubação, a F2 e F3 mostraram potente atividade anti-helmíntica com 100% de mortalidade na concentração de 0,128 µl/ml. O OE matou 100% dos parasitas até as 24 horas na mesma concentração. Note-se que F2, F3 e OE mataram a totalidade das fêmeas parasitas durante as 24 horas de observação. Portanto, esta concentração apresentou a melhor atividade anti-helmíntica.

Das seis concentrações testadas, as maiores concentrações ( $>0,016 \mu\text{l/ml}$ ) mataram o maior número de parasitas entre 5h a 48h nas frações F2, F3 e OE, no entanto estas amostras em baixas concentrações mataram menor número de parasitas ou não mataram nenhum até o sétimo dia. A fração F2 foi a única que provocou mortalidade em todas as concentrações testadas e a fração F1 foi a que matou apenas 4,16 % de fêmeas em todas as concentrações, durante os 7 dias, portanto não foi selecionada para os testes *in vivo*.

A atividade anti-helmíntica observada nas frações F2, F3 e OE pode ser devido à ação exercida pelo linalol, metabólito majoritário em F2 e OE e que também aparece de forma abundante em F3, no entanto ausente em F1.



**Figura 12-** Gráficos da mortalidade acumulada ao longo do tempo em concentrações de 0,004 µl/ml (A); 0,008 µl/ml (B); 0,016 µl/ml (C); 0,032 µl/ml (D); 0,64 µl/ml (E); 0,128 µl/ml (F) para óleo essencial de *Salvia sagittata* em bruto (OE) e Frações F1, F2, F3.

Os óleos essenciais e as plantas em geral têm mostrado eficácia contra diversos microrganismos. Porém, há poucos estudos sobre a atividade anti-helmíntica *in vitro* contra *Strongyloides* spp. (MENDES et al., 2017). Dos trabalhos encontrados, a maioria foi realizado com as formas larvárias do parasita, como o trabalho de CARVALHO et al., (2020) em que avaliaram a atividade anti-helmíntica *in vitro* do extrato e óleo essencial de *Siparuna guianensis* contra ovos e larvas de *Strongyloides venezuelensis*. O trabalho de OLOUNLADÉ et al., (2012) também avaliou a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Zanthoxylum zanthoxyloides* e *Newbouldia laevis* contra a eclosão de larvas e migração de larvas de *Strongyloides ratti*. Todos as amostras exibiram atividade larvicida e ovicida *in vitro*, mas seria fundamental saber se exercem a mesma efetividade contra fêmeas parasitas.

Neste trabalho observou-se uma boa atividade anti-helmíntica *in vitro* frente as fêmeas parasitas de *Strongyloides venezuelensis* com duas frações (F1 e F2) e o óleo essencial de *Salvia sagittata*. A mortalidade atingiu até 100% de parasitas em um período de 5 a 48 horas, nas concentrações de 0,032 µl/ml; 0,064 µl/ml e 0,128 µl/ml. Nossos resultados, apresentaram semelhanças com os resultados obtidos por (BERNA et al., 2022), em que relataram mortalidades de até 100% de fêmeas de *Strongyloides venezuelensis* utilizando extratos de *Spondias mombin* em concentrações de 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml.

A atividade anti-*strongyloides in vitro* neste estudo ocorreu com as amostras que tinham linalol como composto principal. Portanto, presumimos que o linalol teria uma grande influência na ação biológica da *Salvia sagittata*. Não há evidências na literatura do uso de *Salvia* ou linalol para o tratamento da estrogiloidíase, mas há evidências de que o linalol por si só e misturado com outros componentes tem propriedades benéficas para a saúde (DUTRA et al., 2016). Estudos *in vitro* relatam a efetividade do linalol frente a *Plasmodium falciparum* (RODRIGUES GOULART et al., 2004) *Leishmania amazonensis* (ROSA et al., 2003), *Leishmania infantum chagasi* (DUTRA et al., 2016) *Trypanosoma brucei* (HOET et al., 2006) e *Trypanosoma cruzi* (VILLAMIZAR et al., 2017).

O linalol, também mostrou ter atividade moluscicida ( $LC_{50} = 0,25$  mg/L) frente *Oncomelania hupensis* (hospedeiro intermediário de *Schistosoma japonicum*) e atividade

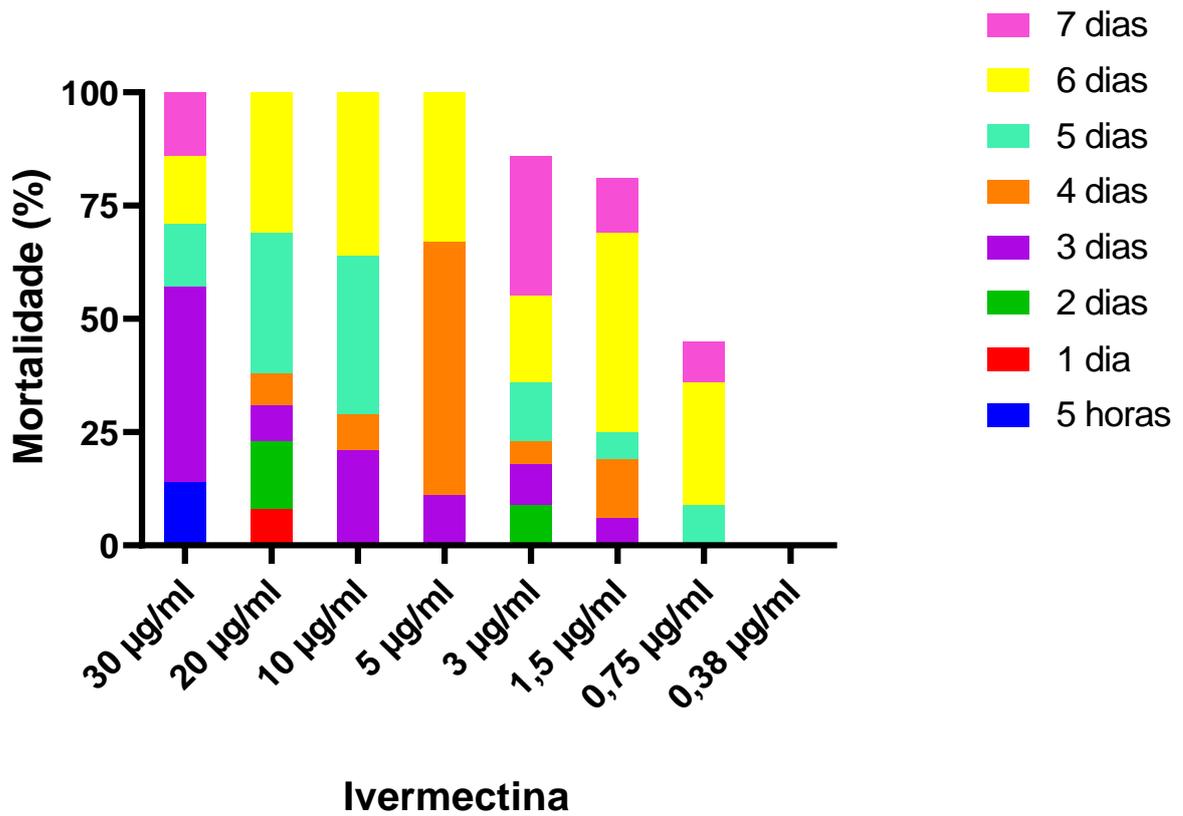
larvicida ( $LC_{50} = 0,07$  mg/L) frente a cercarias de *S. japonicum*. Nos caramujos gerou considerável dano no hepatopâncreas e brânquias, e nas cercarias gerou danos no tegumento (YANG et al., 2014).

A atividade nematicida do linalol também foi relatada, frente aos nematóides de ovinos *Haemonchus contortus* (HELAL et al., 2020; SOUSA et al., 2021), *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Trichostrongylus vitrinus* (HELAL et al., 2020) e contra filarias ao inibir a GST (Glutathione-S-transferase) de *Brugia malayi* (AZEEZ et al., 2012).

Os fortes indícios de que o linalol poderia possuir atividade anti-*strongyloides* segundo nossos testes *in vitro* e segundo a literatura antes relatada, nos levou a testá-lo como composto puro *in vivo* junto com os outros compostos com atividade *in vitro*.

### **5.3.2 Atividade antiparasitária da ivermectina *in vitro***

A Figura 13 mostra a mortalidade das fêmeas parasitas, ao longo do tempo, para o controle farmacológico, ivermectina. Foram avaliadas diferentes concentrações, durante 7 dias. Os resultados mostram que as concentrações maiores de 30  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  e 5  $\mu\text{g/ml}$  tiveram a mortalidade total dos vermes entre os 6 e 7 dias, enquanto as concentrações de 3 e 1,5  $\mu\text{g/ml}$  conseguiram matar entre 80 e 85 % dos vermes durante todo o experimento. A concentração de 0,75  $\mu\text{g/ml}$  não atingiu 50% de mortalidade das fêmeas até o sétimo dia e a concentração de 0,38  $\mu\text{g/ml}$ , não matou nenhum parasita.



**Figura 13-** Mortalidade de fêmeas de *Strongyloides venezuelensis* em diferentes concentrações de ivermectina.

Os agentes anti-helmínticos comercialmente disponíveis apresentam controvérsias. As taxas de cura são irregulares e os efeitos adversos geram desconforto na população. A ivermectina é o fármaco de escolha para o tratamento de *Strongyloides stercoralis* (NUTMAN, 2017).

Neste trabalho a ivermectina não apresentou uma boa atividade *in vitro* comparada com os compostos do óleo essencial e frações, mesmo quando as concentrações foram maiores. A mortalidade total dos parasitas aconteceu só entre o 6 e 7 dias de incubação em concentrações de 5-30 µg/ml. Ao comparar as concentrações utilizadas em nosso trabalho com as concentrações de ivermectina utilizadas em outros trabalhos estes não concordam: No trabalho de RIYONG et al., (2020), a ivermectina apresentou um  $LC_{99} = 0,072$  µg/ml contra larvas L3 de *Strongyloides stercoralis* em 24 horas, e em nosso caso a concentração de 0,38 µg/ml (foi a menor utilizada), não provocou mortalidade até sete dias de incubação. No caso dos trabalhos de BASTOS et al., (2017) e BERNA et al., (2022) que utilizaram concentrações maiores (50 µg/ml-100 µg/ml - 200 µg/ml) não atingiram mortalidade *in vitro* até 72 h de incubação. Porém, no atual estudo, nesse período de tempo, a concentração de 30 µg/ml de ivermectina matou em

torno de 50% de fêmeas parasitas e as demais concentrações atingiram mortalidades menores de 20% ou não apresentaram mortalidade. As divergências dos resultados no primeiro caso poderiam estar relacionadas com as diferenças de espécies de parasitas e o estágio parasitário. Ou seja, os autores testaram frente a larvas de *Strongyloides stercoralis* e neste estudo frente a parasitas adultos de *Strongyloides venezuelensis*. No segundo caso as divergências talvez estejam relacionadas com o diluente utilizado, nos trabalhos descritos as amostras foram solubilizadas em solução de PBS e neste estudo foi utilizado DMSO (dimetilsulfóxido). Pode ter acontecido que o DMSO utilizado neste trabalho solubilizou melhor as amostras.

#### **5.4 Testes *in vivo***

##### **5.4.1 Atividade anti-helmíntica *in vivo* de OE de *S. sagittata*, frações e composto majoritário.**

As amostras que apresentaram melhor atividade *in vitro* foram testados *in vivo* (OE e F2), além disso, foi testado o composto majoritário do óleo essencial de *S. sagittata*, linalol. Apesar da F3 ter apresentado bons resultados *in vitro*, não foi selecionado para testes *in vivo*, devido a menor atividade anti-helmíntica em relação as demais amostras elencadas.

Nos grupos tratados com OE e F2, os animais apresentaram leve reação ao tratamento. No dia seguinte do tratamento nesses dois grupos, os animais apresentavam pelos eriçados, com menor atividade física que o normal, mas se alimentavam normalmente. Um camundongo do grupo tratado com F2 apareceu prostrado, sendo o animal eutanasiado. Descobriu-se que o estômago e os intestinos estavam cheios de gás e o tamanho e peso do baço foi bem menor que o normal. Presume-se que as alterações no comportamento dos animais estejam relacionadas à alta carga parasitária apresentada nesses grupos, e com relação aos gases observados no estômago e intestino do animal eutanasiado, não foram encontrados estudos que relacionem essa característica à infecção com *Strongyloides*.

Nos grupos tratados com linalol e ivermectina, os animais toleraram bem o tratamento, o comportamento dos animais foi normal, assim como o grupo controle. Porém, no dia 9 após a infecção, um camundongo do grupo tratado com linalol foi encontrado morto, na necrópsia tudo parecia normal em relação aos órgãos (estômago, baço, fígado, intestinos), mas tinha uma alta carga parasitaria.

##### **5.4.2 Efeito anti-helmíntico na redução de ovos de *Strongyloides venezuelensis***

Os ovos de *Strongyloides venezuelensis* foram detectados pela primeira vez no dia 5 p.i. Estes resultados corroboram com os obtidos por SATO & TOMA (1990). O tratamento

foi feito no dia que a infecção foi confirmada, ou seja, o dia 5 p.i. Posteriormente se fez a avaliação diária mediante a contagem de ovos até o dia 10 p.i.

A Figura 14 mostra gráficos que apresentam as médias aritméticas das contagens de ovos por grama de fezes a partir do dia 5 p.i até o dia 10 p.i. As linhas horizontais superiores em cada gráfico, representam as diferenças estatísticas entre os grupos. Na Figura 15 se mostra a evolução em número de ovos por grama de fezes ao longo do tempo.

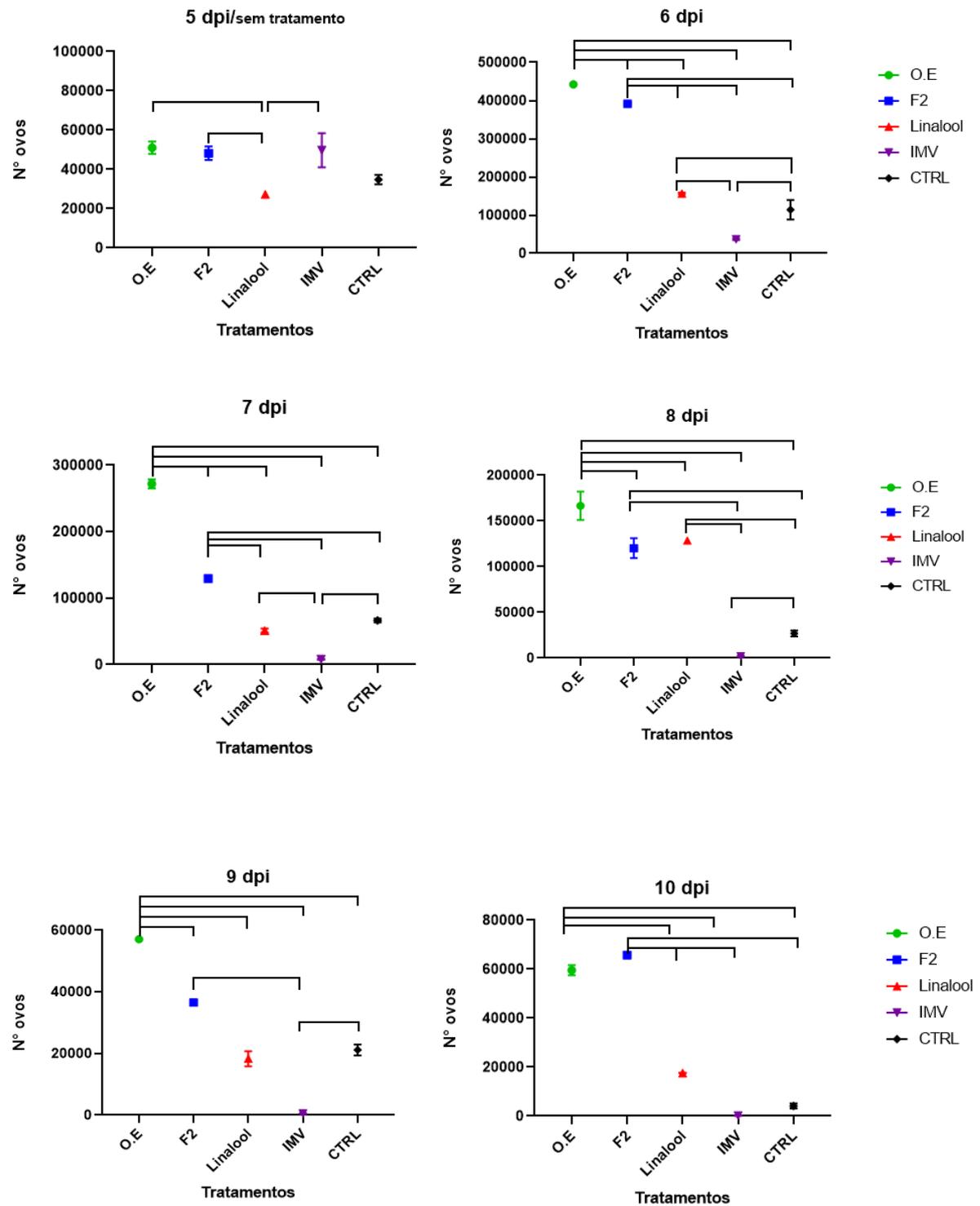
O experimento no dia 5 mostrou diferenças estatísticas em relação a OPG entre os grupos. O grupo que foi tratado com OE, F2 e ivermectina foram estatisticamente diferentes em relação ao linalol e estatisticamente equivalentes ao grupo controle.

No dia 6 p.i (dia 1 após do tratamento) o número de ovos aumentou exorbitantemente, nos grupos tratados com OE e F2. Nos outros grupos, exceto a ivermectina, também foi observado um aumento no número de ovos, porém menor. Neste dia as diferenças foram estatisticamente significativas entre todos os grupos. O observado no 6º dia foi semelhante aos dados obtidos por SATO & TOMA (1990), em que a produção máxima de ovos aconteceu no dia 6º pós-infecção.

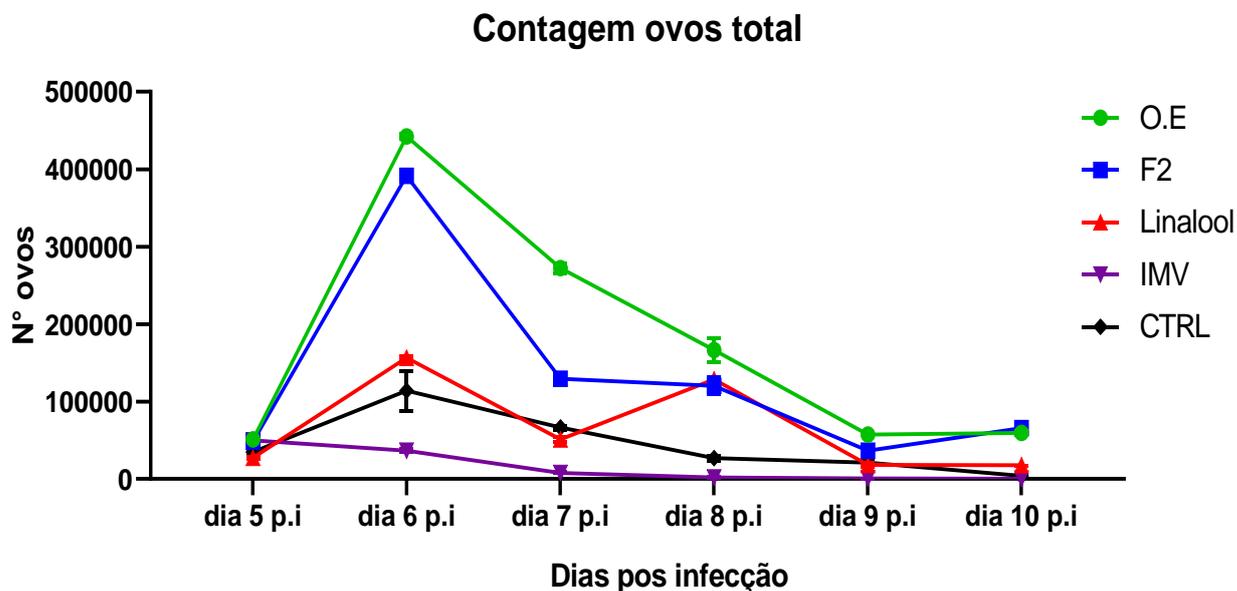
No dia 7 p.i aconteceu uma rápida diminuição em número de ovos para todos os tratamentos. Nos próximos dias (8 a 10), o número de ovos continuo decrescendo, exceto no linalol que flutuou entre o dia 5 ao dia 8 e depois no dia 9 ele mostrou uma queda que se manteve até o dia 10.

Ao final do experimento, no dia 10 p.i, o OE e F2, apresentaram uma elevada OPG, estes foram estatisticamente equivalentes entre eles e diferentes do resto dos compostos.

No caso do linalol, ivermectina e grupo controle apresentaram quantidade de ovos numericamente diferentes (Tabela 2), mas estatisticamente estas quantidades foram equivalentes entre si.



**Figura 14.** Número médio de ovos por grama de fezes de camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis* e tratados com F2 e OE de *Salvia sagittata* ( $100\mu\text{l}/\text{animal}$ ), Linalool ( $150\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ), ivermectina ( $200\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ). OE (óleo essencial), F2 (fração 2), IMV (ivermectina), CTRL (controle), dpi (dias pós-infecção). Linhas horizontais superiores representam diferenças estatísticas.



**Figura 15.** Número médio de ovos por grama de fezes de camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis* e tratados com F2 e OE de *Salvia sagittata* (100 $\mu$ l/animal), Linalool (150mg/kg<sup>-1</sup>), ivermectina (200 $\mu$ g/ kg<sup>-1</sup>). OE (óleo essencial), F2 (fração 2), IMV (ivermectina), CTRL (controle), p.i (pós infecção)

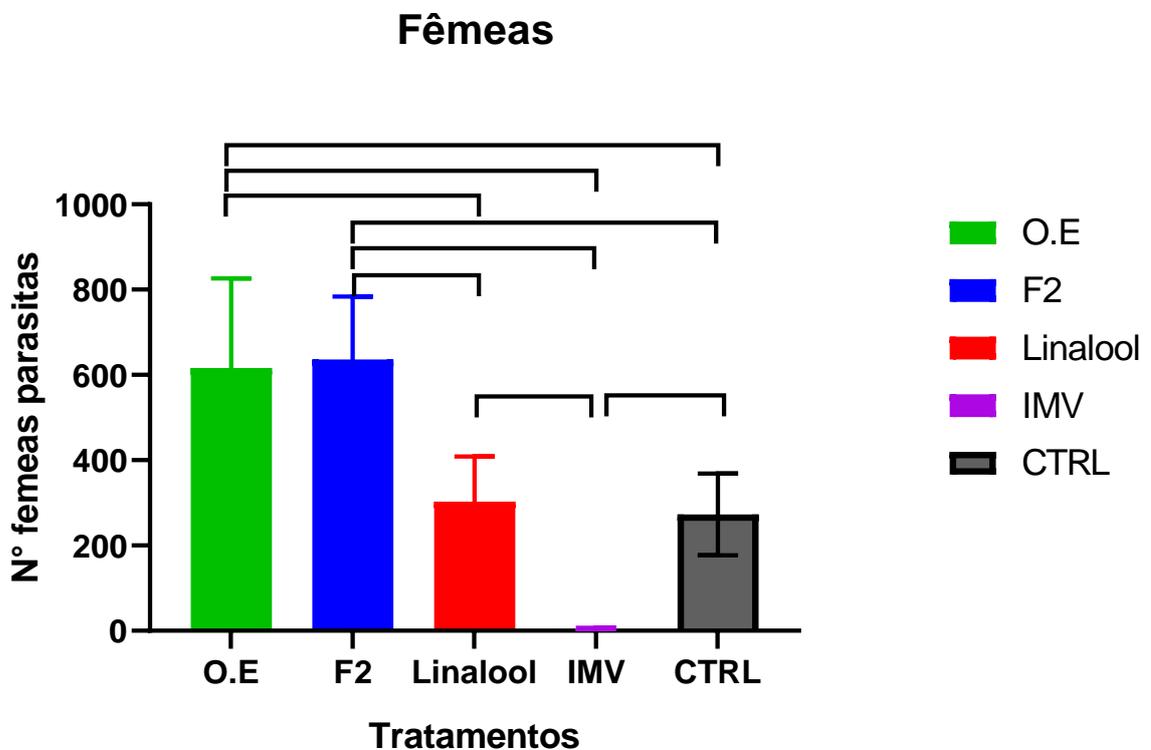
#### 5.4.3 Efeito anti-helmíntico na redução de fêmeas parasitas de *Strongyloides venezuelensis*

A Figura 16 mostra a média de fêmeas adultas parasitas recuperadas do intestino de camundongos no dia 10 p.i nos diferentes grupos de tratamento. As linhas horizontais na parte superior das barras representam as diferenças entre os grupos.

OE e F2 tiveram uma média de 600 fêmeas parasitas recuperadas do intestino dos camundongos, estes resultados foram estatisticamente diferentes com respeito ao linalol e grupo controle cuja média esteve em torno das 300 fêmeas parasitas e significativamente diferentes da ivermectina que apresentou uma média de apenas de 3 fêmeas parasitas.

A fecundidade das fêmeas parasitas, foi calculada entre as médias das razões de OPG no dia 10 p.i e o número de fêmeas parasitas. Como observa-se na Tabela 2, a fecundidade das fêmeas para os compostos de OE e F2 esteve em torno de 100 ovos/fêmea. No caso do linalol apresentou uma média 58 ovos/ fêmea, a ivermectina 50 ovos/fêmea e o grupo controle apresentou apenas 15. Comparando os resultados com o grupo controle, todos os compostos apresentaram maior postura de ovos. A baixa oviposição do grupo controle (Tabela 2), poderia ser devido à resposta imune do hospedeiro que torna as fêmeas menos fecundas. Como

explicam VINEY; KIKUCHI, (2017), as fêmeas parasitas *S. venezuelensis* escavam túneis através da mucosa do hospedeiro, com a ajuda da secreção oral de enzimas e moléculas do parasita. As imunoglobulinas do hospedeiro ligam-se a essas moléculas, que possuem características imunogênicas, bloqueando a boca e a região perioral da fêmea, evitando que o parasita consiga se alimentar, e como resultado as fêmeas se encolhem e tornam-se menos férteis.



**Figura 16.** Número médio de fêmeas adultas de *Strongyloides venezuelensis* recuperados do intestino delgado de camundongos tratados com F2 e OE de *Salvia sagittata* (100 $\mu$ l/animal), Linalool (150mg/kg<sup>-1</sup>), ivermectina (200 $\mu$ g/ kg<sup>-1</sup>). OE (óleo essencial), F2 (fração 2), IMV (ivermectina), CTRL (controle). Linhas horizontais superiores demonstram diferenças estatísticas entre os grupos.

**Tabela 2.** Fecundidade calculada entre a razão da média de ( $\bar{X}$ ) OPG (ovos por grama de fezes, 10<sup>o</sup> dia p.i) e média ( $\bar{X}$ ) fêmeas parasitas.

COMPOSTO	$\bar{X}$ OPG		$\bar{X}$ FEMEAS		F
OE	59550	A	616	A	97
F2	65750	A	636	A	103
LINALOL	17550	B	303	B	58
IVM	150	B	3	C	50
CTRL	4100	B	273	B	15

OPG= Ovos por grama de fezes, F= fecundidade, X = média, A e B letras distintas significam diferenças significativas.

Os resultados observados mostram que as amostras testadas não foram eficazes *in vivo* contra *Strongyloides venezuelensis*, comparado com a ivermectina. Longe de reduzir ou manter a carga parasitária, OE e F2 estimularam a produção de ovos e permitiram que um grande número de fêmeas parasitas sobreviesse até o dia 10. O linalol não apresentou redução significativa no número de ovos e no número de fêmeas parasitas com relação ao grupo controle.

O óleo essencial e a F2 são misturas de vários metabólitos, podendo ter ocorrido interação negativa entre os compostos, ou seja, um efeito antagônico. Os mecanismos responsáveis pelo antagonismo entre compostos não são bem conhecidos, sendo necessárias mais pesquisas a respeito (KATIKI et al., 2017). Estudos que contemplem o uso de diferentes misturas de metabólitos a fim de avaliar os efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos entre compostos, são necessários.

Ao comparar os resultados das amostras estudadas com o grupo controle, observa-se uma clara estimulação da parasitose por parte das mesmas. Muitos metabólitos do óleo essencial não foram identificados, mesmo sendo abundantes. É possível que algum composto ou mistura de compostos tenha exercido ação estimulante na produção de ovos e manutenção da parasitose, tal como acontece com os fitoecdisteroides (esteroides vegetais relacionados em estrutura ao hormônio esteroide invertebrado 20-hidroxicdisona). Os fitoecdisteroides são

constituintes de algumas plantas, um exemplo é a *Ajuaga turkestanica*, uma planta da família das lamináceas, que é conhecida por ter uma grande quantidade de ecdiesteroides (GUIBOUT et al., 2015). Um trabalho feito por DZITKO et al., (2015) demonstrou que os fitoecdisteroides promoveram a proliferação de *Toxoplasma gondi*, e inibiram a secreção de citocinas protetoras essenciais (IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10) em células imunitárias murinas envolvidas na morte deste parasita. Os ecdiesteroides também intervêm na aceleração do processo de muda de larvas de *Strongyloides stercoralis* (GENTA, 1992). Porém, neste caso, essa teoria perde consistência ao analisar a estrutura química dos fitoecdisteroides que são compostos que possuem entre 27 e 30 átomos de carbono, e segundo AZIZ et al., (2018) moléculas pesadas a partir de 20 carbonos (diterpenos) são difíceis de se extrair em óleos essenciais com a técnica de hidrodestilação, que foi a técnica utilizada neste estudo.

Alguns óleos essenciais têm a capacidade de inibir a fagocitose por neutrófilos (PÉREZ-ROSÉS et al., 2015). O óleo essencial de *Ocimum basilicum* “manjeriço” (lamiaceae), inibiu significativamente a capacidade fagocitária em diluições de 1:8000, 1:2000 e 1:1000, também reduziu o metabolismo do sistema oxidativo (COURRÈGES; BENENCIA, 2002). Esses mecanismos seriam os responsáveis pela atividade anti-inflamatória que muitos óleos essenciais possuem (COURRÈGES; BENENCIA, 2002; PÉREZ-ROSÉS et al., 2015). Acredita-se que o óleo de *Ocimum basilicum* inibe o aumento da permeabilidade vascular/capilar e a migração de leucócitos após estímulo inflamatório (COURRÈGES; BENENCIA, 2002; SINGH; D.K., 1999). Encontrou-se que o óleo de *Ocimum basilicum* (tem linalol entre seus principais compostos) possui atividade anti-inflamatória significativa contra carragenina e vários outros edemas de pata induzidos por mediadores, em ratos. Esse óleo, também inibiu o edema de pata induzido por ácido araquidônico e leucotrienos. Com base nesses relatos, SINGH, (1999) acredita que *O. basilicum* pode ser um agente anti-inflamatório útil que bloqueia as vias da ciclooxigenase e da lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico. Essas propriedades também são atribuídas a algumas espécies de *Salvia* (BONESI et al., 2017). óleo essencial de *Salvia officinalis* foi capaz de inibir entre 53 -78% a atividade da 5-lipoxigenase (MIGUEL et al., 2011). A 5-lipoxigenase é responsável pela formação de leucotrienos. Os leucotrienos desempenham um papel importante no controle da carga parasitária em camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*. A inibição da síntese de leucotrienos B<sub>4</sub> resulta em altas cargas de parasitas adultos e um alto número de ovos por grama de fezes (MACHADO et al., 2005).

O linalol pode ser um composto importante nestas reações. Estudos têm demonstrado que o linalol reduz o número de eosinófilos e macrófagos, inibe a produção de citocinas Th2 e IgE no soro de camundongos (KIM et al., 2019; MILLER; PRITTS, 2013). No entanto, outros compostos presentes nos óleos essenciais também podem estar envolvidos, como o caso do 1,8 cineol, que tem mostrado ser capaz de suprimir o metabolismo do ácido araquidônico e a produção de citocinas em monócitos humanos (MIGUEL et al., 2011). Isso poderia explicar porque neste estudo observa-se a maior quantidade de ovos e de fêmeas parasitas nas amostras misturadas em comparação com linalol puro que apresenta resultados de estimulação menor.

#### **5.4.4 Eficácia da ivermectina sobre o número de ovos e fêmeas parasitas de *Strongyloides venezuelensis***

A atividade da ivermectina *in vitro* parece não ser efetiva em comparação com os resultados *in vivo*. Provavelmente o parasita requer a interação com o hospedeiro para exercer a ação terapêutica.

Diferente do que aconteceu com os testes *in vitro*, a ivermectina *in vivo* obteve uma eficiência de 98,5% na redução de fêmeas parasitas, e teve o menor OPG. A redução de ovos foi estatisticamente significativa com respeito à outras amostras. Estes resultados eram esperados devido a ivermectina ser o fármaco com a maior eficácia conhecida frente a *Strongyloides*. A ivermectina é um dos fármacos antiparasitários mais importantes na medicina veterinária e humana. A ivermectina atua sobre os canais iônicos de cloreto ativados por glutamato, o que provoca paralisia e morte do parasita (LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017). Pessoas infectadas com *Strongyloides stercoralis* e tratadas com ivermectina tem mostrado taxas de cura entre 55 e 100% (MENDES et al., 2017).

A ivermectina é considerada o fármaco mais eficaz para tratar as infecções por *Strongyloides*, por apresentar menor efeito adverso e melhor taxa de cura com respeito aos benzimidazóis - tiabendazol e albendazol (HENRIQUEZ-CAMACHO et al., 2016; SUPUTTAMONGKOL et al., 2011). Porém, seu uso é restrito em alguns países Além disso não existe um consenso respeito dos intervalos e doses administradas (MENDES et al., 2017). O uso da ivermectina em doses altas pode ser prejudicial para o hospedeiro vertebrado (LAING; GILLAN; DEVANEY, 2017). A administração de 3 doses consecutivas de ivermectina (200µg/kg por dia) erradicou a totalidade de *Strongyloides venezuelensis* em ratos, porém

prejudicou a função e morfologia gastrointestinal dos animais (MENDONÇA et al., 2019). A ivermectina também está relacionada com doenças hepáticas (VEIT et al., 2006).

Fontes naturais, como as plantas, representam uma grande oportunidade para a descoberta de novas moléculas, que podem se tornar terapias eficazes contra doenças negligenciadas que causam tantos danos às pessoas, especialmente em países endêmicos como o caso do Brasil. São necessários mais estudos para entender melhor o modo de ação de óleos essenciais e seus principais compostos frente a diferentes parasitas e em diferentes estágios. As pessoas infectadas com o parasita *Strongyloides* deveriam ter muita precaução no uso de produtos terapêuticos, mesmo sendo derivados de plantas, devido a que estes poderiam estimular a parasitose, gerando hiperinfecção, disseminação e conseqüentemente a morte.

## 6 CONCLUSÕES

- O óleo essencial foi dividido em três frações mediante a cromatografia em coluna do tipo seca e a caracterização química de cada fração foi feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Os compostos identificados foram da classe dos terpenos, onde os principais para cada fração foram: F1= trans-cariofileno (12,34%) e beta-pineno (11,47%), F2= linalol (33,93%), F3= alfa-terpineol (29,68%) e linalol (23,4%).
- A F1 não apresentou atividade anti-*strongyloides in vitro* e foi excluída dos testes *in vivo*
- As amostras que tiveram o linalol como composto principal (OE, F2, F3), apresentaram a melhor atividade *in vitro* contra as fêmeas de *Strongyloides venezuelensis* nas concentrações de 0,032, 0,064 e 0,128 µl/ml durante 5 e 48 horas de exposição. No entanto, essas amostras, não exibiram atividade anti-*strongyloides in vivo*.
- Os camundongos tratados com OE e F2 apresentaram uma significativa produção em número de ovos por grama de fezes (OPG) e uma significativa recuperação de fêmeas parasitas em relação ao grupo controle.
- O linalol puro *in vivo* não apresentou resultados promissores, teve uma evolução um tanto semelhante ao grupo controle.
- A ivermectina atuou eficientemente *in vivo*, matando 98,5% das fêmeas parasitas de *Strongyloides venezuelensis*. *In vitro*, a ivermectina matou 100% de fêmeas parasitas apenas entre os 6 e 7 dias nas concentrações de 5-30 µg/ml.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. **Identification of essential oil components by Gas chromatography/ mass spectrometry**. USA: Allured Publishing Corporation., 2007.

AGHAEI, Z.; ALIZADEH, A.; HONARVAR, M.; BABADAEI SAMANI, R. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Salvia sharifii* Rech. & Esfand from Iran. **Natural Product Research**, v. 36, n. 10, p. 2585–2590, 19 maio 2022.

ALTINDAL, D.; ALTINDAL, N. Sage (*Salvia officinalis*) oils. *In: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 715–721.

ARAÚJO, R. N.; GONTIJO, N. F.; GUARNERI, A. A.; GONTIJO, A. F.; SOARES, A. C.; PEREIRA, M. H. **Electromyogram of the Cibarial Pump and the Feeding Process in Hematophagous Hemiptera**. Rijeka: InTech, 2011. 212 p.

ARNALSCHNEBELEN, B.; HADJIMINAGLOU, F.; PEROTEAU, J.; RIBEYRE, F.; DEBILLERBECK, V. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. **International Journal of Aromatherapy**, v. 14, n. 4, p. 192–197, 2004.

AZEEZ, S.; BABU, R. O.; AYKKAL, R.; NARAYANAN, R. Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of filarial nematodes. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 1, p. 151–163, 2012.

AZIZ, Z. A. A.; AHMAD, A.; SETAPAR, S. H. M.; KARAKUCUK, A.; AZIM, M. M.; LOKHAT, D.; RAFATULLAH, M.; GANASH, M.; KAMAL, M. A.; ASHRAF, G. M. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100–1110, 2018.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev. 2008.

BARROS, N.; MONTES, M. Infection and Hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*: Clinical Presentation, Etiology of Disease, and Treatment Options. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 4, p. 223–228, 2014.

BASTOS, L. A. D.; UETA, M. T.; GARCIA, V. L.; OLIVEIRA, R. N. de; PINTO, M. C.; MENDES, T. M. F.; ALLEGRETTI, S. M. Ethanolic extracts of different fruit trees and their activity against *Strongyloides venezuelensis*. **International Journal of Modern Biological Research**, v. 5, n. 5, p. 1–7, 2017.

BERNA, P.; MANUEL, T.; MENDES, F.; LUCIA, V.; NUNES, R.; OLIVEIRA, D.; BASTOS, L.; MARQUES, S. The effect of *Spondias mombin* L. against *Strongyloides venezuelensis*: An in vitro approach. **Acta Tropica**, v. 234, n. 106617, 2022.

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; ANGHEBEN, A.; BOSCOLO, M.; ANSEMI, M.; MAROCCO, S.; MONTEIRO, G.; GOBBO, M.; BISOFFI, G.; GOBBI, F. Randomized clinical trial on ivermectin versus thiabendazole for the treatment of strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, p. 3–8, 2011.

BLANTON, R. Handbook of Helminthiasis for Public Health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 674–675, abr. 2007.

BONESI, M.; LOIZZO, M. R.; ACQUAVIVA, R.; MALFA, G. A. Anti-inflammatory and Antioxidant Agents from *Salvia* Genus (Lamiaceae): An Assessment of the Current State of Knowledge. **Bentham Science**, n. 16, p. 70–86, 2017.

BRELOER, M.; ABRAHAM, D. *Strongyloides* infection in rodents : immune response and immune regulation. **Parasitology (2017)**, p. 295–315, 2017.

BRUNETON, J. Principles and Practice of Phytotherapy. *In*: LIVINGSTONE, C. **Principles and Practice of Phytotherapy: Modern herbal medicine** K. Bone, S. Mills. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 82.

BUONFRATE, D.; BISANZIO, D.; GIORLI, G.; ODERMATT, P.; FÜRST, T.; GREENAWAY, C.; FRENCH, M.; REITHINGER, R.; GOBBI, F.; MONTRESOR, A.; BISO, Z. The Global Prevalence of *Strongyloides stercoralis* Infection. **Pathogens**, p. 1–9, 2020.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3–4, p. 288–294, set. 2007.

CARVALHO, V. F.; RAMOS, L. D. A.; DA SILVA, C. A.; NEBO, L.; MORAES, D.; DA SILVA, F. F. A.; DA COSTA, N. C. A.; RODRIGUES JUNIOR, R. D. O.; DE SOUZA, L. F.; RODRIGUES, R. M. In vitro anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Helminthology**, v. 94, 2020.

CHÁVEZ-SOTO, D. Y.; VÁZQUEZ-ARMIJO, J. F.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. C.; ESPARZA-JIMÉNEZ, S.; LÓPEZ-AGUIRRE, D. Los aceites esenciales en los pequeños rumiantes y su efecto sobre la productividad. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 24, n. 70, p. 1–10, 2021.

CHEN, W.; CHEN, G. Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge): A Prospective Healing Sage for Cardiovascular Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 34, 18 jan. 2018.

COURRÈGES, M. C.; BENENCIA, F. In vitro antiphagocytic effect of basil oil on mouse macrophages. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 369–374, 2002.

DE-LA-CRUZ, H.; VILCAPOMA, G.; ZEVALLOS, P. A. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 284–294, maio 2007.

DUTRA, F. L.; OLIVEIRA, M. M.; SANTOS, R. S.; SILVA, W. S.; ALVIANO, D. S.; VIEIRA, D. P.; LOPES, A. H. Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum chagasi* within macrophages. **Acta Tropica**, v. 164, p. 69–76, dez. 2016..

DZITKO, K.; GRZYBOWSKI, M. M.; PAWEŁCZYK, J.; DZIADEK, B.; GATKOWSKA, J.; STĄCZEK, P.; DŁUGOŃSKA, H. Phytoecdysteroids as modulators of the *Toxoplasma gondii* growth rate in human and mouse cells. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 422, 15 dez. 2015.

EBRAHIMI, S.; ZIMMERMANN, S.; ZAUGG, J.; SMIESKO, M.; BRUN, R.; HAMBURGER, M. Abietane Diterpenoids from *Salvia sahendica* – Antiprotozoal Activity and Determination of Their Absolute Configurations. **Planta Medica**, v. 79, n. 02, p. 150–156, 8 jan. 2013.

FADLADDIN, Y. A. J. Antischistosomal Activity of *Origanum majorana*, *Ziziphus spinachristi*, and *Salvia fruticosa* Plant Extracts on Hamster Infected with *Schistosoma haematobium*. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–15, 13 jun. 2021.

GALVÃO, L. C. D. C.; FURLETTI, V. F.; BERSAN, S. M. F.; DA CUNHA, M. G.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. De; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; FIGUEIRA, G. M.; TEIXEIRA DUARTE, M. C.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

G. GEARY, T.; MORENO, Y. Macrocyclic Lactone Anthelmintics: Spectrum of Activity and Mechanism of Action. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 866–872, 2012.

GANN, P. H.; NEVA, F. A.; GAM, A. A. A randomized trial of single- and two-dose ivermectin versus thiabendazole for treatment of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 169, n. 5, p. 1076–1079, 1994.

GAO, Z.; XU, H.; SHI, D.; WEN, C.; LIU, B. Analysis on outcome of 5284 patients with coronary artery disease: The role of integrative medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 2, p. 578–583, jun. 2012.

GENTA, R.; GROVE, D. **Strongyloides stercoralis infections in animals. In: Strongyloidiasis, a Major Roundworm Infection of Man.** London: Francis & Taylor, 1989. 251–269 p.

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: A new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 345–355, 1992.

GHOSH, K.; GHOSH, K. Strongyloides stercoralis septicaemia following steroid therapy for eosinophilia: report of three cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 11, p. 1163–1165, nov. 2007.

GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with Strongyloides venezuelensis. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 205–208, 2012.

GONÇALVES, S.; MANSINHOS, I.; ROMANO, A. Aromatic plants: A source of compounds with antioxidant and neuroprotective effects. *In: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases.* [s.l.] Elsevier. p. 155–173.2020.

GONZALES DE LA CRUZ, M.; BALDEÓN MALPARTIDA, S.; BELTRÁN SANTIAGO, H.; JULLIAN, V.; BOURDY, G. Hot and cold: Medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1093–1117, set. 2014.

GORDON, H. .; WHITLOCK, H. . **A new Technique for Counting Nematode Eggs in Sheep Faeces****Journal of Helminthology**1939.

GREAVES, D.; COGGLE, S.; POLLARD, C.; ALIYU, S. H.; MOORE, E. M. Strongyloides stercoralis infection. **BMJ (Online)**, v. 347, n. 7919, p. 1–6, 2013.

GUIBOUT, L.; MAMADALIEVA, N.; BALDUCCI, C.; GIRAULT, J.-P.; LAFONT, R. The

minor ecdysteroids from *Ajuga turkestanica*. **Phytochemical Analysis**, v. 26, n. 5, p. 293–300, set. 2015.

HALL, A.; CONWAY, D. J.; ANWAR, K. S.; RAHMAN, M. L. *Strongyloides stercoralis* in an urban slum community in Bangladesh: factors independently associated with infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 527–530, set. 1994.

HELAL, M. A.; ABDEL-GAWAD, A. M.; KANDIL, O. M.; KHALIFA, M. M. E. Nematocidal Effects of a Coriander Essential Oil and Five Pure Principles on the Infective Larvae of Major Ovine Gastrointestinal Nematodes In Vitro. **pathogens**, v. 9, 2020.

HENRIQUEZ-CAMACHO, C.; GOTUZZO, E.; ECHEVARRIA, J.; WHITE JR, A. C.; TERASHIMA, A.; SAMALVIDES, F.; PÉREZ-MOLINA, J. A.; PLANA, M. N. Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 18 jan. 2016.

HOET, S.; STÉVIGNY, C.; HÉRENT, M.-F.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal Compounds from the Leaf Essential Oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, v. 72, n. 05, p. 480–482, fev. 2006.

IGRA-SIEGMAN, Y.; RAJENDRA, K.; SEN, P.; KAMINSKI, Z. C.; LOURIA, D. B. Syndrome of Hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*. **Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 397–407, 1981.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813–829, 1 maio 2003.

KATIKI, L. M.; BARBIERI, A. M. E.; ARAUJO, R. C.; VERÍSSIMO, C. J.; LOUVANDINI, H.; FERREIRA, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 243, n. December 2016, p. 47–51, 2017.

KEISER, J.; HÄBERLI, C. Evaluation of Commercially Available Anthelmintics in Laboratory Models of Human Intestinal Nematode Infections. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1177–1185, 2021.

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. Strongyloides stercoralis in the Immunocompromised Population. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 208–217, 2004.

KIM, M.-G.; KIM, S.-M.; MIN, J.-H.; KWON, O.-K.; PARK, M.-H.; PARK, J.-W.; AHN, H. I.; HWANG, J.-Y.; OH, S.-R.; LEE, J.-W.; AHN, K.-S. Anti-inflammatory effects of linalool on ovalbumin-induced pulmonary inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105706, set. 2019.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; HANLIDOU, E. Herbs of the Labiatae. *In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Thessaloniki: Elsevier, 2003. p. 3082–3090.

KUŹMA, Ł.; KALEMBA, D. C. and B. A. of E. O. from *S. sclarea* P. R. in vitro; RÓŹALSKI, M.; RÓŹALSKA, B.; KRAJEWSKA, M. W.-S. U.; WYSOKIŃSKAŁUKASZ, H. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from *Salvia sclarea* Plants Regenerated in vitro. **Molecules**, p. 1438–1447, 2009.

LAING, R.; GILLAN, V.; DEVANEY, E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 6, p. 463–472, jun. 2017.

LOJA HERRERA, B. **Contribución al estudio florístico de la Provincia de Concepción,(Junín): Dicotiledoneas**. 2002. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2002.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes Play a Role in the Control of Parasite Burden in Murine Strongyloidiasis. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3892–3899, 2005.

MARIDAS, M.; BRITO, A. J. De. Origins of Plant Derived Medicines. **Ethnobotanical Leaflet**, v. 1, n. June, p. 373–387, 2008.

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, A. F. T.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. V. Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in Lewis rats: Comparison of histological analyses and PCR. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 334–339, 2011.

MCKELLAR, Q. A.; JACKSON, F. Veterinary anthelmintics: Old and new. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 456–461, 2004.

MENDES, T.; MINORI, K.; UETA, M.; MIGUEL, D. C.; ALLEGRETTI, S. M. Strongyloidiasis Current Status with Emphasis in Diagnosis and Drug Research. **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, 2017.

MENDONÇA, J. C.; GAMA, L. A.; HAUSCHILDT, A. T.; CORÁ, L. A.; AMÉRICO, M. F. Gastrointestinal effects of ivermectin treatment in rats infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Acta Tropica**, v. 194, p. 69–77, jun. 2019.

MIGUEL, G.; CRUZ, C.; FALEIRO, M. L.; SIMÕES, M. T. F.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. *Salvia officinalis* L. essential oils: Effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. **Natural Product Research**, v. 25, n. 5, p. 526–541, 2011.

MILLER, S. G.; PRITTS, T. A. Linalool: a novel natural anti-inflammatory agent? **Journal of Surgical Research**, v. 185, n. 1, p. e69–e70, nov. 2013.

NUTMAN, T. B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. p. 263–273, 2017.

OLOUNLADÉ, P. A.; AZANDO, E. V. B.; HOUNZANGBÉ-ADOTÉ, M. S.; HA, T. B. T.; LEROY, E.; MOULIS, C.; FABRE, N.; MAGNAVAL, J. F.; HOSTE, H.; VALENTIN, A. In vitro anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 4, p. 1427–1433, 29 abr. 2012.

OLSEN, A.; VAN LIESHOUT, L.; MARTI, H.; POLDERMAN, T.; POLMAN, K.; STEINMANN, P.; STOTHARD, R.; THYBO, S.; VERWEIJ, J. J.; MAGNUSSEN, P. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 10, p. 967–972, 2009.

PAN, S.-Y.; ZHOU, S.-F.; GAO, S.-H.; YU, Z.-L.; ZHANG, S.-F.; TANG, M.-K.; SUN, J.-N.; MA, D.-L.; HAN, Y.-F.; FONG, W.-F.; KO, K.-M. New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–25, 2013.

PAULA, F. M.; SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; GOTTARDI, M.; CORRAL, M. A.; GRYSCHKEK, R. C. B.; CHIEFFI, P. P. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 55, n. 2, p. 141–143, 2013.

PÉREZ-ROSÉS, R.; RISCO, E.; VILA, R.; PEÑALVER, P.; CAÑIGUERAL, S. Effect of some essential oils on phagocytosis and complement system activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1496–1504, 2015.

PUTHIYAKUNNON, S.; BODDU, S.; LI, Y.; ZHOU, X.; WANG, C.; LI, J.; CHEN, X. Strongyloidiasis—An Insight into Its Global Prevalence and Management. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014.

QI, H.; WANG, W. X.; DAI, J. L.; ZHU, L. In vitro anthelmintic activity of *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 3–

4, p. 223–227, 2015.

RIYONG, D.; SANGKHANTREE, C.; CHAMPAKAEW, D.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P.; JUNKUM, A.; CHAITHONG, U.; WANNASAN, A.; YASANYA, T.; SOMBOON, P.; PITASAWAT, B. Nematocidal effect of *Piper retrofractum* Vahl on morphology and ultrastructure of *Strongyloides stercoralis* third-stage infective larvae. **Journal of Helminthology**, 2020.

RODRIGUES GOULART, H.; KIMURA, E. A.; PERES, V. J.; COUTO, A. S.; AQUINO DUARTE, F. A.; KATZIN, A. M. Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2502–2509, jul. 2004.

ROSA, M. do S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. de A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1895–1901, jun. 2003.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 1–8, 1954.

SANTIAGO, M.; STROBEL, S. Thin Layer Chromatography. *In*: LORSCH, J. **Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate**. New Haven: Elsevier Ltd, 2013. p. 303–324.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 57–62, 1990.

SCHAD, G. A. **Morphology and life history of *Strongyloides stercoralis*. In *Strongyloidiasis a major roundworm infection of man***. London: Taylor and Francis., 85–104 p. 1989

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H.; VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. e2288, 11 jul. 2013.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 57, n. SUPPL. 1, p. S3, 2008.

SCHNITZLER, P. Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. **Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 1–7, 2019.

SINGH, S. Mechanism of action of antiinflammatory effect of fixed oil of *Ocimum basilicum* Linn. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, n. 3, p. 248–252, 1999.

SINGH, S.; D.K., M. Effect of *Ocimum sanctum* fixed oil on vascular permeability and leucocytes migration. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, n. 11, p. 1136–1138, 1999.

SOLECKI, R. S. Shanidar IV, a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq. **Science**, v. 190, n. 4217, p. 880–881, 28 nov. 1975.

SOUSA, A. I. P.; SILVA, C. R.; COSTA-JÚNIOR, H. N.; SILVA, N. C. S.; PINTO, J. A. O.; BLANK, A. F.; SOARES, A. M. S.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Essential oils from *Ocimum basilicum* cultivars: Analysis of their composition and determination of the effect of the major compounds on *Haemonchus contortus* eggs. **Journal of Helminthology**, n. May, 2021.

SPEARE, P.; GROVE, D. . **Identification of species of Strongyloides, Strongyloidiasis – a major roundworm infection of man**. London: Taylor & Francis. 11–83 p. 1989.

SUPUTTAMONGKOL, Y.; PREMASATHIAN, N.; BHUMIMUANG, K.; WAYWA, D.

Efficacy and Safety of Single and Double Doses of Ivermectin versus 7-Day High Dose Albendazole for Chronic Strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. 1–7, 2011.

TAIRA, N.; URA, S. Sudden death in calves associated with *Strongyloides papillosus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 39, n. 3–4, p. 313–319, 1991.

THAMSBORG, S. M.; KETZIS, J.; HORII, Y.; MATTHEWS, J. B. *Strongyloides* spp. infections of veterinary importance. **Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 274–284, 2017.

TUBON, I.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; SALAROLI, R.; BERTOCCHI, M.; MANDRIOLI, R.; VINUEZA, D.; ANTOGNONI, F.; FORNI, M. In Vitro Anti-Inflammatory Effect of *Salvia sagittata* Ethanolic Extract on Primary Cultures of Porcine Aortic Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–11, 9 maio 2019.

VEIT, O.; BECK, B.; STEUERWALD, M.; HATZ, C. First case of ivermectin-induced severe hepatitis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 8, p. 795–797, ago. 2006.

VILLAMIZAR, L. H.; CARDOSO, M. das G.; ANDRADE, J. de; TEIXEIRA, M. L.; SOARES, M. J. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 131–139, fev. 2017.

VINEY, M. E. The biology of *Strongyloides* spp. In: **WormBook**. [s.l: s.n.]p. 1–17, 2015

VINEY, M.E; KIKUCHI, T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* – rodent models of *Strongyloides* infection. **Parasitology (2017)**, v. 144, p. 285–294, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. 2<sup>nd</sup> ed. 1995.

WU, Y.-B.; NI, Z.-Y.; SHI, Q.-W.; DONG, M.; KIYOTA, H.; GU, Y.-C.; CONG, B.

Constituents from Salvia Species and Their Biological Activities. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 5967–6026, 14 nov. 2012.

YANG, F.; LONG, E.; WEN, J.; CAO, L.; ZHU, C.; HU, H.; RUAN, Y.; OKANURAK, K.; HU, H.; WEI, X.; YANG, X.; WANG, C.; ZHANG, L.; WANG, X.; JI, P.; ZHENG, H.; WU, Z.; LV, Z. Linalool, derived from Cinnamomum camphora (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against Oncomelania hupensis and inhibits infection of Schistosoma japonicum. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2014.

ZAHA, O.; HIRATA, T.; KINJO, F.; SAITO, A. Strongyloidiasis-progress in diagnosis and treatment. **Internal Medicine**, v. 39, n. 9, p. 695–700, 2000.

ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, Y.; QING, C. Anti-angiogenic activity of salvicine. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 8, p. 1061–1065, 10 ago. 2013.

## ANEXOS

Anexo A: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais para testes *in vitro*

CERTIFICADO CEUA nº 234/2021



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Salvia sagittata* (Lamiaceae) sob *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditioidea)**, registrada com o nº **5869-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Sílmara Marques Allegretti e Tercila Noemi Quiñones Moran**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **16/09/2021**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/11/2021 a 01/08/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/09/2021 a 01/08/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH(Wistar)
No. de animais:	3
Idade/Peso:	21.00 Dias / 70.00 Gramas
Sexo:	3 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH(Wistar)
No. de animais:	3
Idade/Peso:	21.00 Dias / 70.00 Gramas
Sexo:	3 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH(Wistar)
No. de animais:	3
Idade/Peso:	21.00 Dias / 70.00 Gramas
Sexo:	3 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / HanUnib:WH(Wistar)
No. de animais:	3

CERTIFICADO CEUA nº 234/2021

<b>Idade/Peso:</b>	21.00 Dias / 70.00 Gramas
<b>Sexo:</b>	3 Machos
<b>Espécie / linhagem/ raça:</b>	Rato heterogênico / HanUnib:WH(Wistar)
<b>No. de animais:</b>	3
<b>Idade/Peso:</b>	21.00 Dias / 70.00 Gramas
<b>Sexo:</b>	3 Machos
<b>Origem:</b>	Biotério CEMIB/UNICAMP - Campus Campinas
<b>Biotério onde serão mantidos os animais:</b>	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 27 de outubro de 2021.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wagner José Fávoro  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Rosângela dos Santos  
Secretária Executiva

**[IMPORTANTE]** - Por favor, atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação do relatório no prazo em abstrato impede que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 03/11/2021, às 00:12 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 28/10/2021, às 16:02 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: [sigad.unicamp.br/verifica](http://sigad.unicamp.br/verifica), informando o código verificador: **A71AD255 AEF64DA1 940F83D1 A9883E69**



## Anexo B: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais para testes *in vivo*

CERTIFICADO CEUA nº 95/2022



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Salvia sagittata* (Lamiaceae) sob *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditeida), registrada com o nº 5961-1/2022, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Silmara Marques Allegretti e Tercila Noemi Oviñonas Moron, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP em reunião de 21/03/2022.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2022 a 01/08/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	21/03/2022 a 01/08/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	8
Idade/Peso:	21.00 Dias / 20.00 Gramas
Sexo:	8 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	8
Idade/Peso:	21.00 Dias / 20.00 Gramas
Sexo:	8 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	8
Idade/Peso:	21.00 Dias / 20.00 Gramas
Sexo:	8 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	8
Idade/Peso:	21.00 Dias / 20.00 Gramas
Sexo:	8 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	8
Idade/Peso:	21.00 Dias / 20.00 Gramas
Sexo:	8 Machos
Origem:	Biotério CEMIB/UNICAMP - Campus Campinas
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização à junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 02 de maio de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávoro  
Presidente

Rosângela dos Santos  
Secretária Executiva

020220222) Protocolo enviado ao grupo para efeito de verificação de atividades referentes a este protocolo até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível no site da UNICAMP, área de propositura responsável. É não apresentação de relatório ao grupo responsável. Inquirir que todos os protocolos sejam submetidos.

---

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 06/05/2022, às 19:31 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

---

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 05/05/2022, às 14:18 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

---



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:  
[sigad.unicamp.br/verifica](http://sigad.unicamp.br/verifica), informando o código verificador:  
**5B0FE26E E8D042BC 81F65801 2AD87B71**



## Anexo B: Declaração de direitos autorais

### DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

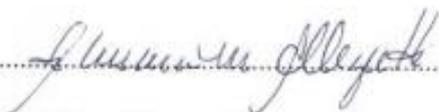
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Salvia sagittata* (Lamiaceae) SOBRE *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditoidea)”**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas 27 de outubro de 2022

Assinatura .....  


Nome de Autora: Tercila Noemi Quiñones Morón

RNM: F265332-2

Assinatura .....  


Nome da Orientadora: Silmara Marques Allegretti

RG: 1428244-6