

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
REGIONAL JATAÍ

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *in vitro* DO EXTRATO E ÓLEO
EXTRAÍDOS DA *Siparuna guianensis* E DO ALFA BISABOLOL
ISOLADO CONTRA *Strongyloides venezuelensis***

VANESSA FERNANDES CARVALHO

JATAÍ (GO)

2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Vanessa Fernandes Carvalho

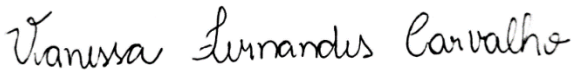
Título do trabalho: **Atividade antiparasitária *in vitro* do extrato e óleo extraídos da *Siparuna guianensis* e do alfa bisabolol isolado contra *Strongyloides venezuelensis***

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Data: 26/06/2017


Assinatura da autora

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

VANESSA FERNANDES CARVALHO

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *in vitro* DO EXTRATO E ÓLEO
EXTRAÍDOS DA *Siparuna guianensis* E DO ALFA BISABOLOL
ISOLADO CONTRA *Strongyloides venezuelensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como requisito para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientadora
Profa. Dra. Rosângela Maria Rodrigues

JATAÍ (GO)

2017


ERRATA

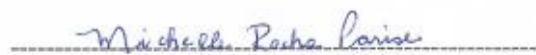
CARVALHO, V. F. Atividade antiparasitária *in vitro* do extrato e óleo extraídos da *Siparuna guianensis* e do alfa bisabolol isolado contra *Strongyloides venezuelensis*. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, 2017.

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
39	1	6	O isolamento do α -bisabolol foi realizado pelo professor Claudinei na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais-MG.	O isolamento do α -bisabolol foi realizado por alunos do curso de Química nos laboratórios de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal de Goiás (UFG), Regional Jataí-GO.
40	4	2	A identificação do α -bisabolol foi realizada por meio da cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas em comparação com um padrão de α -bisabolol cedido, previamente caracterizado pelo Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) da UFV.	A identificação do α -bisabolol foi realizada por meio da cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas em comparação com um padrão de α -bisabolol, previamente caracterizado pelo Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) da UFV (DINIZ, 2014).

Banca Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Rosângela Maria Rodrigues. UFG/Jataí
Presidente


Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita. UFG/Jataí
Membro interno


Prof.^a Dr.^a Michelle Rocha Parise. UFG/Jataí
Membro externo

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Carvalho, Vanessa Fernandes

Atividade antiparasitária in vitro do extrato e óleo extraídos da *Siparuna guianensis* e do alfa bisabolol isolado contra *Strongyloides venezuelensis* [manuscrito] / Vanessa Fernandes Carvalho. - 2017. LXXVIII, 78 f.

Orientador: Profa. Dra. Rosângela Maria Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Jataí, Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde, Jataí, 2017.

Bibliografia.

Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Siparuna guianensis*. 2. Alfa bisabolol. 3. Estrongiloidíase. 4. Anti-helmíntico. I. Rodrigues, Rosângela Maria, orient. II. Título.

CDU 576.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
PPGCAS UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
Rod. BR 364, km 192, n. 3800, Setor Industrial
75.801.615 - Jataí/GO- Brasil

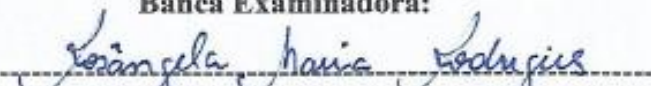
ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

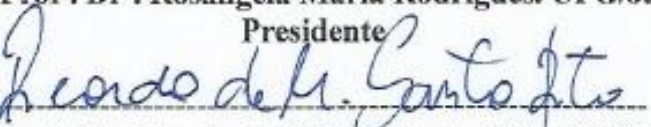
Aos trinta dias do mês de maio do ano de dois mil e dezessete às 14:00 horas na sala IB, bloco da medicina, Regional Jataí da universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, intitulada "ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *in vitro* DO EXTRATO E ÓLEO EXTRAÍDOS DA *Siparuna guianensis* E DO ALFA BISABOL ISOLADO CONTRA *Strongyloides venezuelensis*", de autoria da candidata: Vanessa Fernandes Carvalho aluna do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores: Prof. Dr. Rosângela Maria Rodrigues, Presidente. Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita membro interno e. Prof. Dr. Michelle Rocha Parise membro externo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, os membros da banca consideraram a aluna:


aprovado

reprovado

Banca Examinadora:


Prof. Dr.^a. Rosângela Maria Rodrigues. UFG/Jataí
Presidente


Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita. UFG/Jataí
Membro interno


Prof.^a. Dr.^a. Michelle Rocha Parise. UFG/Jataí
Membro externo

Foi concedido um prazo máximo de 30 dias, a contar da data de defesa o candidato a efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

Dedico àquele que nunca mediu esforços para ofertar à família vida digna e honesta, Sr. Alan Kardec Fernandes da Silva (*in memorian*), meu amado avô. Um dia nos reencontraremos!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, que na sua infinita bondade abençoou meus passos e permitiu a realização deste sonho. Os caminhos percorridos até aqui não foram fáceis, mas com certeza valeram à pena! Palavras não são suficientes para agradecer todas as pessoas que estiveram ao meu lado, sem as quais, certamente não teria conseguido!

Aos meus pais, Sinélio e Leny, meu infinito agradecimento por terem sempre lutado para dar a mim e meu irmão educação e terem nos estimulado a estudar. Esse foi o bem mais precioso que nos foi ofertado! Agradeço especialmente minha mãe que sempre nos apoiou e nos ensinou a ser pessoas simples, honestas e, lutar por nossos objetivos, meu muito obrigada! Essa conquista também é sua! Agradeço ao meu irmão e cunhada pelo apoio.

Aos meus avós, Sr. Kardec (*in memoriam*) e Maria Luzia por serem meu exemplo de vida, meu primo Fernandes Neto por sempre ter sido tão atencioso e generoso comigo, e todos familiares que direta ou indiretamente torceram por mim.

À minha sogra, sogro e cunhada, minha segunda família, por terem acreditado que eu seria capaz, mesmo quando eu duvidei.

Ao meu noivo, Adilson Junior! Faltam palavras para descrever o quão maravilhoso você é como pessoa, amigo e companheiro. Sempre ao meu lado, me fazendo acreditar que sou capaz! Obrigada por compreender os momentos de desespero e me ajudar a acreditar mais em mim e no meu potencial. Obrigada pelas inúmeras vezes que me auxiliou nos experimentos, seja nos sábados, domingos ou feriados, ou pelas vezes que perdeu o jogo do seu time de coração para anotar contagens de larvas.

À minha orientadora, Dra. Rosângela Maria Rodrigues por ter aceitado me orientar de coração aberto, por apresentar o mundo da bancada, distante até então do meu cotidiano, por estar sempre disposta a ajudar, e por todos os ensinamentos partilhados. Você não foi somente uma orientadora, em diversos momentos transformou-se em mãe, conselheira e amiga. Sua postura profissional com certeza se tornou referência para o meu crescimento profissional. Obrigada por ter acreditado em mim!

Aos colaboradores do curso de Química, profa. Dra. Liliane Nebo e prof. Dr. Claudinei Alves pela disponibilização dos compostos de *S. guianensis* e aos alunos Roberto, Flávia e Nathália pela ajuda prestada.

À prof. Dra. Luana dos Anjos, pela disponibilização das amostras dos gerbilos. Obrigada por todas as vezes que enviou amostras com a maior presteza, sempre tão educada, gentil e preocupada com o seguimento do trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Parasitologia, João e demais colegas de laboratório pela atenção e profissionalismo.

Aos amigos que ganhei no mestrado, especialmente, a Émelin, companheira diária de conversas no laboratório e R.U., agradeço por ter partilhado momentos simples que se fizeram importantes pela sua presença, você faz falta aqui! Natane, obrigada por incentivar-me a seguir mesmo quando tudo dava errado, pelas risadas, pela companhia nos momentos de lazer e amizade consolidada. Dayane, obrigada pela prontidão desde o início, sempre prestativa para tirar minhas dúvidas nos testes, ouvir e aconselhar. Laura, obrigada pelo companheirismo de sempre, minha eterna gratidão pelas inúmeras vezes que você me socorreu nas contagens, seja dia ou noite e, principalmente pela linda amizade que está sendo cultivada entre nós! Eduardo, sem palavras para descrever o quanto você é especial, obrigada pela sincera amizade, pelos sábados e domingos juntos no laboratório, pelos momentos de descontração e implicâncias, sua ajuda foi essencial para esse trabalho. Thaynara obrigada por sempre torcer por mim e ser tão prestativa, por abandonar a microbiologia e se agregar na parasitologia para fazer companhia durante dias de testagens e, por ajudar nas contagens. Juliano, Thairiny, Jefferson, e Camila, obrigada pelos momentos de diversão no laboratório e fora dele, pelas conversas e pela amizade.

Aos meus queridos amigos de longa data, Andrey, Bruna, Fábio, Livia, Monyk, Mayara, Lude que sempre estiveram ao meu lado, fisicamente ou através de orações, incentivando, partilhando alegrias e tristezas, minha gratidão por poder contar com o apoio de vocês. Vocês são irmãos de alma!

À CAPES e Universidade Federal de Goiás pelo auxílio e apoio concedido, que foi de suma importância para desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A estrogiloidíase é uma doença negligenciada com prevalência subestimada ocasionada principalmente pela espécie *Strongyloides stercoralis*, geralmente é assintomática, mas potencialmente fatal em indivíduos imunocomprometidos. Trata-se de uma infecção de difícil diagnóstico devido a eliminação de larvas discreta e irregular, e com alto impacto em saúde pública. Dentre os medicamentos disponíveis para o tratamento da estrogiloidíase, estão o albendazol e ivermectina, mas devido aos efeitos colaterais e o desenvolvimento da resistência, tem-se buscado novas alternativas terapêuticas para o controle do gênero *Strongyloides* sp. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial anti-helmíntico do extrato etanólico, fração acetato de etila, fração aquosa e óleo essencial rico em alfa bisabolol de *Siparuna guianensis* bem como do alfa bisabolol isolado no controle de *S. venezuelensis*. Realizou-se Testes de Eclosão de Ovos (TEO) e Testes de Motilidade Larval (TML) inicialmente com o extrato etanólico, óleo essencial e alfa bisabolol isolado nas concentrações de 0,2 à 1,0 mg/mL e, por fim, foram testadas as frações acetato de etila e aquosa fracionadas do extrato etanólico nas concentrações de 0,05 à 0,8 mg/mL. Foram utilizados como controles positivos o albendazol no TEO e a ivermectina no TML e, como controles, água filtrada e DMSO 1%. Foram utilizadas fezes frescas de gerbilos para realização do TEO e cultura de fezes em vermiculita para o TML. Foi incubado 50 µL dos compostos testados com ovos ou larvas contendo aproximadamente 50 espécimes em tubos *ependorfs* para o TEO e TML. Os testes foram feitos em duplicata com réplica, e após incubação à 28°C por 48 horas realizou-se a contagem dos espécimes no TEO, e no TML, as contagens foram realizadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas. As contagens nos dois testes foram realizadas em microscopia óptica. Todas as substâncias testadas apresentaram atividade ovicida equivalente ao controle positivo e, provocaram alterações na morfologia dos ovos. Apenas as frações acetato de etila e aquosa apresentaram efeito concentração dependente nos ensaios com ovos. No TML, não houve relação tempo dependente, apenas o extrato etanólico e a fração aquosa de *S. guianensis* apresentou eficiência equivalente ao controle positivo. Com exceção do alfa bisabolol isolado, os demais compostos apresentaram efeito concentração dependente no TML. A maior concentração do extrato etanólico provocou alterações na cutícula das larvas analisadas. Os testes fitoquímicos do extrato etanólico mostraram a presença de compostos fenólicos, taninos e flavonoides. Infere-se a partir dos resultados que existe sinergismo entre os constituintes químicos dos diferentes compostos analisados no TEO e TML e, que a presença de taninos e flavonoides no extrato etanólico e em suas frações influenciou na atividade ovicida e larvicida observada. Conclui-se que *S. guianensis* apresentou *in vitro* potencialidade antiparasitária principalmente do extrato etanólico e suas frações nas diferentes formas de *S. venezuelensis*.

PALAVRAS-CHAVE: *Siparuna guianensis*; alfa bisabolol; estrogiloidíase; anti-helmíntico.

ABSTRACT

The strongyloidiasis is a neglected disease with prevalence underestimated, is caused mainly by the *Strongyloides stercoralis* species, is usually asymptomatic but potentially fatal in immunocompromised individuals. It is an infection difficult to diagnose due to low and irregular elimination of larvae, and with a high impact on public health. Among the drugs available for the treatment of strongyloidiasis are albendazole and ivermectin, but due to the side effects and the development of resistance has sought new therapeutic alternatives for the control of the genus *Strongyloides* sp are being studied. In this context, the objective of this study was to evaluate the anthelmintic potential of the ethanolic extract, ethyl acetate fraction, aqueous fraction, and essential oil rich in alpha bisabolol of *S. guianensis* as well as of the alpha bisabolol isolated in the control of *S. venezuelensis*. We carried out the Eggs Hatching Tests (EHT) and Larval Motility Tests (LMT) initially with ethanolic extract, essential oil and alpha bisabolol isolated at concentrations of 0.2 to 1.0 mg/mL, and finally fractionated ethyl acetate and aqueous fractions of ethanolic extract at concentrations of 0.05 to 0.8 mg/mL were tested. We used as positive controls, albendazole in EHT and ivermectin in LMT and as negative controls, filtered water and DMSO 1%. Fresh feces of gerbils were used to perform the EHT and stool culture in vermiculite for LMT. Was incubated with 50µL of tested compounds with eggs or larvae containing approximately 50 specimens in eppendorf tubes for TEO and TML. The tests were performed in duplicate with the reply, and after incubation at 28 °C for 48 hours was performed counting the specimens in the EHT, and LMT, counts were performed at intervals of 24, 48 and 72 hours. The counts in the two tests were performed under optical microscopy. All the substances tested showed positive ovicidal activity equivalent to the positive control, and caused changes in the morphology of eggs. Only ethyl acetate and aqueous fractions showed a concentration-dependent effect in egg assays. In the TML, there was no time dependent relationship, only the ethanolic extract and the aqueous fraction of *S. guianensis* presented efficiency equivalent to the positive control. With the exception of alpha bisabolol alone, the other compounds had a concentration-dependent effect on TML. The higher concentration of the ethanolic extract caused changes in the cuticle of the analyzed larvae. The phytochemical tests of the ethanolic extract showed the presence of phenolic compounds, tannins and flavonoids. It is suggested from the results that there is synergism between the chemical constituents of the different compounds analyzed in the TEO and TML, and the presence of tannins and flavonoids in the ethanolic extract and its fractions influenced the observed ovicidal and larvicidal activity. It is concluded that *S. guianensis* showed *in vitro* antiparasitic potential mainly of the ethanolic extract and its fractions in the different forms of *S. venezuelensis*.

KEYWORDS: *Siparuna guianensis*; alpha bisabolol; strongyloidiasis; anthelmintic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Características morfológicas das seis formas evolutivas de <i>S. stercoralis</i>	20
FIGURA 2 - Distribuição mundial de <i>Strongyloides stercoralis</i> baseada em serviços de saúde.....	21
FIGURA 3 - Ciclo biológico do helminto <i>S. stercoralis</i>	23
FIGURA 4 - Ciclo biológico <i>S. venezuelensis</i>	31
FIGURA 5 - A- Arbusto de SG; B, C e D – folhas, flores e frutos de SG	35
FIGURA 6 - Aspectos morfológicos dos ovos de <i>S. venezuelensis</i> observados durante o TEO utilizando 1,0 mg/mL dos compostos: extrato etanólico de SG (A); óleo essencial de SG (B); e α -bisabolol isolado (C), em relação aos controles de água (D) e DMSO 1% (E) e, o controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL (F).....	47
FIGURA 7 - Curva de dose resposta representada pela taxa de inibição da motilidade larval \pm erro padrão da média das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado com larvas de <i>S. venezuelensis</i> após 24 horas de incubação.....	48
FIGURA 8 - Taxa de inibição da motilidade das larvas de <i>S. venezuelensis</i> apresentada pelas concentrações testadas de extrato etanólico de SG em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e controle positivo de Ivermectina (Iver.) 316 ppm.....	49
FIGURA 9 - Taxa de inibição da motilidade das larvas de <i>S. venezuelensis</i> apresentada pelas concentrações testadas de óleo de SG em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e controle positivo de Ivermectina 316 ppm.	50
FIGURA 10 - Taxa de inibição da motilidade das larvas de <i>S. venezuelensis</i> apresentada pelas concentrações testadas de α -bisabolol em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e controle positivo de Ivermectina 316 ppm.....	51
FIGURA 11 - Análise por microscopia óptica de larvas de <i>S. venezuelensis</i> tratadas com concentração de 1,0 mg/mL de extrato etanólico de SG em diferentes tempos, sendo 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C), comparadas com o controle positivo de ivermectina 316 ppm.....	53
FIGURA 12 - Aspectos morfológicos dos ovos de <i>S. venezuelensis</i> observados durante o TEO. (A) fração acetato de etila (0,8 mg/mL); (B) fração aquosa (0,8 mg/mL),.....	55
FIGURA 13 - Taxa de inibição da motilidade de larvas de <i>S. venezuelensis</i> apresentada pelas concentrações testadas da fração acetato etila em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e controle positivo de Ivermectina 316 ppm.....	56
FIGURA 14 - Taxa de inibição da motilidade de larvas de <i>S. venezuelensis</i> apresentada pelas concentrações testadas da fração aquosa em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e	

controle positivo de Ivermectina 316 ppm.....57

FIGURA 15 – Resultados dos testes de taninos e compostos fenólicos: (A) amostra com padrão do extrato etanólico de SG à esquerda e solução teste após adição de FeCl_3 à direita; (B) solução teste da fração acetato de etila após adição de FeCl_3 ; (C) solução teste da fração aquosa após adição de FeCl_359

FIGURA 16 – Resultados dos testes para identificação de flavonoides: (A) padrão do extrato etanólico de SG à esquerda e solução teste após alcalinização à direita; (B) padrão da fração acetato de etila à esquerda e solução teste após alcalinização à direita; (C) padrão da fração aquosa à esquerda e solução teste após alcalinização à direita.59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Percentagem da taxa de inibição da eclosão de ovos de *S. venezuelensis* ± erro padrão das médias das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado após incubação por 48 horas à 28°C.....45

TABELA 2 – Percentual da eficiência de inibição da motilidade das larvas de *S. venezuelensis* representada por média das diferentes concentrações analisadas de extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado ± erro padrão da média após incubação por 24 horas à 28°C.....52

TABELA 3 – Percentagem da taxa de inibição da eclosão de ovos de *S. venezuelensis* ± erro padrão das médias das diferentes concentrações testadas da fração de acetato de etila e fração aquosa oriundas do fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico de SG após incubação por 48 horas à 28°C.....54

TABELA 4 – Percentual da eficiência de inibição da motilidade das larvas de *S. venezuelensis* representada por média das diferentes concentrações analisadas da fração acetato de etila e fração aquosa ± erro padrão da média após incubação por 24 horas à 28°C.....58

LISTA DE SIGLAS

B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio
CCD	Cromatografia em camada delgada
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FeCl ₃	Cloreto férrico
GO	Goiás
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HJ	Herbário Jataiense
HTLV-1	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo 1
IB	<i>Immunoblotting</i>
IC50	índice de citotoxicidade 50%
IEO	Inibição da eclosão dos ovos
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG 1	Imunoglobulina G1
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IML	Inibição da motilidade larval
L1	Larva rabditoide
L3	Larva filarioide
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro

mm	Milímetro
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
IFI	Imunofluorescência indireta
SG	<i>Siparuna guianensis</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SUS	Sistema Único de Saúde
TEO	Teste de Eclosão dos ovos
Th 1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th 2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TML	Teste de Motilidade Larval
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
UV	ultravioleta
W.A.A.V.P.	<i>World Association for the Advanced in Veterinary Parasitology</i>
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	18
1.1.Aspectos gerais da estrogiloidíase.....	18
1.2.Características morfológicas <i>S. stercoralis</i>	19
1.3.Epidemiologia.....	20
1.4.Ciclo biológico <i>S. stercoralis</i>	22
1.5.Resposta imune.....	23
1.6.Manifestações clínicas.....	24
1.7.Diagnóstico.....	25
1.8.Tratamento.....	27
1.9.Modelos experimentais para estudo da estrogiloidíase.....	29
1.10.Validação de plantas medicinais com atividades biológicas.....	32
1.11. <i>Siparuna guianensis</i>	34
1.12.Alfa bisabolol.....	36
2.OBJETIVOS	38
2.1.Objetivo Geral.....	38
2.2.2Objetivos Específicos.....	38
3.METODOLOGIA	39
3.1.Local de realização dos experimentos.....	39
3.2.Produção e processamento do extrato bruto etanólico e frações de SG.....	39
3.3.Produção e processamento do óleo essencial de SG.....	40
3.4.Isolamento do α -bisabolol.....	40
3.5.Diluições dos compostos.....	41
3.6.Controles.....	41
3.7.Parasitos.....	41
3.8.Teste de eclosão de ovos.....	42
3.9.Teste de motilidade larval.....	42
3.10.Triagem fitoquímica do extrato etanólico e frações de SG.....	42
3.11.Avaliação da eficácia dos compostos.....	43
3.12.Análise estatística.....	44
4.RESULTADOS	45
4.1.Avaliação do potencial ovicida e de inibição da eclosão dos ovos de <i>S. venezuelensis</i> do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado.....	45
4.2.Avaliação do desenvolvimento dos ovos de <i>S. venezuelensis</i> tratados com diferentes concentrações do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado.....	46
4.3.Ação larvicida e de inibição da motilidade larval do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado contra <i>S. venezuelensis</i>	47
4.4.Efeito do extrato etanólico de SG na morfologia das larvas de <i>S. venezuelensis</i>	52
4.5.Avaliação do potencial ovicida, de inibição da eclosão e desenvolvimento dos ovos de <i>S. venezuelensis</i> tratados com frações acetato de etila e aquosa de SG em relação ao extrato etanólico de SG.....	54
4.6.Ação larvicida e de inibição da motilidade larval da fração acetato etila e fração aquosa em relação ao extrato etanólico de SG.....	56
4.7.Triagem fitoquímica do extrato etanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de SG.....	58

5.DISSCUSSÃO.....	60
6.CONCLUSÃO.....	65
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da strongiloidíase

A strongiloidíase é ocasionada pelo nematódeo do gênero *Strongyloides*, principalmente pela espécie *Strongyloides stercoralis*, é uma doença negligenciada com prevalência ainda subestimada (ADEDAYO; GRELL; BELLOT, 2002; LAU CHONG; SAMALVIDES CUBA; TERASHIMA IWASHITA, 2005; ANAMNART et al., 2010; BONNE-ANNÉE; HESS; ABRAHAM, 2011). Considerado um nematódeo cosmopolita, o *S. stercoralis* é frequentemente encontrado em regiões com condições sanitárias precárias, especialmente áreas de climas tropicais, subtropicais e, em alguns casos, regiões temperadas (ADELL, MÁRQUEZ, 2007; MILLER et al., 2014; MAKKER et al., 2015; RUANO et al., 2015).

O gênero *Strongyloides* pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabdiasoidea, família Strongyloididae (MELO, 2011), apresenta 52 espécies descritas, das quais, *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*, apresentam atenção especial na prática clínica pelo fato de serem capazes de infectar o homem (COSTA-CRUZ, 2011). Porém, há casos excepcionais de infecção causada pelo *S. stercoralis* em outros animais, como, cachorros, gatos e macacos (COSTA-CRUZ, 2011; GONÇALVES et al., 2007). *S. fuelleborni* geralmente parasita macacos, no entanto, casos esporádicos de infecção na população africana e sudoeste asiático já foram registrados (OLSEN et al., 2009; COSTA-CRUZ, 2011),

A strongiloidíase geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes, mas pode ocorrer hiperinfecção e invasão sistêmica do parasito em seu estágio de larva em indivíduos com desnutrição protéico-calórica, neoplasias, transplante renal, lupus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus, presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), tuberculose ou que recebam tratamento com drogas imunossupressoras, podendo levar a óbito (SIDDIQUI; BERK, 2001; LAM et al., 2006; VAIYAVATJAMAI et al., 2008; REPETTO et al., 2010; ABDELRAHMAN et al., 2012).

Os principais fatores associados com a progressão mundial da strongiloidíase são a falta de saneamento básico, utilização de água contaminada somada a má higienização, bem como o déficit de conhecimento de indivíduos em situações de risco, o que acaba aumentando a probabilidade de exposição ao helminto bem como a dificuldade de diagnosticar a doença precocemente (PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

A infecção ocasionada por *S. stercoralis* é considerada uma das mais difíceis de ser diagnosticada e com alto impacto na saúde pública, uma vez que o helminto pode não ocasionar sintomatologia aos indivíduos, ao mesmo tempo em que é capaz de manter a proliferação das formas adultas no intestino do hospedeiro por autoinfecção interna (PAULA et al., 2000; COSTA-CRUZ et al., 2003; CONCHA; HARRINGTON JR; ROGERS, 2005; BOLLELA et al., 2013).

No mercado farmacêutico existem medicamentos disponíveis para o tratamento da estrogiloidíase, no entanto, com o intuito de reduzir o uso extensivo de fármacos sintetizados, novos compostos como as plantas com atividades anti-helmínticas estão despertando o interesse de pesquisadores por se tornarem uma nova alternativa terapêutica no controle de nematódeos intestinais (AKHTAR et al., 2000; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

1.2. Características morfológicas *S. stercoralis*

S. stercoralis apresenta seis formas evolutivas durante o seu ciclo de vida, sendo elas, a fêmea partenogenética, fêmea e macho de vida livre, larva rabditoide, larva filarioide, e ovo, como representado na Figura 1 (REY, 2008; COSTA-CRUZ, 2011).

As fêmeas partenogenéticas são maiores do que as formas de vida livre, medem de 1,7 a 2,5 mm de comprimento por 0,03 a 0,04 mm de largura, apresentam o corpo cilíndrico, filiforme, boca com três lábios, esôfago longo no seu terço anterior do tipo filarioide, extremidade anterior arredondada e posterior afilada, cutícula fina, transparente, com leves estriações e não apresentam receptáculo seminal (COSTA-CRUZ, 2011).

As fêmeas de vida livre são menores do que as fêmeas partenogenéticas, e maiores que os machos de vida livre, apresentando de 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 0,05 a 0,07 mm de largura, boca com três lábios, esôfago do tipo rabditoide, extremidade anterior arredondada e posterior afilada, aspecto fusiforme, cutículas finas, transparentes, com estriações, e receptáculo seminal, enquanto que os machos medem 0,7 mm de comprimento por 0,4 mm de largura, extremidade anterior arredondada e posterior recurvada ventralmente, boca com três lábios, esôfago tipo rabditoide, e dois espículos que auxiliam na cópula (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; COSTA-CRUZ, 2011).

As larvas rabditoides (L1) medem geralmente de 0,25 a 0,3 mm de comprimento por 0,015 mm de largura, têm esôfago do tipo rabditoide, apresentam cutícula fina e hialina, vestíbulo bucal curto, primórdio genital evidente no terço posterior do corpo e cauda

pontiaguda, já as larvas filarióides (L3), medem de 0,35 a 0,50 mm de comprimento por 0,01 a 0,03 mm de largura, são mais finas do que as L1, têm esôfago mais longo, do tipo filarioide, e apresentam cauda com aspecto entalhado (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; COSTA-CRUZ, 2011).

Os ovos são elípticos, com paredes finas e transparentes, variando de 0,07 mm de comprimento por 0,04 mm de largura quando gerados pelas fêmeas de vida livre, e 0,05 mm de comprimento por 0,03 mm de largura quando oriundos das fêmeas partenogenéticas, dos ovos embrionados saem as L1 que são eliminadas pelas fezes, raramente estes ovos são visualizados nas fezes, exceto em casos de diarreia grave (ADELL; MÁRQUEZ, 2006; REY, 2008; COSTA-CRUZ, 2011).

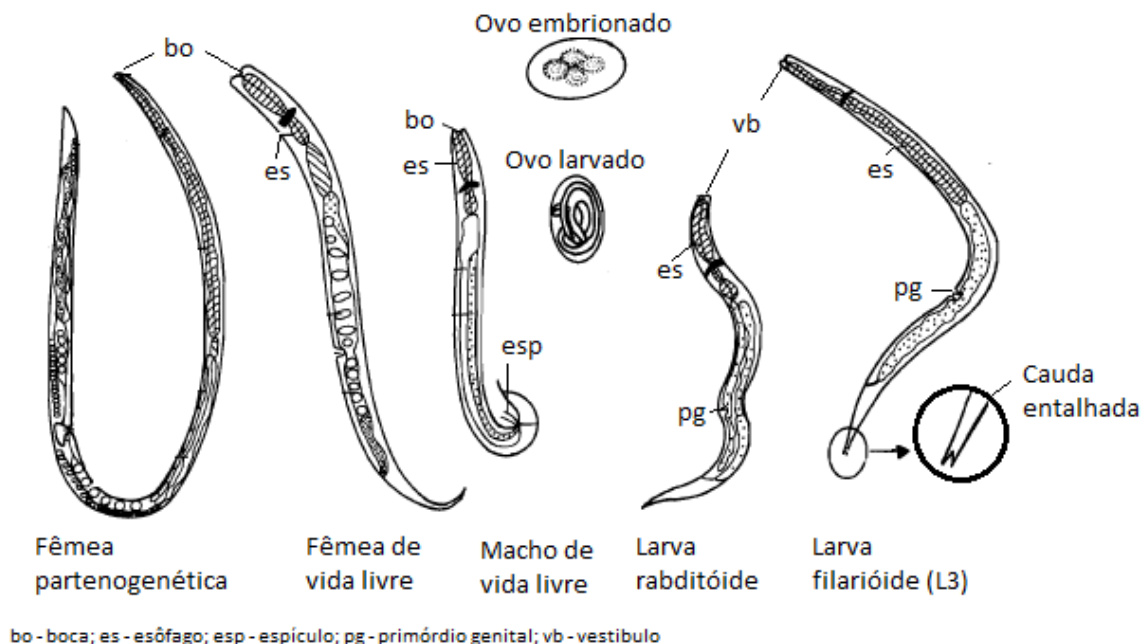


FIGURA 1 - Características morfológicas das seis formas evolutivas de *S. stercoralis*. Fonte: Adaptado de Costa-Cruz (2011).

1.3. Epidemiologia

A estrogiloidíase apresenta importância mundial, estimando-se que 30 a 100 milhões de pessoas possam estar infectadas por *S. stercoralis* (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; CONCHA; HARRINGTON JR; ROGERS, 2005; COSTA-CRUZ, 2011).

A distribuição global da estrogiloidíase acontece de forma heterogênea, podendo as regiões serem classificadas de acordo com a prevalência apresentada, sendo a infecção esporádica quando acomete até 1% da população, endêmica em 1 a 5% dos casos ou hiperendêmica quando a prevalência é superior a 5% (PIRES; DREYER, 1993).

Em áreas tropicais e subtropicais, a estrogiloidíase pode afetar de 10 a 40% da população chegando a 60% em regiões que apresentam condições climáticas e sanitárias favoráveis ao helminto, como demonstrado na Figura 2 (SCHÄR et al., 2013a). Em países do Sul e Leste Europeu, Europa Central, ilhas do Caribe, Sudeste Asiático, América Latina e África Subsaariana, nota-se o aumento dessa prevalência (PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

A alta circulação de pessoas, especialmente imigrantes, refugiados ou viajantes resultaram no aumento de casos observados nos países desenvolvidos onde a doença não é endêmica (DOORN et al., 2007; MARCOS et al., 2011).

Estudo realizado por Schär et al. (2013a) sobre a distribuição global da estrogiloidíase entre os anos de 1989 a 2011, demonstraram que há heterogenicidade mundial da infecção com prevalência de 48,1% na Nigéria, seguida de 23,7% na Tailândia, 18,7% no Japão, 15% na Austrália, 6,6% na Índia e 2,7% nos Estados Unidos e, o Brasil aparece com 13% dessa prevalência para o *S. stercoralis*, no entanto, segundo os autores esta prevalência pode ter sido subestimada em função da baixa sensibilidade das técnicas utilizadas nos referidos estudos.

Paula e Costa-Cruz (2011) demonstraram que no Brasil, a prevalência foi de 5,5% entre os anos de 1990 e 2009, caracterizando assim o país como hiperendêmico para a doença. Os estados brasileiros com maiores prevalências são: Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

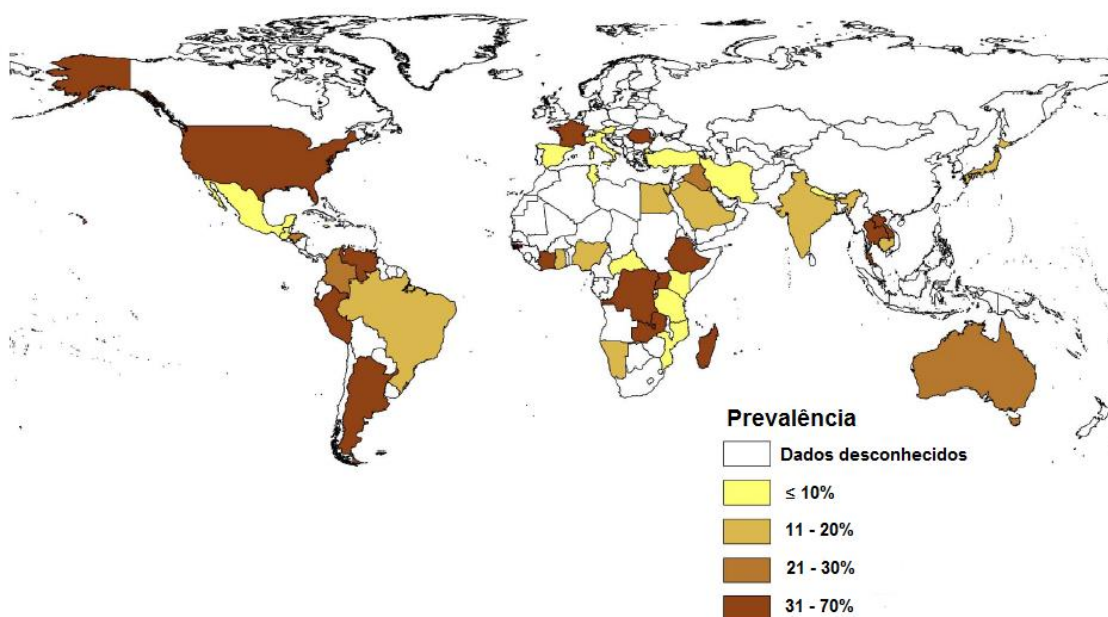


FIGURA 2 - Distribuição mundial de *Strongyloides stercoralis* baseada em serviços de saúde. Fonte Adaptado de Schär et al. (2013a).

1.4. Ciclo biológico *S. stercoralis*

O ciclo biológico de *S. stercoralis* é monoxênico, podendo ser direto (partenogenético) ou indireto (vida livre), isto acontece devido a constituição genética da fêmea partenogenética presente no intestino do hospedeiro que é triploide (3n), origina três tipos de ovos e consequentemente três tipos de larvas rabditoídes, as triploides (3n), diploides (2n) e haploides (1n), como visto na Figura 3 (COSTA-CRUZ, 2011).

No ciclo indireto, as larvas rabditoídes 2n e 1n são eliminadas pelas fezes dos hospedeiros, ao atingirem o solo sofrem quatro mudas transformando-se em fêmeas e machos de vida livre respectivamente que em condições favoráveis de temperatura e umidade se acasalam, gerando ovos 3n, que evoluem para larvas filarioides infectantes (L3) e, completam o ciclo após penetração na pele do homem (VADLAMUDI; CHI, KRISHINASWAMY, 2006; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; MAKKER et al., 2015).

O ciclo direto acontece após as larvas rabditoídes 3n evoluírem para L3 no solo ou na pele da região perianal do hospedeiro, estas completam o ciclo após a penetração pela pele ou mucosas dos indivíduos (COSTA-CRUZ, 2011; BONNE-ANNÉE; HESS; ABRAHAM, 2011; GREAVES et al., 2013).

Após a penetração pela pele ou mucosas, as larvas atingem a corrente sanguínea, podendo migrar para coração ou pulmões e, quando chegam nestes últimos, transformam-se em L4, atravessam a árvore brônquica, atingem a faringe podendo ser expectoradas ou deglutidas, seguindo desta vez para o intestino delgado, onde se transformam em fêmeas partenogenéticas, as quais, alojam-se nas criptas de Lieberkühn e na porção superior do jejuno, onde fazem a postura em média de 30 a 40 ovos por dia, os quais, atingem rapidamente a maturidade para larvas rabditoídes, estas migram para a luz intestinal e então são eliminadas pelas fezes para iniciar novo ciclo (PIRES; DREYER, 1993; VIGG et al., 2006; COSTA-CRUZ, 2011; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; GREAVES et al., 2013).

Hábitos como caminhar descalço, manter contato direto com solo durante a realização de alguma atividade, ou frequentar locais com condições precárias de saneamento básico contribuem para o aumento da transmissão de *S. stercoralis* (SCHÄR, et al., 2013a).

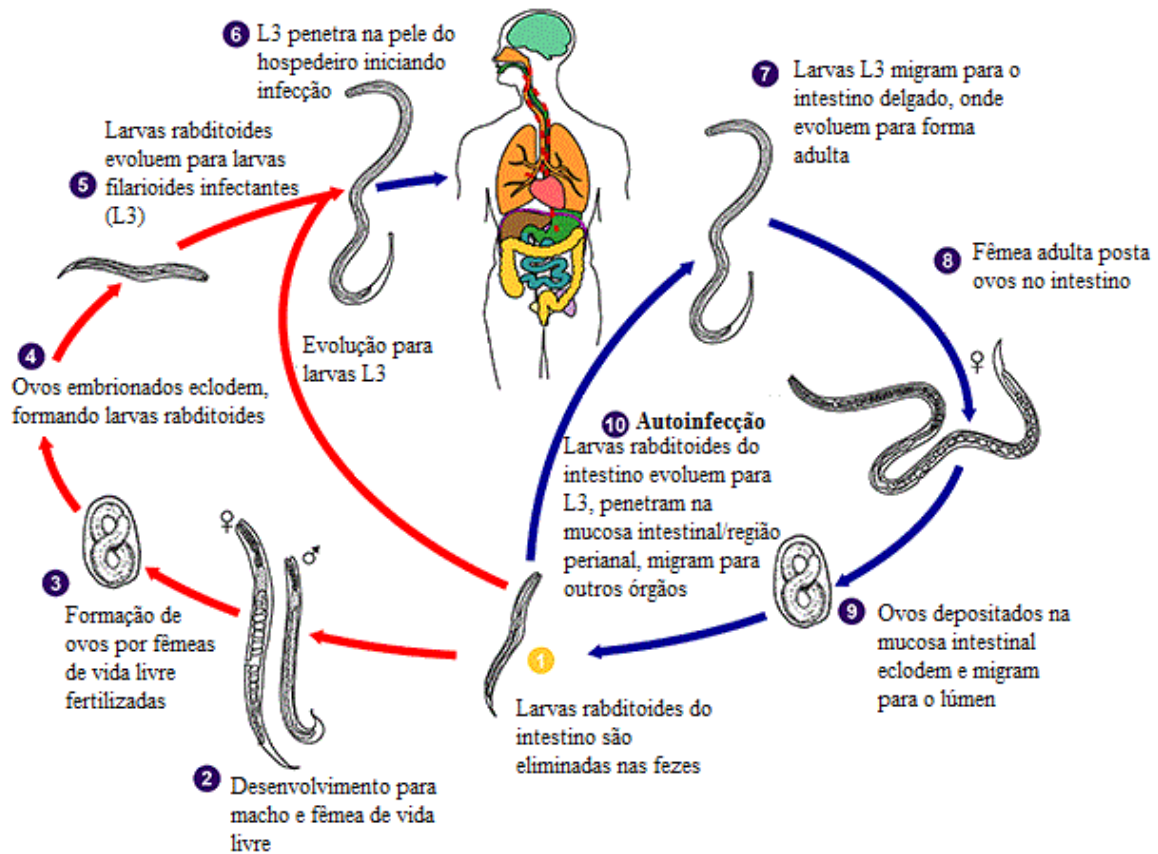


FIGURA 3 - Ciclo biológico do helminto *S. stercoralis*.

Fonte: Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>

A transmissão de *S. stercoralis* pode ocorrer a partir de três formas distintas: a heteroinfecção, autoinfecção interna e autoinfecção externa (CABRAL et al., 2015). A penetração direta das formas L3 pela pele do hospedeiro, denominada de heteroinfecção, é a principal forma de transmissão, pode perdurar desde a infância até a fase adulta dos indivíduos sem manifestações de sintomas (CONCHA; HARRINGTON JR; ROGERS, 2005). Na autoinfecção interna, as larvas rhabditoides presentes no intestino delgado se transformam em L3 no intestino grosso e, em vez de seguirem para o lúmen e serem eliminadas pelas fezes, penetram novamente na mucosa intestinal e, na autoinfecção externa, as L3 penetram a pele perianal causando novamente a infecção (BENINCASA et al., 2007; BRAZ et al., 2015).

1.5. Resposta imune

A resposta imune do hospedeiro ao *S. stercoralis* não é totalmente elucidada mas sabe-se que envolve a resposta T dependente do tipo *helper 2* (Th2) com produção de interleucinas

(IL), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, anticorpos IgG, IgA, IgE, bem como a ação de mastócitos, basófilos, eosinófilos e células B (PORTO et al., 2002; COSTA-CRUZ, 2011; MARCOS et al., 2011; ROMERO-CABELLO et al., 2012).

Primariamente, há recrutamento dos neutrófilos, macrófagos e, eosinófilos que agem diretamente contra as larvas de *S. stercoralis* através da resposta imune inata (BONNE-ANNÉE; HESS; ABRAHAM, 2011; MAKKER et al., 2015). Os eosinófilos desempenham um papel crucial para ativação da resposta imune adaptativa, além de fornecer citocinas necessárias para produção de IgM (MAKKER et al., 2015).

Especificamente na resposta imune adaptativa, destaca-se a ação das citocinas IL-5 responsável pela ativação dos eosinófilos e indução da produção de IgA; a IL-4 por sua vez, estimula a migração de eosinófilos para causarem a morte direcionada do parasito e, com o auxílio da IL-13 estimula a produção de IgE e IgG1 pelas células B; a IL-6 estimula granulócitos, células B bem como células T; e a IL-10 e 13 modulam negativamente a ativação das células T *helper* 1 (Th1) (COSTA-CRUZ, 2011).

Os mecanismos T independentes são acionados, incluindo a ação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 que contribuem para o aumento da secreção de muco ocasionado pelas células caliciformes, a ação das IL-12 e IL-18 que induzem a produção de interferon gama (IFN- γ) desencadeando ativação de células Th1, as quais, levam a inibição ou modulação da resposta Th2 (CONCHA; HARRINGTON JR; ROGERS, 2005; COSTA-CRUZ, 2011).

O decréscimo da resposta protetora Th2, especialmente em indivíduos imunocomprometidos pode provocar a exacerbação do ciclo de autoinfecção resultando assim, manifestações clínicas graves que podem culminar na morte destes (CONCHA; HARRINGTON JR; ROGERS, 2005).

1.6. Manifestações clínicas

A infecção no trato gastrointestinal causada pelo *S. stercoralis* em indivíduos imunocompetentes tende a se desenvolver de forma crônica e assintomática (COSTA-CRUZ et al., 2003; SATOH et al., 2003; GONÇALVES et al., 2007; CORRAL et al., 2015). Geralmente, os sintomas são leves e inespecíficos como dor abdominal, vômitos, diarreia e, eosinofilia, mas na forma disseminada podem ser graves e fatais (VIGG et al., 2006; CATALÁN et al., 2009; CABRAL et al., 2015; MAKKER et al., 2015).

Os sintomas respiratórios como dispneia, tosse seca, sibilos e hemoptise podem ser detectados (VIGG et al., 2006; GREAVES et al., 2013). Na fase aguda, pode haver reações cutâneas serpiginosas principalmente nos pés, conhecidas como “comichões”, representadas por prurido intenso e, na fase crônica, a migração larval intradérmica pode afetar regiões perianais, região das coxas ou abdômen desencadeando lesões urticariformes, migratórias, conhecidas como síndrome da larva *currens* que pode perdurar por meses (ADELL; MÁRQUEZ, 2007; GREAVES et al., 2013; MAKKER et al., 2015).

As formas graves estão diretamente associadas a presença de outras condições que causem alterações na resposta imune dos indivíduos gerando quadros de hiperinfecção ou disseminação da doença e, conseqüentemente pode resultar na morte do hospedeiro (PAULA et al., 2000; ANAMNART et al., 2010; BOLLELA et al., 2013; CABRAL et al., 2015), como por exemplo, indivíduos portadores do HIV ou vírus linfotrópico de células T humana tipo 1 (HTLV-1), alcoólatras, transplantados, que façam uso de drogas imunossupressoras, neoplásicas ou corticosteroides (PORTO et al., 2002; PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

Na hiperinfecção, há o aumento exacerbado da carga parasitária que pode acometer o trato gastrointestinal isoladamente ou migra para outros órgãos como os pulmões, sendo então detectada a insuficiência respiratória, infiltrados pulmonares ou hemorragias alveolares (PUTHIYAKUNNON et al., 2014). Na forma disseminada, as larvas migram para outros órgãos que não fazem parte do seu ciclo habitual (PUTHIYAKUNNON et al., 2014). Tanto larvas rabditoides quanto as filarioides podem migrar do intestino e invadir outros órgãos, sendo detectadas em secreções respiratórias ou outros fluidos orgânicos, o que tende a evoluir para sepse e morte (ADELL; MÁRQUEZ, 2007; MARCOS et al., 2011; BOLLELA et al., 2013).

1.7. Diagnóstico

O diagnóstico da estrogiloidíase normalmente baseia-se na observação de larvas nas fezes, no entanto, na maioria das vezes é dificultado devido à baixa sensibilidade dos exames parasitológicos quando se analisa somente uma amostra fecal podendo assim, apresentar resultado falso negativos em 70% ou mais dos casos, devido à baixa carga parasitária e excreção larval irregular, a sensibilidade de diagnóstico aumenta para 50%, com análise de três amostras de fezes e é superior a 90%, se examinadas sete amostras de fezes (LIM et al., 2004; LAU CHONG; SAMALVIDES CUBA; TERASHIMA IWASHITA, 2005; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

Os métodos de concentração como Baermann (1917) adaptado por Moraes (1948) e, o de Rugai, Mattos e Brisola (1954), fundamentados no hidro e termotropismo das larvas são realizados a partir da coleta de no mínimo três amostras de fezes em dias alternados (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; RIGO et al., 2008). A cultura em placa e ágar (ARAKAKI et al., 1988) e Harada-mori (1955) permitem a detecção de larvas vivas nas fezes (SULTANA et al., 2013). O método de cultura em placa de ágar baseia-se na visualização de rastros das larvas deixados na placa após arrastarem bactérias sob o substrato, mas apesar de ser mais sensível do que os anteriores envolve maior custo (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004).

Além dos métodos parasitológicos, as técnicas imunológicas e moleculares têm auxiliado o diagnóstico da estrogiloidíase (LEVENHAGEM; COSTA-CRUZ, 2014). Os testes sorológicos são mais fáceis de serem executados, a partir do sangue coletado e processado dos indivíduos suspeitos se obtém as amostras de soros para detecção de anticorpos IgG, IgA, IgM ou IgE que reagem aos extratos ou frações proteicas antigênicas de larvas infectantes e, apresentam como exemplos, a técnica de ensaio imunozimático (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e o *immunoblotting* (IB) (DOORN et al., 2007; LEVENHAGEM; COSTA-CRUZ, 2014). A sensibilidade e especificidade das técnicas dependem da preparação antigênica usada bem como a classe de anticorpos que é pesquisada (OLSEN et al., 2009; VERWEIJ et al., 2009).

Os testes ELISA e IFI são considerados testes rápidos e, mais sensíveis do que métodos de concentração e cultura, porém, na técnica ELISA é relatada maior sensibilidade e menor especificidade o que pode acarretar em resultados de reatividade cruzada em áreas endêmicas para outras helmintíases quando comparada à técnica de IFI, que por sua vez, mostra maior especificidade (RIGO et al., 2008; BISOFFI et al., 2013; LEVENHAGEM, COSTA-CRUZ, 2014). O *immunoblotting* apresenta alta sensibilidade e especificidade, mas por requerer maior prazo para liberação dos resultados não é realizado na rotina dos laboratórios sendo indicado como teste confirmatório (RIGO et al., 2008).

Uma das dificuldades descritas para a realização dos testes imunológicos é a obtenção de larvas infectantes de *S. stercoralis*, por isso, estudos demonstraram o uso das espécies *S. ratti* e, *S. venezuelensis* como fontes de antígenos para realização destes (COSTA-CRUZ et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004; CORRAL et al., 2015).

A reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a detecção do DNA do *S. stercoralis* em amostras fecais (SULTANA et al., 2013), apresentando resultados promissores com especificidade de até 100% para o helminto quando

comparada a outros métodos diagnósticos como o Baermann (VERWEIJ et al., 2009). Na prática clínica o uso da técnica de PCR acaba sendo limitado por depender de equipamentos caros, inviáveis diante dos poucos recursos normalmente existentes (SCHÄR et al., 2013b).

1.8. Tratamento

Normalmente, para o tratamento da estrogiloidíase são prescritos fármacos como o albendazol, tiabendazol, mebendazol ou ivermectina (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006).

O tiabendazol, pertencente à classe de benzimidazóis é indicado na dose de 25mg/kg/12h durante dois ou três dias, porém devido seus efeitos adversos, tais como náuseas, prurido, cefaleia e sonolência tem sido substituído pelo albendazol na dosagem de 400mg/kg/12h durante três dias (ADELL; MÁRQUEZ, 2007). O albendazol, por sua vez, apesar de provocar menos efeitos adversos possui menor atividade nematicida (SATOU et al., 2001).

Os benzimidazóis de maneira geral resultam em danos irreversíveis nas células gastrointestinais do parasita, uma vez que se ligam de maneira seletiva à β -tubulina inibem sua polimerização nos microtúbulos e a captação de glicose levando a morte e expulsão do mesmo do hospedeiro (CARRANZA-RODRÍGUEZ et al., 2010). O tiabendazol atua sobre fêmeas partenogênicas inibindo as vias metabólicas do parasito e o albendazol age sobre as diferentes formas larvais do gênero diminuindo a produção de ATP essencial para sobrevivência e reprodução do mesmo através da inibição da captação de glicose que associa-se a depleção de glicogênio no organismo (BONA; BASSO, 2008). Ambas as drogas requerem múltiplas doses para atingir eficácia terapêutica e acarretam em diversos efeitos colaterais aos indivíduos (ADENUSI; OKE; ADENUSI, 2003).

A ivermectina, droga inicialmente de uso na medicina veterinária é bastante efetiva e segura no controle da estrogiloidíase em humanos, possui atividade antilarvária e atua imobilizando o parasito por meio da paralisia de sua musculatura, uma vez que ocasiona aumento da permeabilidade da membrana celular e criação de canais neuromusculares de cloro (AMATO NETO et al., 1997; TRACY; WEBSTER JR, 2005; CARRANZA-RODRÍGUEZ et al., 2010). Estudos demonstraram que a ivermectina é usada como tratamento de escolha na estrogiloidíase, visto que essa medicação leva a erradicação das larvas do parasito, apresenta melhor tolerabilidade e eficácia quando comparada aos benzimidazóis (ADELL; MÁRQUEZ, 2007; BISOFFI et al., 2011). É recomendada em dose

única de 200 µg/Kg por 1 ou 2 dias, por via oral (LUNA et al., 2007; COSTA-CRUZ, 2011). Embora a ivermectina cause efeitos adversos em menor frequência, o sistema nervoso central se torna o alvo primário destes (TRACY; WEBSTER JR, 2005; LUNA et al., 2007).

Amato Neto et al. (1997), demonstraram que ratos infectados experimentalmente com *S. venezuelensis* e tratados com ivermectina por via oral, apresentaram redução significativa nas formas larvárias e adultas. Em estudo realizado por Adenusi, Oke e Adenusi (2003), indivíduos diagnosticados com estrogiloidíase sem complicações receberam tratamentos com ivermectina em dose única e tiabendazol em três dias, foi demonstrado que os pacientes tratados com ivermectina apresentaram redução significativa da infecção e efeitos colaterais menos acentuados quando comparados aos tratados com tiabendazol, evidenciando vantagens do uso da ivermectina em relação ao outro fármaco.

Souza, Teixeira e Soares (2014) demonstraram que paciente com HTLV-1 e quadro de hiperinfecção apresentou resistência ao albendazol após administração de dois esquemas terapêuticos consecutivos, sendo então este substituído pela ivermectina em dose única, a qual foi responsável pela erradicação total do parasito constatada em um ano de acompanhamento.

Pacientes com a forma disseminada da estrogiloidíase frequentemente apresentam lesão na mucosa intestinal e, conseqüentemente, há uma redução na absorção dos anti-helmínticos (LUNA et al., 2007), diminuindo a biodisponibilidade das drogas administradas por via oral e, conseqüentemente, levando ao fracasso terapêutico (MANRIQUE-RODRÍGUEZ et al., 2016).

Salluh et al. (2005) demonstraram o caso de paciente imunodeprimido que desenvolveu a forma disseminada da estrogiloidíase, quando tratado com formulação veterinária da ivermectina por via subcutânea associada à administração via sonda nasoenteral apresentou uma melhora no quadro clínico sem observação de reações adversas. Moura et al. (2012) demonstraram falha da administração da ivermectina associada ao albendazol, administrados por sonda nasogástrica em paciente imunodeprimido que estava em suporte de ventilação mecânica sendo observado que após substituídos pela ivermectina administrada via subcutânea houve melhora do quadro do paciente e alta após 10 dias.

Donadello et al. (2013) também evidenciaram o tratamento da forma disseminada da estrogiloidíase em paciente que fazia uso de terapia imunossupressora com quadro de gastroparesia que recebeu administração da ivermectina subcutânea e, doze dias após a terapia houve eliminação total das larvas, no entanto, um mês após, o paciente acabou evoluindo para óbito por choque séptico. Apesar da formulação de ivermectina veterinária ter demonstrado boas perspectivas no tratamento de humanos quando aplicada por via parenteral em quadros

graves da doença, ressalta-se a necessidade de se realizar mais estudos clínicos que confirmem os resultados preliminares com o objetivo de obter a liberação do uso de anti-helmínticos por vias alternativas uma vez que os esquemas tradicionais são insuficientes nas formas graves da doença (LUNA et al., 2007; DONADELLO et al., 2013).

Ainda, estudos demonstraram que *S. stercoralis* apresenta resistência aos fármacos sintéticos disponíveis atualmente para o tratamento da estrogiloidíase, neste contexto, ressalta-se a necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas (GROVE, 1996; MARTÍN DEL BARCO et al., 2009). O desenvolvimento da resistência aos fármacos está associado com o uso indiscriminado destes, fazendo com que um estirpe de parasitos desenvolva a capacidade de tolerar doses consideradas letais (GEERTS; GRYSEELS, 2001).

Por se tratarem de medicamentos utilizados no controle de diversos helmintos, amplamente utilizados na medicina veterinária, o albendazol e a ivermectina tem sido alvos de estudos como o de Souza et al. (2008) que avaliaram a resistência anti-helmíntica de bovinos de 39 propriedades rurais do estado de Santa Catarina tratados com ivermectina, fosfato de levamisol e, sulfóxido de albendazol demonstrando resistência dos helmintos à ivermectina em 82,1% das propriedades analisadas. Outro estudo, realizado com animais da Europa também tratados com ivermectina demonstrou resistência do rebanho ao uso do medicamento quando comparada ao albendazol e, os autores sugeriram que a resistência apresentada pelos animais possa estar envolvida com o uso indiscriminado do fármaco na veterinária (DEMELER et al., 2009).

A busca por novas moléculas e compostos capazes de combater ou controlar parasitos e outros agentes causadores de doenças levou a criação de diversos medicamentos cada vez mais potentes para uso na medicina humana e veterinária, no entanto, a aplicabilidade de muitos destes tornou-se comprometida devido aos custos altos, efeitos adversos e aquisição da resistência pelos patógenos aos agentes terapêuticos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005), fazendo-se necessária a promoção de novas pesquisas que visem o desenvolvimento de medicamentos de baixo custo, menor toxicidade e, maior eficácia para o tratamento da estrogiloidíase.

1.9. Modelos experimentais para estudo da estrogiloidíase

As espécies de *S. venezuelensis* e *S. ratti* comuns em roedores, bem como *S. cebus*, parasita de macacos são utilizados como modelos experimentais para estudos da estrogiloidíase permitindo aos pesquisadores a elucidação de mecanismos moleculares

envolvidos na doença bem como a exploração da interação parasito-hospedeiro, além de possibilitar a ampliação ou criação de técnicas de diagnósticas, testes farmacológicos para potencialização das opções de tratamento, entre outros (CONWAY et al., 1994; MACHADO et al., 2001; COSTA-CRUZ, 2011).

O *S. venezuelensis* pode seguir dois ciclos distintos, o parasitário (homogônico) ou o de vida livre (heterogônico), de acordo com a Figura 4 (BAEK; ISLAM; KIM, 1998). Em roedores desencadeia o ciclo pulmonar de forma semelhante ao provocado pelo *S. stercoralis* nos humanos (BRAGA et al., 2011). As larvas L3 penetram na pele dos hospedeiros (roedores), sofrem mudas durante o trajeto no organismo, evoluem para fêmeas adultas no intestino delgado, onde postam ovos por partenogênese e, posteriormente estes são eliminados junto às fezes no meio ambiente podendo seguir o ciclo homogônico, no qual, os ovos evoluem para L3, ou o ciclo heterogônico com evolução para fêmeas e machos de vida livre, sendo este último menos frequente no desenvolvimento da espécie *S. venezuelensis*, diferente do que acontece com o *S. ratti* (HINO et al., 2014).

Quando comparado ao ciclo biológico do *S. ratti*, o *S. venezuelensis* apresenta maior similaridade ao de *S. stercoralis* mas tem duas particularidades após penetração das larvas pela pele do animal, sendo a primeira, a rota das larvas que no caso do *S. venezuelensis* migram por músculos e tecidos subcutâneos até atingirem os pulmões, seguirem pela traqueia, esôfago, estômago e depois chegarem à mucosa do intestino delgado, e a segunda, corresponde a eliminação do helminto que ocorre entre 12 à 14 dias após a infecção, ainda na fase aguda, não desencadeando a fase crônica (SATO; TOMA 1990; TAKAMURE, 1995). Além disso, o *S. venezuelensis* permite a visualização de mais formas larvais no intestino delgado bem como maior eliminação de ovos pelas fezes dos hospedeiros do que a espécie *S. ratti* (SATO; TOMA, 1990).

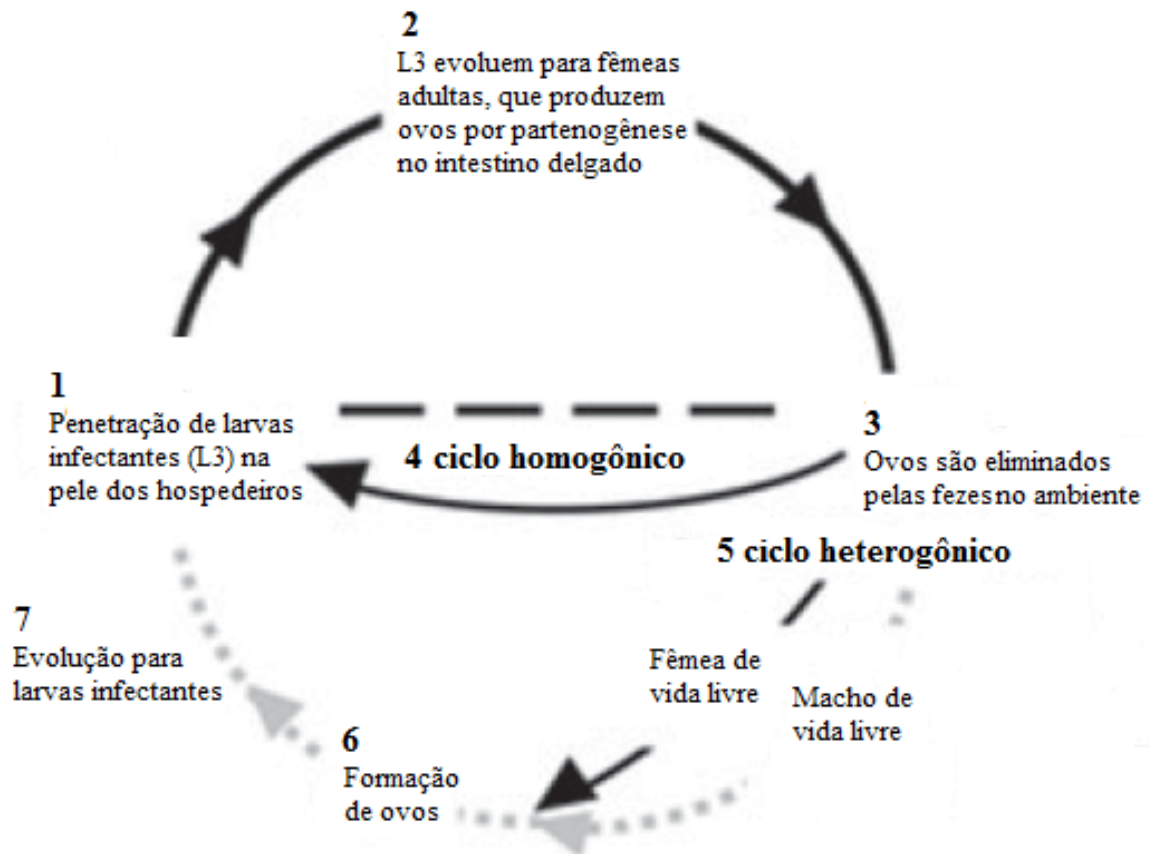


FIGURA 4 - Ciclo biológico *S. venezuelensis*. Fonte: Adaptado de Hino et al. (2014).

A espécie *S. venezuelensis* apresenta um ciclo biológico de fácil manutenção, o que permite que seja mantido em pequenos biotérios sendo capaz também de eliminar grande número de larvas filarioides em um curto período, o que contribui para o tornar modelo de preferência de pesquisadores, somado a isso, por se tratar de uma espécie específica de roedores, o mesmo diminui o risco de contaminação dos seus manuseadores (RIGO et al., 2008).

Uma das alternativas de aplicação desta espécie é para o fornecimento de extratos alcalinos de larvas filarioides usados como antígenos heterólogos para realização de ensaios que contribuem para o diagnóstico da estrogiloidíase (MACHADO et al., 2003). No caso de pesquisas envolvendo alternativas terapêuticas para a doença principalmente de produtos naturais, o *S. venezuelensis* foi escolhido como modelo experimental no trabalho de Bastos (2011) que testou *in vitro* compostos naturais sobre as fêmeas partenogênicas da espécie. Em outro estudo, larvas de terceiro estágio de *S. venezuelensis* e *S. ratti* foram usadas para avaliação *in vitro* do potencial nematicida de alcaloides isoquinolínicos da planta *Macleaya*

cordata (SATO et al., 2002). Ressalva-se, que são escassos os estudos sobre o uso destes modelos experimentais em testes *in vitro* ou *in vivo* com produtos naturais para o tratamento da estrogiloidíase.

1.10. Validação de plantas medicinais com atividades biológicas

A cultura de utilização de plantas medicinais é milenar, considerada uma das mais antigas formas de prática medicinal foi por muito tempo agregada somente a população indígena mas ganhou a atenção de outras populações, principalmente residentes de países em desenvolvimento que não contam com serviços de saúde eficientes e acabam por utilizar tais plantas para solucionar seus agravos de saúde (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; RODRIGUES; AMARAL, 2012). Em geral, estas plantas são usadas em forma de chás caseiros, extratos brutos ou fracionados, bem como através de preparações farmacológicas conhecidas como fitoterápicos (RATES, 2001).

Estudo realizado no Paquistão documentou o uso de plantas medicinais por uma comunidade indígena, registrando 106 espécies, das quais a comunidade geralmente extraiu as folhas e frutos para as aplicações terapêuticas e, pelo menos 44 das espécies identificadas foram usadas para desordens gastrointestinais, preparadas a partir da mistura com outros compostos como água, leite, óleo de mostarda, suco, chá ou manteiga e, administradas por via oral em 77% dos casos (AKHTAR et al., 2013).

Biswas et al. (2011) entrevistaram habitantes de dois vilarejos de Bangladesh, identificaram 51 espécies de plantas na comunidade, destas, as folhas foram as principais partes utilizadas (43%), preparadas em forma de sucos ou cozidas e, administradas por via oral, ou transformadas em pós e pastas para aplicações tópicas.

Na Calabria, sul da Itália, Passalacqua, Garrera e Fine (2007) entrevistaram mais de 100 residentes da região a fim de identificar as principais espécies de plantas usadas na medicina popular e, encontraram 104 espécies com diversas finalidades terapêuticas, como por exemplo, anti-inflamatórias, antibióticas, anti-reumáticas, vermífugas, para dores de cabeça e queimaduras, usadas geralmente em formas de infusão, decocção e, em alguns casos associadas à rituais espirituais.

No Brasil, as plantas intituladas medicinais são utilizadas na maioria das vezes em forma de preparações comercializadas de maneira aleatória, seja em mercados tradicionais ou feiras livres e, as informações terapêuticas sobre as mesmas são dissipadas por usuários ou comerciantes mesmo sem confirmações científicas, o que pode decorrer em problemas de

saúde pública, visto a possibilidade de toxicidade das mesmas quando utilizadas de forma incorreta (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Apesar das plantas serem utilizadas no controle das doenças humanas ou animais, durante séculos reportadas para diversos fins terapêuticos, os conhecimentos sobre a utilização são empíricos fazendo-se necessários estudos científicos para validação e uso correto de suas propriedades (AKHTAR et al., 2000; BASTOS, 2011). Estudos para comprovação das atividades biológicas das plantas medicinais são importantes uma vez que já se sabe que cerca de 25 a 30% dos medicamentos disponíveis no mercado são derivados de produtos naturais que são usados de forma direta ou indiretamente (RAMOS et al., 2008; RODRIGUES; AMARAL, 2012).

O Brasil, através do Ministério da Saúde tem formulado diretrizes e linhas de ação para a aplicação de plantas medicinais e fitoterápicas no Sistema Único de Saúde (SUS), objetivando a ampliação de acesso da população às mesmas, mas desde que antes sejam realizadas pesquisas que comprovem a eficácia, qualidade e segurança do uso destas (RODRIGUES; AMARAL, 2012).

Para a validação das atividades terapêuticas das plantas, segundo Camurça-Vasconcelos et al. (2005) faz-se necessário seguir algumas etapas como: seleção da planta, realizada através de levantamentos bibliográficos ou através de entrevistas nas comunidades, considerando o nome, fins terapêuticos, modos de preparação e administração bem como a frequência de utilização; bem como a realização de experimentos laboratoriais que compreendem os testes *in vitro* e *in vivo*.

Os testes *in vitro* são considerados como a etapa de triagem experimental, os quais permitem a seleção de plantas com melhor efeito terapêutico para então prosseguir a fase de testes *in vivo* em que são aplicadas doses do produto avaliado em animais infectados experimentalmente comparando-se com um grupo não tratado a eficácia ou toxicidade do mesmo (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

A atividade antiparasitária desempenhada por plantas medicinais corresponde a um dos campos de interesse dos pesquisadores que visa a avaliação do potencial de ação de extratos ativos das mesmas tanto na saúde humana quanto animal e, considerando isso, algumas espécies como a *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), *Piper tuberculatum* (pimenta longa), *Hura crepitans* (assacu ou açaçú), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e *Carapa guianensis* (andiroba) foram avaliadas *in vitro* no controle do nematódeo *Haemonchus contortus* e *in vivo* em camundongos infectados com *S. venezuelensis*, demonstraram que das

cinco plantas avaliadas, o hortelã-pimenta, a pimenta longa e alecrim-pimenta apresentaram bons resultados nos testes *in vitro* enquanto que *in vivo* apenas o alecrim-pimenta se destacou (CARVALHO et al., 2012).

Vasconcelos (2006) testou o desempenho do óleo essencial de *L. sidoides* (alecrim-pimenta) e *Croton zehntneri* (canela-brava) *in vitro* sobre ovos e larvas de *H. contortus* e *in vivo* sobre nematódeos intestinais de camundongos (*Syphacia obvelata* e *Aspicularis tetráptera*), demonstrou melhor atividade anti-helmíntica do *L. sidoides* quando comparado ao outro composto testado.

Macedo (2008) testou *in vitro* e *in vivo*, os óleos de *Eucalyptus citriodora* (eucalipto citriodora), *Eucalyptus globulus* (eucalipto comum) e *Eucalyptus staigeriana* (eucalipto staigeriana) em ovos e larvas de *H. contortus*. Egualé et al. (2007) também usou o nematódeo *H. contortus* para avaliar a ação do extrato de *Coriandrum sativum* (coentro), constataram que apesar do extrato apresentar atividade anti-helmíntica, esta não foi suficientemente eficaz.

Bastos (2011) buscou novas alternativas para o controle da estrogiloidíase, ao avaliar *in vitro* os extratos de 25 árvores frutíferas contra fêmeas de *S. venezuelensis* evidenciou que todos os extratos testados e suas frações apresentaram maior atividade anti-helmíntica quando comparados aos fármacos convencionais utilizados no tratamento da estrogiloidíase, destacando os extratos de *Spondias lutea* (cajá) e *Pouteria caimito* (abiu) que atingiram 100% de atividade em todas as concentrações testadas. Moraes (2017) demonstrou pela primeira vez *in vitro* o potencial anti-helmíntico da espécie *Carica papaya* sob ovos e larvas de *S. venezuelensis*. Grande parte das pesquisas que envolvem a busca por plantas anti-helmínticas é direcionada para o controle de nematódeos de importância veterinária, neste sentido, considerando o impacto da estrogiloidíase no âmbito da saúde pública, a realização de mais testes *in vitro* e *in vivo* com modelos experimentais como o *S. venezuelensis* é pertinente para a criação de novas alternativas terapêuticas.

1.11. *Siparuna guianensis*

Siparuna Aublet corresponde a um gênero de plantas da família Siparunaceae, possui como uma de suas espécies, a *Siparuna guianensis* (SG), um tipo de arbusto que apresenta cascas cinzas e lisas e, pode atingir de cinco a nove metros de altura, como ilustrado na Figura 5-A (VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010). É composta por folhas simples e lisas, flores unissexuadas dispostas em inflorescências hermafroditas de cor amarelo-esverdeada e, os frutos são arredondados de coloração verde quando jovens e de cor vinho

quando maduros com sementes em seu interior róseo-avermelhadas (Figura 5-B, C, D) (MONTANARI, 2010). A planta é uma angiosperma, típica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente por diversos nomes como “capitú” ou “negramina”, o que varia de acordo com a região ou país onde é encontrada (VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010; MONTANARI, 2010; ANDRADE et al., 2015).

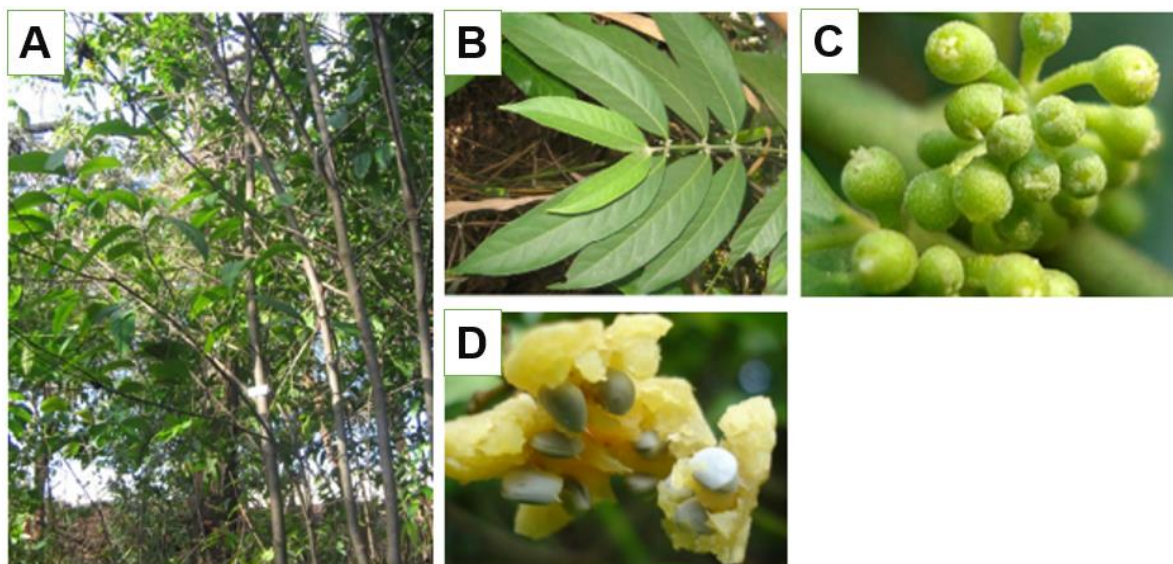


FIGURA 5 - A - Arbusto de SG; B, C e D – folhas, flores e frutos maduros de SG. Fonte: Adaptado de Valentini, Rodriguez-Ortiz, Coelho (2010); Silva, Valentini e Barros (2015).

É bastante usada na medicina popular em outros países, suas folhas são aplicadas em reumatismos, dores de cabeça ou para distúrbios estomacais, já no Brasil, suas folhas e flores são usadas por suas propriedades aromatizantes, estimulantes, anti-inflamatórias, diuréticas, contra desconfortos gástricos, gripes, resfriados, reumatismo, além de serem consideradas carminativas (ALVINO; SILVA; RAYOL, 2005; VALENTINI et al., 2009; VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010; AGUIAR, et al., 2015).

Índios Yanomani do Brasil, tradicionalmente fazem uso do aroma de suas folhas maceradas para alívio de congestionamentos nasais, resfriados, náuseas, dentre outras doenças (MILLIKEN; ALBERT, 1996). Souza e Felfili (2006) realizaram entrevistas com moradores do município de Alto Paraíso de Goiás para investigação de plantas medicinais utilizadas na comunidade e, dentre as espécies listadas está *S. guianensis* usada para tratamentos de dores de coluna, reumatismos e artrites.

Negri, Santi e Tabach (2012) avaliaram o extrato hidroetanólico de SG da região Amazônica, usada por populares como ansiolítica, demonstraram a presença de um tipo de flavonoide, propuseram que devido grande parte dos flavonoides exibirem atividades

antioxidantes, sedativas e ansiolíticas, a planta pode ser considerada como alternativa farmacológica no tratamento da ansiedade.

Por outro lado, Aguiar et al. (2015), analisaram os constituintes químicos do óleo das folhas, caule e frutos de SG e testaram *in vivo* a atividade larvicida, ovicida, adulticida e efeitos repelentes contra o *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, além da toxicidade celular da planta, constataram que o óleo da planta foi tóxico em todos os estágios de desenvolvimento de ambos os insetos e, propuseram à planta atividade inseticida.

Andrade et al. (2015) avaliaram atividades antibacterianas, antifúngicas e tripanocidas de óleo de *Cinnamodendron dinisii* (pimenteira) e SG, ambos os óleos apresentaram baixos efeitos inibitórios de bactérias, melhores efeitos sobre os fungos, sendo estes mais sensíveis a SG e, na atividade tripanocida, ambos apresentaram IC₅₀ menos efetivo quando comparado ao medicamento de escolha para o tratamento da doença de chagas.

A aplicação biológica de SG foi estudada por pesquisadores que através de experimentos comprovaram potenciais terapêuticos desta planta, no entanto, mais estudos são necessários principalmente no âmbito da atividade anti-helmíntica, uma vez que já houve eficiência demonstrada com outros tipos de parasitos.

1.12. Alfa bisabolol

O alfa bisabolol (α -bisabolol) é um álcool sesquiterpeno insaturado comumente usado em indústrias de cosméticos e farmacêuticas extraído do óleo essencial de diferentes espécies de plantas como *Matricaria recutita* (camomila) e, *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz (Candeia) (DARRA et al., 2008; DIAS, 2009; ROCHA et al., 2011; SOUZA, 2014). Também foi descrito como constituinte predominante do óleo essencial de folhas de SG no estado de Minas Gerais-MG (DINIZ, 2014).

É usado na indústria cosmética como produto natural modificado quimicamente, sendo descrito previamente a modificação de sua molécula para a criação de novas estruturas que propiciam diversas aplicações biológicas para o álcool (NOVAES, 2013). A ampla aplicação na área cosmética é decorrente de suas propriedades anti-irritantes, anti-inflamatórias e anti-microbianas já relatadas (DARRA et al., 2008). Ainda de acordo com os autores, atividades anti-tumorais e fungicidas também foram atribuídas às plantas medicinais que apresentam sesquiterpenos como constituintes químicos.

Diniz (2014) verificou atividade carrapaticida do α -bisabolol em ensaios com *Rhipicephalus microplus*, conhecido como “carrapato do boi”, constatou eficiência nas

amostras testadas com maior concentração deste constituinte. Nogueira (2000) saponificou o óleo de candeia, deu origem à fração de α -bisabolol e, então avaliou a fração quanto a capacidade de proteção ulcerogênica, demonstrou aumento da produção de muco protetor aderido à parede gástrica dos modelos experimentais tratados, sugerindo efeito gastroprotetor do α -bisabolol.

Cavalieri et al. (2011) testou *in vivo* o potencial pró-apoptótico do α -bisabolol em células primárias de leucemia aguda, evidenciaram que independente das concentrações utilizadas, o mesmo apresentou-se como forte agente pró-apoptótico, sugerindo o mesmo como um composto promissor no tratamento de leucemias agudas.

Outras atividades recentemente investigadas sobre a ação do α -bisabolol relaciona-se à sua atividade leishmanicida, destacando pesquisa realizada por Rottini et al. (2015) que avaliaram a atividade do alfa bisabolol contra promastigotas e o estágio amastigota intracelular de *Leishmania amazonensis*, demonstraram inibição de 50% de ambas as formas ocasionada pela ação do composto bem como a capacidade do mesmo em atravessar a membrana celular e destruir as formas amastigotas intracelulares. Morales-Yuste e colaboradores (2010) também provaram a partir de ensaios *in vitro* a inibição de 100% das formas prosmatigotas do *L. infantum* a partir da fração de α -bisabolol, sugerindo, que o mesmo pode ser uma nova alternativa terapêutica no tratamento da leishmaniose ocasionada por *L. infantum*.

O aparecimento de microrganismos resistentes aos diversos medicamentos disponíveis no mercado bem como efeitos adversos ocasionados por estes fez com que pesquisadores retomassem o interesse ao desenvolvimento de fármacos a partir de fontes vegetais (BISWAS et al., 2011). De acordo com Souza (2014) o α -bisabolol é um composto bioativo apresenta diversas propriedades biológicas, porém ainda é pouco explorado, neste sentido, a realização de estudos com o mesmo para a investigação das propriedades terapêuticas em doenças parasitárias, como por exemplo, a estrogiloidíase é relevante diante do cenário da saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar *in vitro* o potencial anti-helmíntico do extrato etanólico, frações acetato de etila, fração aquosa e óleo essencial de SG, bem como o α -bisabolol isolado no controle de *S. venezuelensis*.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar por testes *in vitro* o potencial ovicida e larvicida do extrato etanólico, de suas frações, do óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado contra espécimes de *S. venezuelensis*;
- Identificar as concentrações do extrato etanólico, frações e óleo essencial de SG bem como do α -bisabolol isolado com melhores potenciais nematocidas em relação aos controles positivos;
- Verificar alterações produzidas pelo extrato etanólico, frações e óleo essencial de SG e pelo α -bisabolol isolado na parede do ovo e na cutícula da larva por microscopia óptica;
- Identificar constituintes químicos do extrato etanólico e frações de SG por meio de triagem fitoquímica e análise de cromatografia em camada delgada que podem estar envolvidos na atividade anti-helmíntica.

3. METODOLOGIA

3.1. Local de realização dos experimentos

Os compostos derivados da planta SG utilizados nos experimentos foram gentilmente cedidos pelos colaboradores do curso de Química, professora Dra. Liliane Nebo e professor Dr. Claudinei Silva. O extrato etanólico, fração acetato de etila, fração aquosa e o óleo essencial de SG foram processados por alunos do curso de Química nos laboratórios de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal de Goiás (UFG), Regional Jataí-GO. O isolamento do α -bisabolol foi realizado pelo professor Claudinei na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais-MG. Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Parasitologia – Bloco de Biomedicina/Enfermagem da UFG, Regional Jataí-GO.

3.2. Produção e processamento do extrato etanólico e frações de SG

Foram selecionadas para coleta, folhas de meia idade e sem indícios de patógenos da planta SG coletadas na cidade de Jataí-GO. O material coletado foi herborizado conforme procedimentos usuais para cada grupo taxonômico. As identificações foram feitas com o auxílio da literatura específica, e as exsiccatas foram registradas e incorporadas aos acervos do Herbário Jataiense (HJ) da UFG, Regional Jataí. As folhas foram lavadas com água destilada e levadas à estufa a aproximadamente 45°C por três dias. Posteriormente, as folhas secas foram trituradas e divididas em duas partes para extrações, sendo cada submetida a um processo de extração via ultrassom com etanol. No total, foram realizadas cinco extrações, com tempo médio de quinze minutos para a primeira e 20 minutos para as demais extrações. Logo, a mistura foi filtrada à vácuo e, evaporada no rotaevaporador à 55°C. O extrato foi transferido para a capela em recipientes de vidro para completa evaporação do solvente.

O extrato etanólico de SG foi particionado da extração líquido-líquido para formação das frações acetato de etila e aquosa. Em funil de separação, o material foi suspenso em água e etanol na proporção 3:1, em seguida, foi acrescentado inicialmente o solvente hexano. Após a separação das fases (orgânica e aquosa), a fração hexânica foi reservada e a solução etanol/água foi então particionada novamente com o solvente acetato de etila. Por fim, separou-se a fração acetato de etila da fração aquosa e, estas foram colocadas em capela para evaporação do solvente.

O extrato etanólico bem como as frações foram colocadas separadamente em recipientes rotulados e armazenados em freezer (-20°C) até momento do uso.

3.3. Produção e processamento do óleo essencial de SG

Para a produção do óleo essencial, folhas de SG coletadas em São Miguel do Anta, estado de Minas Gerais-MG foram trituradas e submetidas a quatro horas de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. O óleo obtido foi recolhido juntamente com o hidrolato e extraído com diclorometano (3x10 mL) em funil de separação. As fases orgânicas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido sob baixa pressão à 40 °C, em evaporador rotativo. A massa do óleo essencial foi medida em balança analítica e os rendimentos expressos em relação à massa seca e em natura do material vegetal. A matéria seca foi determinada pela secagem de três alíquotas de aproximadamente 10g de cada amostra, em estufa a 103 ± 2 °C até massa constante (ASAE, 2000). Ao final, o óleo essencial foi acondicionado em recipientes de vidro, e mantidos em freezer (-20 °C) até o momento da realização dos ensaios.

3.4. Isolamento do α -bisabolol

Para isolar o α -bisabolol utilizou-se o óleo essencial das folhas de SG coletadas em São Miguel do Anta, estado de Minas Gerais-MG. O isolamento se deu a partir de uma coluna cromatográfica (36cm×18mm) empacotada com sílica gel, segundo metodologia de Diniz (2014). Foram pesados 0,2g de óleo essencial de SG e aplicados no topo da coluna. A eluição ocorreu em gradiente de hexano/éter etílico com as seguintes proporções: 10:0, 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5.

As frações obtidas foram avaliadas por cromatografia de camada delgada tendo como eluente hexano/éter etílico na proporção de 7:3 e o ácido fosfomolibdico como revelador. A identificação do α -bisabolol foi realizada por meio da cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas em comparação com um padrão de α -bisabolol cedido, previamente caracterizado pelo Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) da UFV. O α -bisabolol isolado por fim foi armazenado em freezer (-20 °C) até o momento dos ensaios.

3.5. Diluições dos compostos

A partir de uma solução estoque de extrato etanólico de SG na concentração de 20 mg/mL solubilizada em Dimetilsulfóxido (DMSO) 1% preparou-se as soluções que foram testadas nas concentrações de 1,0 mg/mL; 0,8 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,4 mg/mL e 0,2 mg/mL, todas solubilizadas em tampão fosfato salino (PBS).

O óleo essencial de SG e o α -bisabolol isolado foram solubilizados em DMSO 3% formando uma concentração de 7,0 mg/mL (solução estoque). A partir da solução estoque foram feitas as diluições finais nas concentrações de 1,0 mg/mL; 0,8 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,4 mg/mL e 0,2 mg/mL solubilizadas em PBS.

As frações acetato de etila e aquosa foram solubilizadas em DMSO 1% numa concentração de 20 mg/mL, da qual fez-se as concentrações de 0,8 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL. Todas as soluções foram armazenadas em tubos de ensaio de vidro devidamente tampados, identificados e, acondicionados em refrigeração até o momento dos testes.

3.6. Controles

Para avaliar o Teste de Eclosão de Ovos (TEO) foi utilizado como controle positivo o Albendazol na concentração de 0,025 mg/mL conforme Carvalho et al. (2012), e para o controle positivo do Teste de Motilidade Larval (TML) foi utilizada a Ivermectina na concentração de 316 ppm segundo Rebollo et al. (2003).

Como controles negativo, utilizou-se água filtrada e DMSO 1%. Optou-se por utilizar o DMSO 1% em todos os testes uma vez que após as diluições finais das soluções participantes em PBS, a concentração de DMSO não excedeu 1%.

3.7. Parasitos

A linhagem de *S. venezuelensis* usada foi isolada de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), mantida no município de Barra do Garças-MT. Parte das fezes obtidas dos gerbilos infectados foi utilizada para realizar o TEO e, a outra utilizada para realização do TML foi submetida à cultura em vermiculita por 72h em incubadora B.O.D. à 28 °C para obtenção das larvas filarioides (L3) (REZENDE, 2011).

3.8. Teste de eclosão de ovos

Para avaliar a atividade anti-helmíntica dos diferentes compostos de SG realizou-se o TEO segundo Coles et al. (1992) com algumas modificações. As fezes foram homogeneizadas em água filtrada e, após foram coadas utilizando-se peneira de 50 μm . Posteriormente, realizou-se a padronização da quantidade de ovos que obedeceu à quantidade de 50 ovos para 50 μL da solução testada. Foram adicionadas alíquotas de 50 μL da suspensão de ovos em microtubos tipo *ependorf* juntamente com 50 μL de extrato etanólico, fração acetato de etila, fração aquosa, óleo essencial de SG e alfa bisabolol separadamente. A suspensão de ovos foi incubada à 28°C em B.O.D. e, analisadas após 48 horas em microscópio óptico (aumento de 10 e 40 X) para contagem dos ovos e larvas de primeiro estágio.

3.9. Teste de motilidade larval

A avaliação da motilidade larval foi realizada de acordo com Cordeiro et al. (2010) com algumas modificações. As larvas L3 foram resgatadas a partir do método de Rugai, Matos e Brisola (1954) após decorridas 72 horas de incubação em B.O.D. à 28 °C em cultura de vermiculita. Posteriormente, fez-se a padronização da quantidade de larvas com aproximadamente 50 larvas para 50 μL da solução testada. Em microtubos tipo *ependorf* com 50 μL de suspensão de larvas adicionou-se 50 μL das soluções do extrato etanólico, fração acetato de etila, fração aquosa, óleo essencial de SG e alfa bisabolol isolado separadamente.

Logo, foram incubadas à 28°C em B.O.D. e, analisadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas após o início do teste em microscópio óptico para a contagem das larvas móveis e imóveis. As larvas que se apresentaram imóveis foram observadas de 3 a 5 segundos para classificação da imobilidade total.

3.10. Triagem fitoquímica do extrato etanólico e frações de SG

Após realização de todos os experimentos foi realizada a pesquisa de metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de SG e de suas frações, uma vez que não havia descrição prévia dos componentes químicos da planta localizada no município de Jataí-GO. O óleo essencial das folhas de SG coletadas em São Miguel do Anta por sua vez não passou

por testes de identificação de constituintes químicos, visto que, é conhecido que o mesmo é rico em α -bisabolol.

Foram realizadas reações de caracterização fitoquímica qualitativa e análise por cromatografia em camada delgada (CCD) segundo Barbosa (2004) com o extrato etanólico e frações aquosa e acetato de etila de SG. Os testes foram baseados na pesquisa de grupos químicos como: taninos, compostos fenólicos e, classe de flavonoides.

Para a identificação de taninos e compostos fenólicos, uma parte do extrato etanólico e das frações de SG foram dissolvidas em água destilada e, após uma ou duas gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3) à 1% foi adicionada. Neste teste usou-se uma solução padrão para comparação com a solução teste, sendo indicativo de reação positiva a mudança na coloração ou formação de precipitado. No teste de identificação de classe de flavonoides, uma parte do extrato etanólico e frações foram dissolvidas em 20 mL de água destilada e transferidas para tubos de ensaios com aproximadamente 3 mL da solução em cada tubo. Em um dos tubos realizou-se o teste de pH3 (ácido) enquanto que para os demais fez-se testes de pH 8,5 e 11 (alcalinos), os quais indicaram reação positiva através da variação da cor.

A análise por CCD foi feita a partir de placas de sílica gel, onde aplicou-se próximo a base com auxílio de tubos capilares, gotas do extrato etanólico e frações, em seguida, as placas foram colocadas em contato com uma mistura de solventes com diferentes graus de polaridade (hexano, acetato de etila, acetona e metanol). Posteriormente, foram expostas à luz UV (254 nm a 360 nm) e à vanilina ácida para avaliação qualitativa da reação.

3.11. Avaliação da eficácia dos compostos

Todos os testes foram realizados em duplicata com réplica. A eficácia do extrato etanólico, frações e óleo essencial de SG além do α -bisabolol isolado foi avaliada a partir da fórmula preconizada pela *World Association for the Advanced in Veterinary Parasitology* – W.A.A.V.P. (1995), que calculou a taxa de inibição da eclosão dos ovos (IEO), como visto a seguir:

$$\text{IEO (\%)} = \frac{\text{Número de ovos}}{\text{Número de ovos} + \text{Número de Larvas}} \times 100$$

As soluções também foram avaliadas quanto a eficiência apresentada na inibição da motilidade larval (IML) em relação ao controle negativo de água utilizando cálculo de

porcentagem pela fórmula de Schneider-Orelli (1947), adaptada de Al-Hofaai et al. (2013), como:

$$\text{IML}(\%) = \frac{\% \text{ de mortalidade no tratado} - \% \text{ de mortalidade no controle negativo}}{100 - \% \text{ de mortalidade no controle negativo}} \times 100$$

3.12. Análise estatística

O programa *GrafPad Prism*, versão 5.0 foi usado para análise dos dados. A eficiência dos compostos nos testes de inibição da eclosão dos ovos e inibição da motilidade larval foi avaliada por regressão não linear após transformação em base logarítmica dos dados para estimativa da concentração de inibição de 50% dos ovos e larvas (IC50). A análise da eficiência do TEO e TML entre as concentrações testadas e os controles positivos e negativos foi realizada pelo teste exato de *Fisher*. A comparação do padrão de contagem de larvas móveis e imóveis entre os tempos de análise e entre as diferentes concentrações testadas foi realizada através da análise de variância dos dados pelo *One-way ANOVA* e comparados pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do potencial ovicida e de inibição da eclosão dos ovos de *S. venezuelensis* do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado

A ação ovicida e de inibição dos três compostos analisados, extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado está representada na Tabela 1. Foi observada diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações do extrato etanólico de SG em relação ao controle negativo de água ($p < 0,05$) e nas concentrações de 1,0; 0,8 e 0,6 mg/mL em relação ao controle de DMSO 1% ($p < 0,05$).

TABELA 1 – Percentagem da taxa de inibição da eclosão de ovos de *S. venezuelensis* \pm erro padrão das médias das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado após incubação por 48 horas à 28°C.

Extrato etanólico de SG (mg/mL)	Taxa de inibição da eclosão dos ovos (%)
1,0	93,54 \pm 0,02 ^{a c}
0,8	89,57 \pm 0,32 ^{a c}
0,6	87,44 \pm 1,88 ^{a c}
0,4	84,91 \pm 0,65 ^a
0,2	84,43 \pm 2,70 ^a
Óleo essencial de SG (mg/mL)	
1,0	90,06 \pm 0,06 ^{a c}
0,8	84,69 \pm 2,67 ^a
0,6	81,95 \pm 3,93 ^a
0,4	80,96 \pm 0,96
0,2	80,04 \pm 1,88
α-bisabolol isolado (mg/mL)	
1,0	90,56 \pm 1,44 ^{a c}
0,8	87,64 \pm 0,27 ^a
0,6	87,43 \pm 0,22 ^a
0,4	83,25 \pm 0,08 ^a
0,2	83,25 \pm 1,76 ^a
Água	62,76 \pm 1,94
Albendazol 0,025 mg/mL	94,42 \pm 0,10
DMSO 1%	69,41 \pm 1,17

Letras nas linhas apontam significância estatística ($p < 0,05$) dos testes em relação aos controles de água ^a; albendazol ^b e DMSO 1% ^c.

Ao avaliar a ação do óleo essencial de SG verificou-se diferença estatística significativa em relação aos controles negativos utilizados (água e DMSO 1%) somente na comparação com a concentração de 1,0 mg/mL ($p < 0,05$). Da mesma forma, a maior

concentração testada do α -bisabolol isolado mostrou-se diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação aos dois controles negativos.

O controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL exibiu 94,42% de efetividade no TEO. Não foi observada diferença estatística significativa nas diferentes concentrações testadas dos três compostos em relação ao albendazol. Não foi observada diferença estatística significativa entre a comparação dos controles negativos de água e DMSO 1% ($p > 0,05$), porém, tanto a água quanto o DMSO 1% apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL ($p < 0,05$).

Os testes de inibição da eclosão dos ovos de *S. venezuelensis* realizados com diferentes concentrações do extrato etanólico de SG não demonstraram eficácia do tipo concentração dependente, visto que, a menor concentração não apresentou diferença estatística significativa da maior concentração testada ($p > 0,05$), constatação essa também evidenciada nos testes com o óleo de SG ($p > 0,05$) e o α -bisabolol isolado ($p > 0,05$) respectivamente.

O IC₅₀ para os diferentes compostos testados foi calculado e, indicou para a inibição de 50% da eclosão dos ovos de *S. venezuelensis* a concentração de 4,90 mg/mL de extrato etanólico de SG, de 1,56 mg/mL de óleo essencial de SG e 1,21 mg/mL de α -bisabolol isolado.

4.2. Avaliação do desenvolvimento dos ovos de *S. venezuelensis* tratados com diferentes concentrações do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado

O desenvolvimento e formação de larvas no interior dos ovos foi avaliado nas diferentes amostras incubadas. Verificou-se que os três compostos, extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado, independentemente das concentrações testadas ocasionaram alterações morfológicas nos ovos de *S. venezuelensis* assim como o controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL. Foram encontrados poucos ovos larvados após o tratamento com o extrato etanólico, óleo essencial, α -bisabolol isolado e controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL quando comparados aos controles (água e DMSO 1%).

Em relação ao três compostos analisados, observou-se que os ovos tratados com o extrato etanólico de SG adquiriram aspecto oval quando comparados aos controles negativos, com aumento da espessura da parede e, em seu interior, as larvas perderam totalmente suas características morfológicas (Figura 6-A). Os ovos tratados com óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado apresentaram externamente formato esférico ou oval, espesamento da casca, enrugamento da membrana e, internamente houve degradação das larvas L1 (Figura 6-B,C).

Nos três compostos, as larvas L1 originadas a partir da eclosão dos ovos apresentaram enrugamento das cutículas, mas nenhuma outra alteração foi constatada.

Os respectivos controles de água e DMSO 1% utilizados para a realização do TEO não interferiram na integridade dos ovos mantendo suas características morfológicas preservadas (Figura 6-D, E). Observou-se também maior número de ovos larvados nos controles (água e DMSO 1%), sem comprometimento às larvas no interior destes. Diferentemente, o controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL provocou alterações nos aspectos morfológicos dos ovos e na formação das larvas L1 visto que durante as análises por microscopia óptica, os ovos apresentaram enrugamento da parede, perda da forma elíptica e consequente redução do tamanho e, as larvas no interior estavam totalmente fragmentadas, como demonstrado na Figura 6-F.

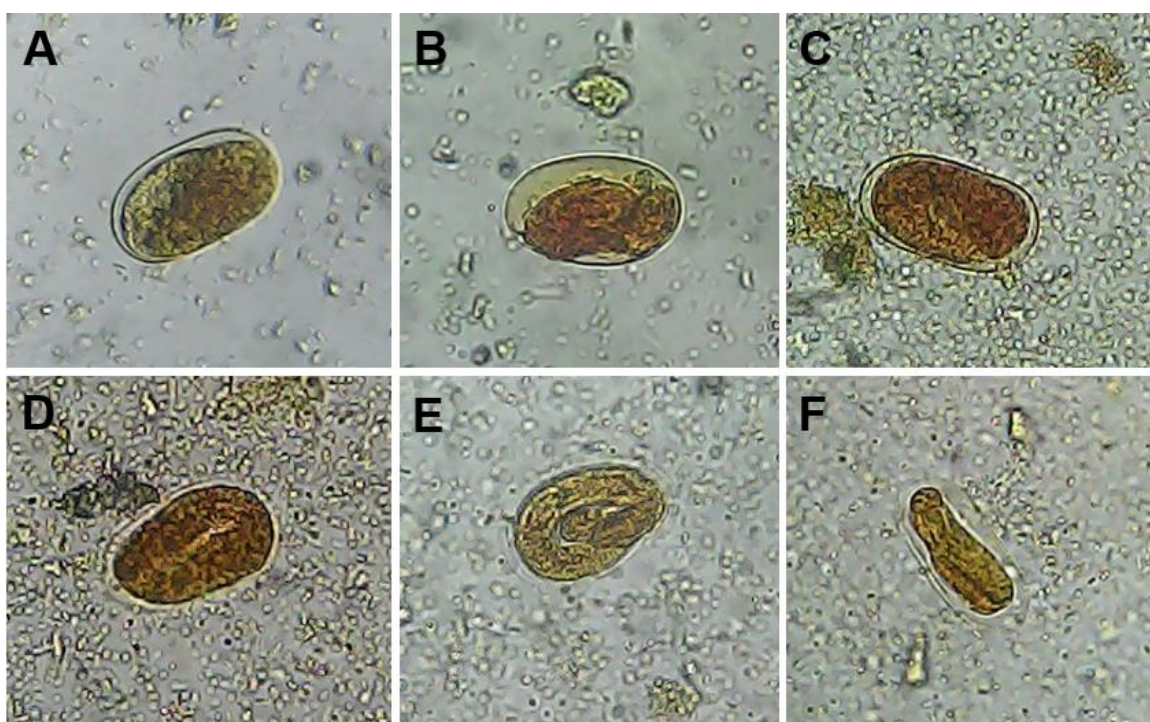


FIGURA 6 – Aspectos morfológicos dos ovos de *S. venezuelensis* observados durante o TEO utilizando 1,0 mg/mL dos compostos: extrato etanólico de SG (A); óleo essencial de SG (B); e α -bisabolol isolado (C) em relação aos controles de água (D) e DMSO 1% (E) e, o controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL (F).

4.3. Ação larvicida e de inibição da motilidade larval do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado contra *S. venezuelensis*

O extrato etanólico e o óleo essencial de SG bem como o α -bisabolol isolado foram testados *in vitro* com larvas L3 de *S. venezuelensis* e analisados em diferentes tempos, sendo 24, 48 e 72h. Os três compostos analisados não demonstraram relação tempo dependente,

sendo assim, os resultados foram representativos apenas da análise de 24h. Dentre os compostos analisados, apenas o bruto etanólico de SG foi capaz de inibir até 100% da motilidade larval na primeira avaliação de 24 horas, conforme Figura 7. O IC₅₀ para o extrato de SG foi correspondente à concentração 0,08 mg/mL, enquanto que para o óleo essencial foi de 8,71 mg/mL e α -bisabolol isolado 1,51 mg/mL.

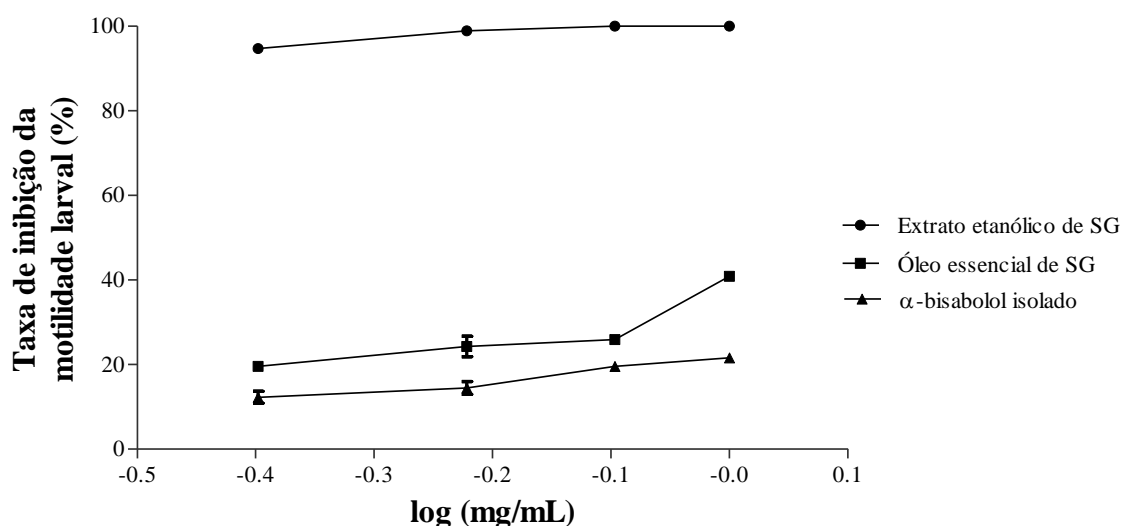


FIGURA 7 – Curva de dose resposta representada pela taxa de inibição da motilidade larval \pm erro padrão da média das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado com as larvas de *S. venezuelensis* após 24 horas de incubação.

Os controles de água e DMSO 1% apresentaram inibição da motilidade larval em 3,76% e 3,68%, respectivamente (Figura 8). O controle positivo representado pela Ivermectina 316 ppm, foi responsável por inibir 100% da motilidade larval. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a atividade desempenhada pelo controle positivo em comparação aos controles negativos, diferença essa não encontrada quando as amostras incubadas com água foram comparadas com as incubadas com o DMSO 1% ($p > 0,05$).

Ao avaliar o potencial de inibição da motilidade larval apresentada pelo extrato etanólico de SG, observou-se diferença significativa quando comparado aos controles de água e DMSO 1% ($p < 0,05$). Quanto ao controle positivo de Ivermectina, houve diferença estatística significativa somente em relação a menor concentração testada (0,2 mg/mL) do extrato etanólico de SG.

Ao comparar todas as concentrações testadas, verificou-se que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a concentração de 0,2 mg/mL em relação as maiores (0,8 mg/mL e 1,0 mg/mL) configurando efeito concentração dependente do extrato etanólico de SG.

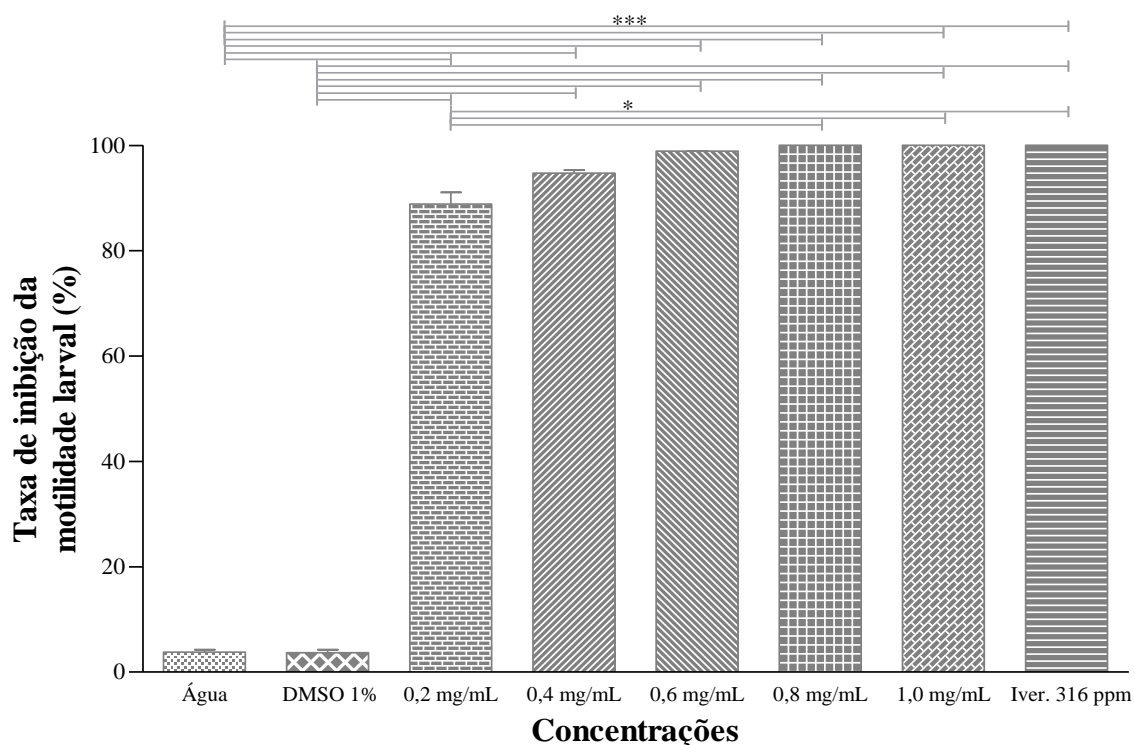


FIGURA 8 – Taxa de inibição da motilidade das larvas de *S. venezuelensis* apresentada pelas concentrações testadas de extrato etanólico de SG em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e controle positivo de Ivermectina (Iver.) 316 ppm.

Diferentemente do extrato etanólico de SG, o óleo essencial de SG alcançou em sua concentração máxima (1,0 mg/mL) apenas 40,90% de inibição da motilidade larval. Todas as concentrações testadas apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle positivo de Ivermectina 316 ppm, não superando a atividade apresentada por este, conforme Figura 9.

As diferentes concentrações testadas do óleo essencial de SG foram superiores aos controles negativos com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Verificou-se diferença estatística significativa ao comparar as concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL em relação a concentração de 1,0 mg/mL ($p < 0,05$) configurando efeito concentração dependente do óleo essencial de SG.

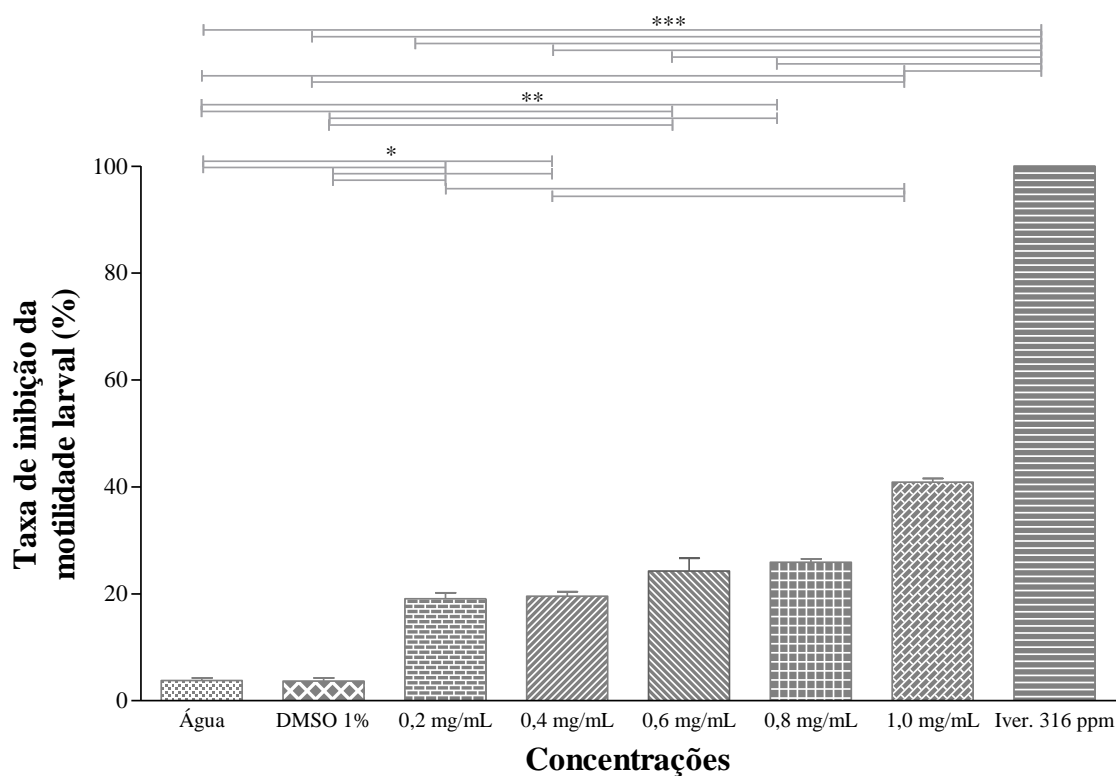


FIGURA 9 – Taxa de inibição da motilidade das larvas de *S. venezuelensis* apresentada pelas concentrações testadas de óleo de SG em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e controle positivo de Ivermectina 316 ppm.

O α -bisabolol isolado a partir do óleo essencial de SG apresentou atividade inferior aos demais compostos, como demonstrado na Figura 10. Nos testes realizados, apenas as concentrações de 1,0 mg/mL e 0,8 mg/mL apresentaram efeito superior aos controles de água e DMSO 1% com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Ao serem comparadas com o controle positivo, todas as concentrações do α -bisabolol demonstraram efeito inferior ao da ivermectina ($p < 0,05$). As concentrações testadas do α -bisabolol isolado não apresentaram efeito concentração dependente quando comparadas entre si.

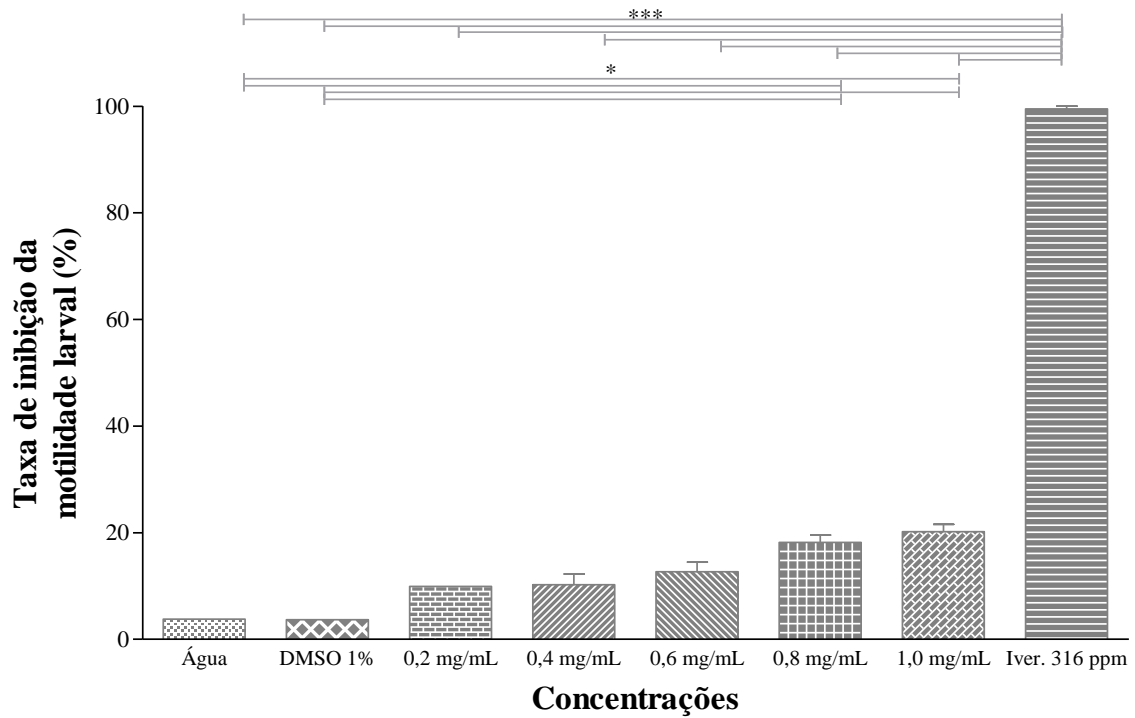


FIGURA 10 – Taxa de inibição da motilidade das larvas de *S. venezuelensis* apresentada pelas concentrações testadas de α -bisabolol em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e controle positivo de Ivermectina 316 ppm.

Quanto ao percentual da eficiência de inibição dos três compostos, verificou-se que o extrato etanólico de SG foi o único que apresentou em sua menor concentração eficiência de 88,45% ($\pm 2,21$), chegando à 100% na concentração de 0,8 mg/mL. Por outro lado, o óleo essencial em sua maior concentração atingiu 38,59% ($\pm 0,67$) de eficácia, enquanto que o α -bisabolol apresentou atividade bem inferior na concentração de 1,0 mg/mL quando comparado aos outros compostos, conforme demonstrado na Tabela 2.

TABELA 2 – Percentual da eficiência de inibição da motilidade das larvas de *S. venezuelensis* representada por média das diferentes concentrações analisadas de extrato etanólico de SG, óleo essencial de SG e α -bisabolol isolado \pm erro padrão da média após incubação por 24 horas à 28°C.

Extrato etanólico de SG (mg/mL)	Eficiência (%)
1,0	100,00 \pm 0,00
0,8	100,00 \pm 0,00
0,6	98,89 \pm 0,02
0,4	94,54 \pm 0,58
0,2	88,45 \pm 2,21
Óleo essencial de SG (mg/mL)	
1,0	38,59 \pm 0,67
0,8	23,01 \pm 0,64
0,6	21,30 \pm 2,41
0,4	16,44 \pm 0,83
0,2	15,93 \pm 1,11
α-bisabolol isolado (mg/mL)	
1,0	18,53 \pm 0,39
0,8	16,43 \pm 0,22
0,6	11,14 \pm 1,52
0,4	8,85 \pm 1,41
0,2	6,39 \pm 3,17
Água	0,00 \pm 0,50
Ivermectina 316 ppm	100 \pm 0,00
DMSO 1%	0,00 \pm 0,59

4.4. Efeito do extrato etanólico de SG na morfologia das larvas de *S. venezuelensis*

Ao avaliar as alterações morfológicas ocasionadas nas larvas de *S. venezuelensis* pela exposição aos diferentes tratamentos evidenciou-se que o extrato etanólico de SG foi o único que promoveu alterações na morfologia das mesmas. Constatou-se que a maior concentração (1,0 mg/mL) do extrato etanólico ocasionou efeitos progressivos no decorrer de 72 horas de incubação e, mais agressivos do que os efeitos do controle positivo de ivermectina, como demonstrado na Figura 11.

Na análise de 24 horas, 100% das larvas expostas as concentrações mais altas do extrato etanólico de SG já estavam mortas, mas mantinham preservação do formato, cutícula íntegra e internamente era possível visualizar seus órgãos, embora não tenha sido possível identificar o grau de acometimento dos mesmos (Figura 11-A).

Em 48 horas após a incubação, as larvas mortas iniciaram processo de estreitamento e fragmentação interna que se estendeu ao longo do terço médio inferior das mesmas (Figura

11-B). Posteriormente, em 72 horas, notou-se que internamente já não havia nenhum órgão preservado, com degradação interna total e acometimento externo da cutícula (Figura 11-C).

Quanto ao controle positivo de ivermectina foi possível constatar alterações externas como o enrugamento da cutícula (Figura 11-D, E, F), mas a visualização por microscopia óptica não permitiu inferir se houve degradação da mesma, como observado no extrato etanólico. Por outro lado, os tratamentos com os controles água e DMSO 1%, em todos os tempos analisados (24, 48 e 72 horas) não causaram alterações morfológicas nas larvas de *S. venezuelensis*.

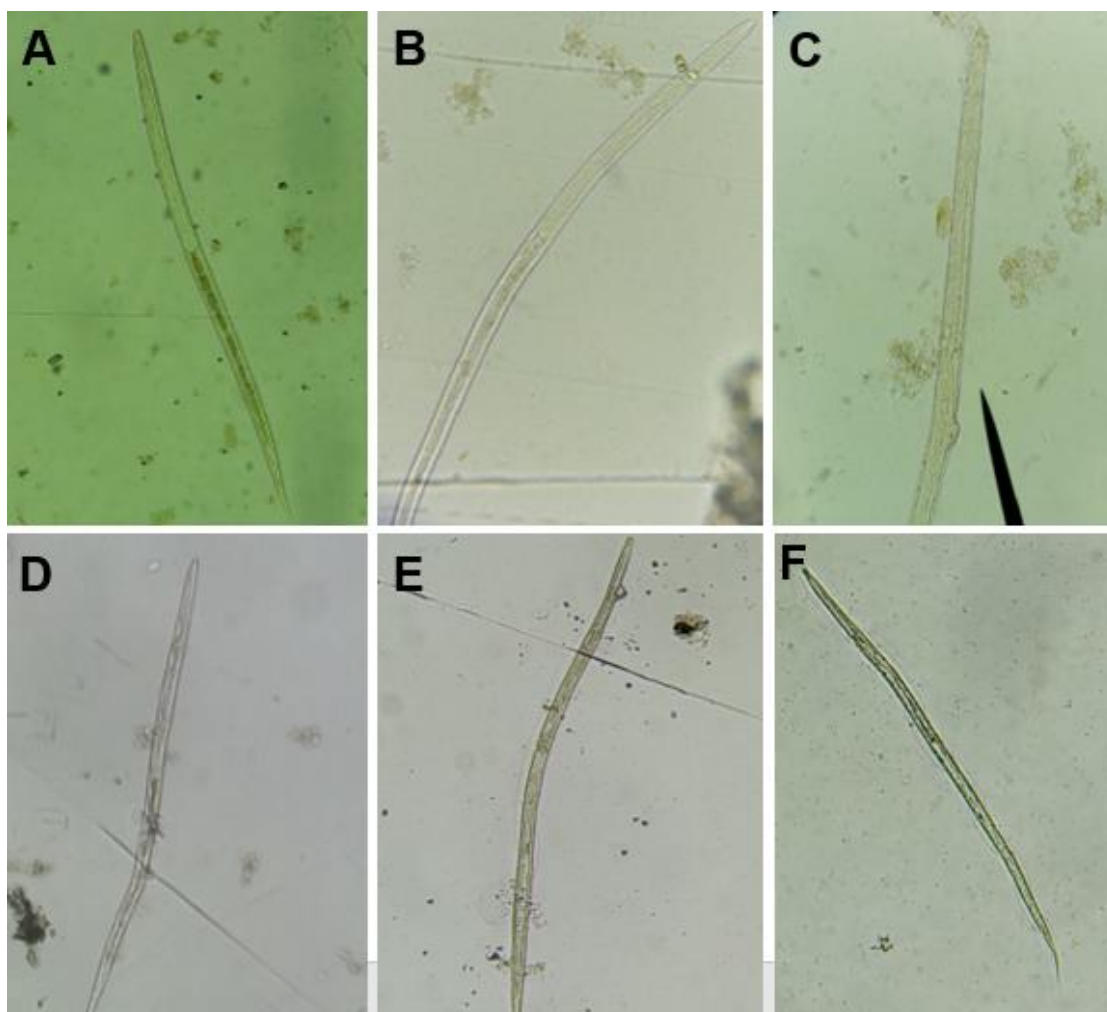


FIGURA 11 – Análise por microscopia óptica de larvas de *S. venezuelensis* tratadas com concentração de 1,0 mg/mL de extrato etanólico de SG em diferentes tempos, sendo 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C), comparadas com o controle positivo de ivermectina 316 ppm.

Considerando o objetivo de buscar componentes específicos envolvidos na atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de SG realizou-se fracionamento líquido-líquido deste que originou a fração acetato de etila e fração aquosa, as quais foram testadas para o TEO e TML.

4.5. Avaliação do potencial ovicida, de inibição da eclosão e desenvolvimento dos ovos de *S. venezuelensis* tratados com frações acetato de etila e aquosa de SG em relação ao extrato etanólico de SG

A análise do potencial ovicida e de inibição da eclosão dos ovos testados com a fração de acetato de etila e fração aquosa está representada na Tabela 3. Tanto a fração acetato de etila quanto a fração aquosa de SG apresentaram diferença estatística significativa em relação aos controles de água e DMSO 1% respectivamente na concentração de 0,8 mg/mL ($p < 0,05$).

O controle positivo de albendazol 0,025 mg/mL exibiu efetividade de 94,33% na inibição da eclosão dos ovos demonstraram equivalência às maiores concentrações (0,8 e 0,4 mg/mL) de ambas frações analisadas e, mostraram-se diferente estatisticamente das demais concentrações ($p < 0,05$).

TABELA 3 – Percentagem da taxa de inibição da eclosão de ovos de *S. venezuelensis* \pm erro padrão das médias das diferentes concentrações testadas da fração de acetato de etila e fração aquosa de SG oriundas do fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico de SG após incubação por 48 horas à 28°C.

Fração acetato de etila (mg/mL)	Taxa inibição da eclosão dos ovos (%)
0,8	91,52 \pm 2,00 ^{a c}
0,4	85,99 \pm 3,64 ^a
0,2	78,31 \pm 5,53 ^b
0,1	74,68 \pm 5,53 ^b
0,05	71,21 \pm 7,58 ^b
Fração aquosa (mg/mL)	
0,8	91,06 \pm 2,27 ^{a c}
0,4	88,83 \pm 1,46 ^a
0,2	73,49 \pm 0,09 ^b
0,1	70,92 \pm 3,59 ^b
0,05	70,77 \pm 6,06 ^b
Água	62,44 \pm 2,21
Albendazol 0,025 mg/mL	94,33 \pm 1,40
DMSO 1%	72,60 \pm 2,40

Letras nas linhas apontam significância estatística ($p < 0,05$) dos testes em relação aos controles de água ^a; albendazol ^b e DMSO 1% ^c.

A fração acetato de etila apresentou efeito concentração dependente após comparação entre as concentrações de 0,05 e 0,1 mg/mL em relação à 0,8 mg/mL. Ao comparar as concentrações testadas da fração aquosa observou-se diferença estatística significativa ($p <$

0,05) entre 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL em relação às maiores (0,4 e 0,8 mg/mL) configurando efeito concentração dependente.

Realizou-se o cálculo de IC₅₀ que indicou a concentração de 0,44 mg/mL da fração acetato de etila e 0,57 mg/mL da fração aquosa para a inibição da eclosão de ovos de *S. venezuelensis*.

A comparação do padrão de contagem de ovos e larvas apresentou diferença estatística significativa nos testes em concentrações equivalentes do extrato etanólico de SG em relação a fração acetato de etila ($p < 0,05$), o que não ocorreu na comparação com a fração aquosa ($p > 0,05$).

Os ovos de *S. venezuelensis* tratados com as diferentes concentrações da fração acetato de etila e fração aquosa foram avaliados quanto seu desenvolvimento e formação de larvas L1, como apresentado na Figura 12. Verificou-se que de forma semelhante ao observado nos ovos tratados com o extrato etanólico de SG, as frações oriundas deste composto também provocaram alterações morfológicas nos ovos após incubação por 48h. Foi observado o enrugamento da membrana externa dos ovos e deterioração do conteúdo interno que consequentemente interferiu na fase de blastomeração e formação de larvas L1 (Figura 12-A,B).

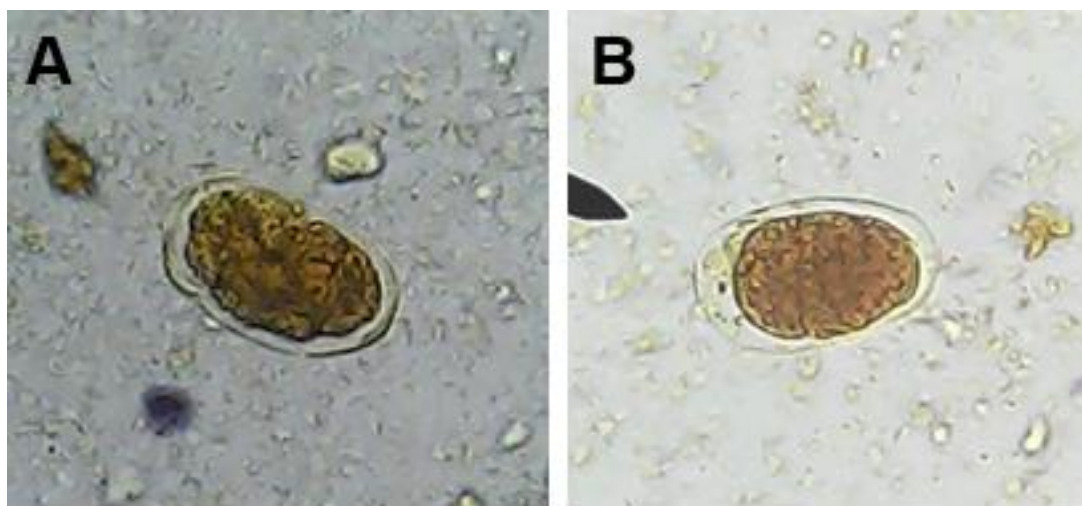


FIGURA 12 – Aspectos morfológicos dos ovos de *S. venezuelensis* observados durante o TEO. (A) fração acetato de etila (0,8 mg/mL); (B) fração aquosa (0,8 mg/mL).

4.6. Ação larvicida e de inibição da motilidade larval da fração acetato etila e fração aquosa em relação ao extrato etanólico de SG

Nos ensaios utilizando larvas L3 de *S. venezuelensis* observou-se que as frações acetato de etila e fração aquosa de SG não demonstraram relação tempo dependência, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre as análises de 24, 48 e 72h.

A fração acetato de etila apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à ambos os controles negativos com inibição da motilidade larval superior, como demonstrado na Figura 13. Todas as concentrações testadas mostraram efeito inferior ao controle positivo ($p < 0,05$), sendo observado 83,49% de inibição da motilidade larval na maior concentração da fração acetato de etila de SG. Houve efeito concentração dependente desta fração quando fez-se a comparação entre 0,8 mg/mL e as demais ($p < 0,05$).

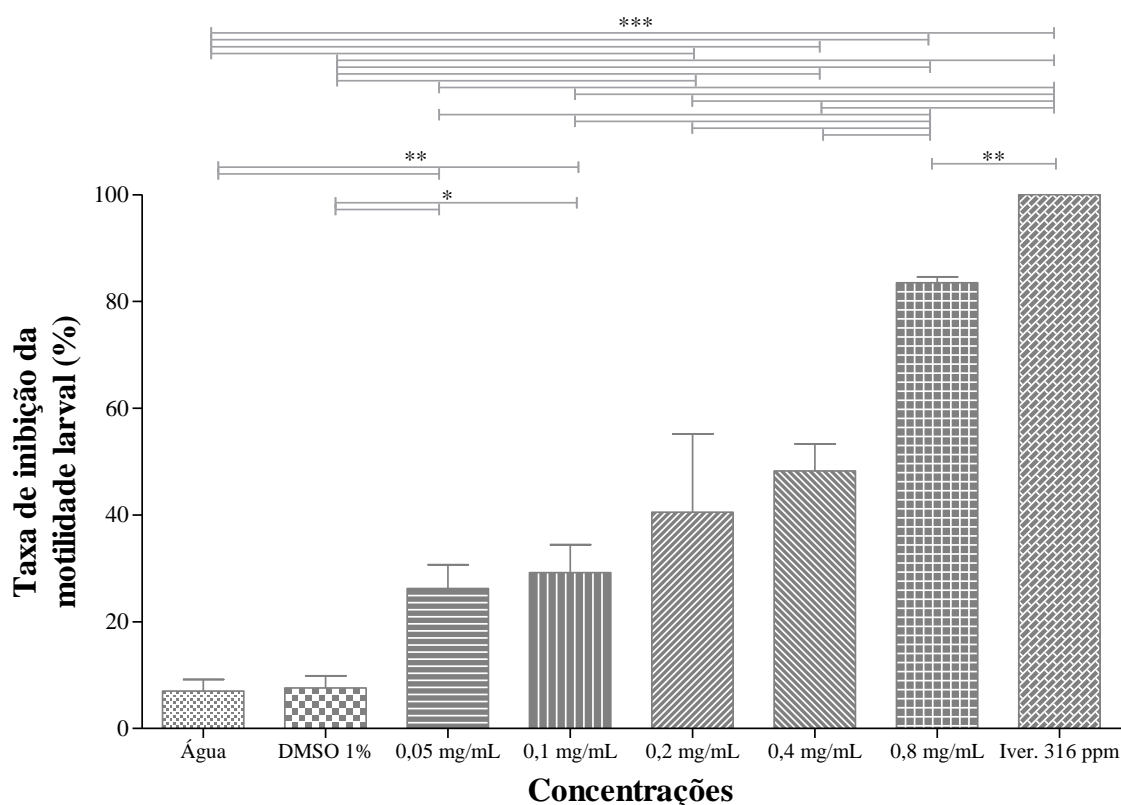


FIGURA 13 – Taxa de inibição da motilidade de larvas de *S. venezuelensis* apresentada pelas concentrações testadas da fração acetato etila em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e o controle positivo de Ivermectina 316 ppm.

A fração aquosa por sua vez apresentou 99,47% de inibição da motilidade larval na concentração de 0,8 mg/mL após análise de 24h, com equivalência ao observado no controle positivo, conforme Figura 14. Os controles (água e DMSO 1%) inibiram 7,04 e 7,27% da

motilidade larval respectivamente, ambos demonstraram diferença estatística significativa em relação à todas concentrações da fração aquosa de *S. guianensis* ($p < 0,05$) e ao controle positivo de ivermectina 316 ppm. Ao comparar as concentrações testadas verificou-se que a concentração de 0,8 mg/mL apresentou diferença estatística significativa em relação as demais ($p < 0,05$) com efeito concentração dependente.

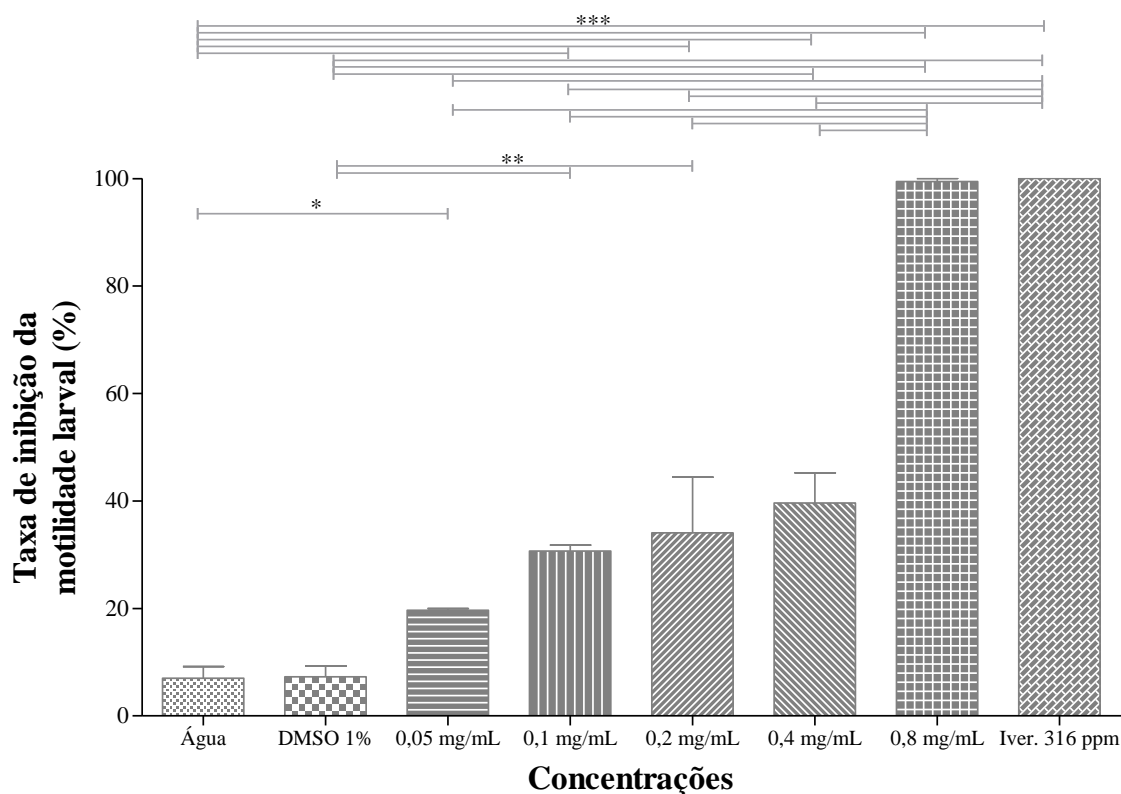


FIGURA 14 – Taxa de inibição da motilidade de larvas de *S. venezuelensis* apresentada pelas concentrações testadas da fração aquosa em comparação aos controles (água e DMSO 1%) e o controle positivo de Ivermectina 316 ppm.

O IC₅₀ calculado para as duas frações indicou a concentração de 0,078 mg/mL de fração acetato etila e 0,084 mg/mL da fração aquosa para inibição de 50% da motilidade larval. Em relação a análise da eficiência das frações testadas com as larvas L3 de *S. venezuelensis*, observou-se que apesar da maior concentração da fração acetato de etila ter atingido 82,23% ($\pm 1,13$) de eficiência, esta não foi equivalente ao controle positivo, conforme Tabela 4. Apenas a maior concentração da fração aquosa (0,8 mg/mL) resultou em 99,43 ($\pm 0,53$) de eficácia de forma semelhante ao observado com ivermectina 316 ppm que atingiu 100% ($\pm 0,00$) de inibição da motilidade larval.

TABELA 4 – Percentual da eficiência de inibição da motilidade das larvas de *S. venezuelensis* representada por média das diferentes concentrações analisadas da fração acetato de etila e fração aquosa \pm erro padrão da média após incubação por 24 horas à 28°C.

Fração acetato de etila (mg/mL)	Eficiência na inibição da motilidade larval (%)
0,8	82,23 \pm 1,13
0,4	44,33 \pm 5,08
0,2	36,02 \pm 14,69
0,1	23,81 \pm 5,26
0,05	20,63 \pm 4,47
Fração aquosa (mg/mL)	
0,8	99,43 \pm 0,53
0,4	35,07 \pm 5,60
0,2	29,06 \pm 10,39
0,1	25,41 \pm 1,15
0,05	13,56 \pm 0,35
Água	7,04 \pm 2,14
Ivermectina 316 ppm	100 \pm 0,00
DMSO 1%	7,27 \pm 2,01

Nos testes de motilidade larval, houve diferença estatística significativa entre as concentrações equivalentes da fração aquosa em relação ao extrato etanólico de SG ($p < 0,05$), enquanto que na fração acetato de etila não houve diferença ($p > 0,05$).

4.7. Triagem fitoquímica do extrato etanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de SG

A partir dos testes qualitativos de triagem fitoquímica realizados com extrato etanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de SG identificou-se a presença de taninos e compostos fenólicos nas três amostras, uma vez que após adição de FeCl_3 houve variação da cor para verde escura, conforme Figura 15.

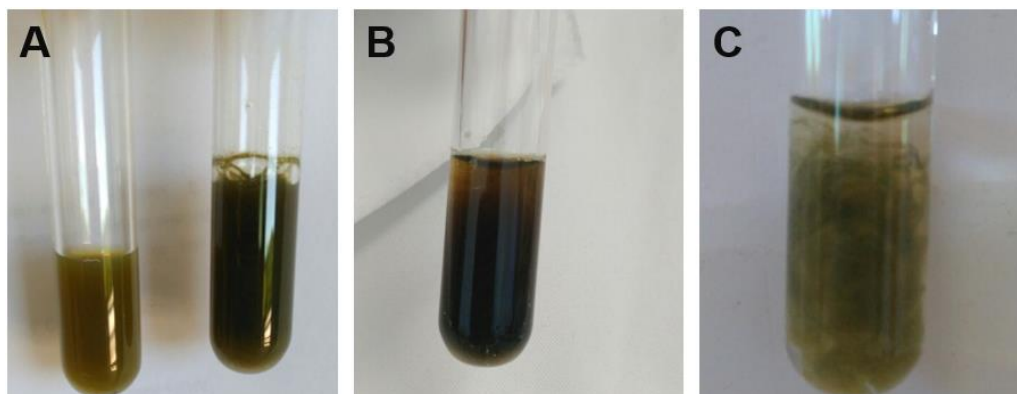


FIGURA 15 – Resultados dos testes de taninos e compostos fenólicos: (A) amostra com padrão do extrato etanólico de SG à esquerda e solução teste após adição de FeCl_3 à direita; (B) solução teste da fração acetato de etila após adição de FeCl_3 ; (C) solução teste da fração aquosa após adição de FeCl_3 .

Ao realizar os testes de pH para identificação de flavonoides nas três diferentes amostras constatou-se variação da coloração para laranja e amarelo no teste de pH 11, o que indicou a presença de classe de flavonoides como: flavonas, flavonóis e xantonas, como mostrado na Figura 16. Com exceção da fração acetato de etila, nas demais foram identificados também a classe de flavononóis. Nos testes com pH 3 e 8,5 não houveram variações de cor.

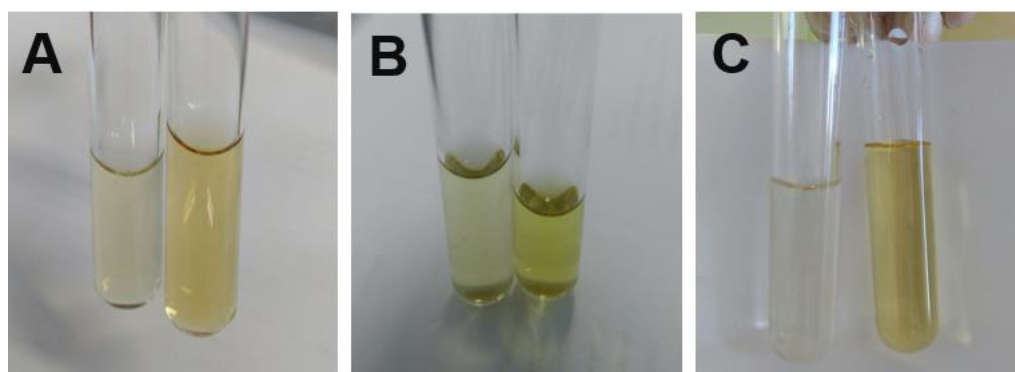


FIGURA 16 – Resultados dos testes para identificação de flavonoides: (A) padrão do extrato etanólico de SG à esquerda e solução teste após alcalinização à direita; (B) padrão da fração acetato de etila à esquerda e solução teste após alcalinização à direita; (C) padrão da fração aquosa à esquerda e solução teste após alcalinização à direita.

Em relação à cromatografia em camada delgada realizada, foi observado que o extrato etanólico de SG é constituído por metabólitos secundários polares de grau variado, enquanto que suas frações apresentaram polaridades mais altas.

5. DISCUSSÃO

A estrogiloidíase é uma doença cuja prevalência ainda permanece subestimada com índices de morbidade e mortalidade ainda pouco conhecidos, denotando grande importância na saúde pública (BISOFFI et al., 2013). A eficácia limitada dos medicamentos de primeira escolha em casos graves acabam aumentando a probabilidade de morte ocasionada pela doença (LUNA et al., 2007), processo que torna a busca por novos compostos de origem vegetal importante no sentido da produção de novos fármacos fitoterápicos eficientes no controle dessa parasitose.

A busca de medicamentos antiparasitários mais eficazes não é uma das prioridades do mercado farmacêutico, uma vez que, estas doenças parasitárias são prevalentes em países pobres onde a população não tem recursos financeiros suficientes para pagarem preços elevados em medicamentos (WINK, 2012). Por isso, as plantas medicinais por se tratarem de produtos menos onerosos e de fácil aquisição pela população podem ser estratégias alternativas mais efetivas para o controle das doenças parasitárias a partir do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (AKHTAR et al., 2000; RATES, 2001).

Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez a atividade anti-helmíntica *in vitro* da planta SG contra diferentes formas de *S. venezuelensis*. Utilizou-se nos testes, o extrato etanólico e frações, o óleo essencial bem como o α -bisabolol isolado, constituinte majoritário do óleo essencial conforme descrito previamente (MONTANARI, 2010).

Constatou-se a partir dos testes que o extrato etanólico foi capaz de inibir a eclosão de ovos bem como a motilidade de larvas da espécie. Esses achados são condizentes com outros pesquisadores que também avaliaram a atividade de plantas sobre *S. venezuelensis*, como Medeiros (2014) que testou o extrato etanólico e frações de *S. lutea* sob as fêmeas adultas e, Moraes (2017) que usou o látex de *C. papaya* e papaína purificada contra larvas L3 com resultados promissores. Existem poucos estudos direcionados a atividade anti-helmíntica *in vitro* das plantas contra o gênero *Strongyloides* sp., grande parte destes estão relacionados com a avaliação em outros nematódeos, como *Haemonchus contortus* (ADEMOLA; ELOFF, 2010; MACEDO et al., 2012; CALA et al., 2014).

Foi demonstrado, a partir de diferentes testes, a eficiência dos compostos da planta SG em baixas concentrações quando comparados a estudos prévios com *H. contortus* e outras plantas, como *Spigelia anthelmia* Linn. testada em concentrações de 3,1 à 50 mg/mL (ASSIS et al., 2003), *E. globulus* testado com concentrações de 2,71 à 21,75mg/mL na eclosão dos ovos e 2,71 à 43,5 mg/mL no desenvolvimento larval (MACEDO et al. 2009), além de

Lantana camara, *Alpinia zerumbet*, *Tagetes minuta* e *Coriandrum sativum* avaliadas em concentrações de 0,15 à 10 mg/mL no TEO e, 0,62 à 20 mg/mL no teste de desembainhamento artificial larval (MACEDO et al., 2012).

Nas diferentes testagens, a água filtrada e DMSO 1% utilizados como controles demonstraram inibição de uma parcela dos ovos, no entanto, a percentagem de inibição ocasionada por estes foi estatisticamente inferior aos compostos testados. Nos testes com larvas, os controles (água e DMSO 1%) mantiveram as larvas viáveis durante 72 horas de incubação. A inibição dos ovos verificada nos controles negativos foram justificadas pelo estudo de Baek; Islam; Matsuda (1998) que demonstraram que em temperatura ambiente o isolamento dos ovos de *S. venezuelensis* em solução salina compromete a viabilidade dos mesmos quando comparado à conservação em fezes devido a exposição à diferentes umidades, temperatura ou presença de produtos químicos. Os mesmos autores mencionaram que, no caso do isolamento de larvas em água ou em solução salina, a viabilidade é mantida por até 12 dias, pois a presença de substâncias orgânicas ou microrganismos no meio de isolamento servem como nutrientes para as larvas. Desta forma, entende-se que os controles negativos não interferiram na fidedignidade dos resultados apresentados.

Vasconcelos (2006), relata que os ovos de nematódeos quando são liberados pelas fezes passam por um processo de embrionamento rápido, sendo possível acompanhar o desenvolvimento e eclosão em microscópio 48 horas após a coleta, por isso, o tempo de interrupção da incubação do teste de inibição da eclosão dos ovos respeitou o processo de formação e desenvolvimento das larvas de primeiro estágio e, conseqüentemente foi condizente com a observação do número maior de ovos larvados nos controles de água e DMSO 1%.

Os diferentes derivados de SG apresentaram atividades eficientes no retardo da eclosão dos ovos de forma similar ao controle positivo de albendazol. Os testes mostraram que o extrato etanólico de SG ocasionou alterações morfológicas nos ovos com degradação interna total das larvas, as quais adquiriram aspecto de uma massa condensada, sugerindo que o composto atinge a larva dentro do ovo, característica essa também observada nas avaliações do óleo essencial e α -bisabolol isolado. Krychak-Furtado et al. (2011) afirmam que a eficiência ideal de um anti-helmíntico em testes de eclosão de ovos deve basear na capacidade do mesmo em impedir o prosseguimento da fase de blastomeração e formação das larvas, alterando assim o desenvolvimento normal dos ovos impedindo a eclosão e liberação das larvas de primeiro estágio, sendo assim, infere-se que os diferentes compostos interferiram na fase de blastomeração dos ovos analisados por microscopia óptica neste estudo. Tais

evidências supõem que os compostos apresentem ação semelhante ao albendazol avaliado por Sant'anna, Vommaro e Souza (2013) em ovos de *Caenorhabditis elegans*, o qual impediu a formação e desenvolvimento das larvas presentes nos ovos a partir de danos estruturais e degeneração de mitocôndrias.

Em relação a comparação nos testes de inibição da motilidade larval, o extrato etanólico de SG em baixas concentrações apresentou efeito superior ao óleo essencial e α -bisabolol isolado sendo capaz de ocasionar alterações na morfologia das larvas de *S. venezuelensis* quando analisada a maior concentração testada, assim como a ivermectina. Considerando que os mecanismos envolvidos na atividade de anti-helmínticos nas formas adultas estão relacionados com a promoção de paralisia muscular e/ou o déficit na oferta de nutrientes por falta de armazenamento de energia que leva a morte após exposição em 24 h (SIREESHA et al., 2013), os achados neste trabalho sugerem que o efeito apresentado pelo extrato etanólico na análise de 24 h reforça a potencialidade anti-helmíntica deste composto.

Segundo critérios preconizados pelo W.A.A.V.P (1995) um anti-helmíntico é considerado eficaz quando apresenta atividade de amplo espectro sobre formas larvais ou adultas ou atua sob uma área ainda não afetada por anti-helmínticos convencionais e, assim, sua eficácia é classificada como: moderada (80 – 89%), efetiva (90 – 98%) e altamente efetiva (> 98%). Desta forma, concentrações superiores a 1,0 mg/mL do extrato etanólico de SG devem ser usadas no TEO para manter potencial ovicida efetivo, enquanto que, para TML concentrações inferiores à 0,6 mg/mL podem ser suficientes para manter efeito equivalente ao apresentado pelo controle positivo.

Os efeitos biológicos desempenhados pelas plantas são atribuídos a presença dos metabólitos secundários (MACEDO, 2012). Considerando que o α -bisabolol é o contituente químico majoritário do óleo essencial de SG, sugere-se que ele seja o responsável pela atividade ovicida encontrada no óleo essencial, visto que testado isoladamente apresentou atividade equivalente, no entanto, quando testado contra as larvas, apresentou ação inferior, sugerindo que algum outro componente químico presente no óleo essencial atue em sinergismo com o α -bisabolol. Diferenças nas estruturas dos ovos e das larvas podem ter interferido na atividade apresentada pelo óleo essencial e α -bisabolol isolado atribuindo aos dois apenas atividade ovicida. De acordo com Vieira, Lima e Bessa (2006), o gênero *Strongyloides* sp. origina ovos com única camada delgada que forma a casca, enquanto que, as larvas possuem cutícula dupla, assim sendo, supõe-se que as larvas são mais resistentes do que ovos. Possivelmente, sejam necessárias concentrações mais elevadas de óleo essencial e α -bisabolol isolado para a inibição da motilidade larval.

Para melhor delineamento da ação anti-helmíntica de um produto natural é necessário realizar fracionamentos que visam o isolamento de agentes mais específicos, fundamental para o desenvolvimento de medicamentos (KAMARAJ; RAHUMAN, 2011; OLOUNLADÉ et al., 2012). Desta forma, considerando os resultados apresentados pelo extrato etanólico de SG, foi realizado nesse trabalho o fracionamento líquido-líquido deste que originou frações acetato de etila e aquosa, as quais também foram testadas com ovos e larvas L3 de *S. venezuelensis* em concentrações inferiores com o intuito de refinar o potencial anti-helmíntico prévio do extrato etanólico.

Ambas as frações demonstraram potencial ovicida com efeito na fase de blastomeração, porém, a fração aquosa se destacou da fração acetato de etila com equivalência ao controle positivo nos testes de inibição da motilidade larval. Na comparação entre as concentrações equivalentes das frações com o extrato etanólico, houve diferença estatística no padrão de contagem no TEO com a fração acetato de etila e, no TML houve diferença com a fração aquosa, inferindo-se que dois ou mais constituintes químicos presentes no extrato etanólico atuam em sinergismo e, após fracionamento, estes foram isolados propiciando a atividade observada nas frações. Esse resultado é condizente com estudo de Rates (2001), que afirmou que os efeitos biológicos dos extratos de plantas podem ser decorrentes do sinergismo entre os componentes químicos.

Considerando a importância da identificação dos metabólitos secundários, realizou-se a triagem fitoquímica tanto no extrato etanólico quanto nas frações de SG e, foi identificado compostos fenólicos, taninos e flavonoides. Os resultados corroboram com estudos prévios que também identificaram flavonoides em diferentes extratos das folhas de SG de outras regiões brasileiras, como por exemplo, a quercetina em plantas do Ceará (LEITÃO; EL-ADJI; MELO, 2005), e a Vicenin-2 nas plantas de Manaus (NEGRI; SANTI; TABACH, 2012). Costa (2017) avaliou também o extrato etanólico e frações acetato de etila e aquosa dos galhos de SG do município de Jataí, identificou compostos fenólicos, taninos em ambos os derivados da planta e, flavonoides na fração acetato de etila. Dentro do grupo de compostos fenólicos identificados no trabalho estão inclusos os flavonoides e taninos (COSTA et al., 2008; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012). Ressalta-se que a composição química das partes de SG como folhas, caule e frutos pode variar de acordo com o local de coleta e estação do ano (VALENTINI; RODRIGUEZ; COELHO, 2010) sendo possível encontrar diversidade entre os constituintes químicos assim como identificado na planta pesquisada.

A atividade ovicida e larvicida desempenhada pelas concentrações testadas do extrato etanólico e frações de SG possivelmente esteja relacionada com a ação de pelo menos um

grupo químico identificado no trabalho, como os taninos e flavonoides. Estudos anteriores relacionaram a presença de taninos condensados e de diferentes tipos de flavonoides em plantas com efeito sob ovos ou larvas de outros nematódeos (BARRAU et al., 2005; KOZAN; ANUL; TATLI, 2013; FEMEX et al., 2016). O mecanismo de ação envolvido na atividade anti-helmíntica dos flavonoides está relacionado com a capacidade de alterarem processos metabólicos ou a atividade enzimática dos parasitos (KERBOEUF; RIOU; GUÉGNARD, 2008). A ação dos taninos por sua vez depende do local onde se liga ao parasito ocasionando geralmente alterações em estruturas, como: cutícula externa, aparelho digestivo ou reprodutivo (HOSTE et al., 2006). Neste sentido, ressalva-se a necessidade do isolamento destes constiuintes químicos a fim de otimizar a atividade biológica observada no estudo.

Apesar das evidências desta pesquisa demonstrarem a potencialidade antiparasitária de SG *in vitro*, principalmente do extrato etanólico e suas frações nas diferentes formas de *S. venezuelensis*, novos estudos para isolamento dos componentes dos grupos químicos identificados bem como testes de toxicidade e ensaios *in vivo* são necessários, visto que os compostos naturais apresentam-se como alternativa terapêutica no âmbito da saúde pública para o controle da estrogiloidíase e outras parasitoses.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os diferentes compostos derivados da planta *S. guianensis* apresentaram potencial ovicida e larvicida, tendo em vista as alterações morfológicas ocasionadas nos ovos bem como nas larvas L3 de *S. venezuelensis* analisadas. Os efeitos observados apresentaram equivalência aos controles positivos, fármacos já utilizados no tratamento da estrogiloidíase, o que aponta a *S. guianensis* como uma nova alternativa terapêutica.

A identificação dos compostos fenólicos, taninos e flavonoides no extrato etanólico e frações corrobora com achados prévios e, demonstra a necessidade do isolamento dos princípios ativos bem como a realização testes *in vivo*, uma vez que a mesma poderá contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos para o controle da estrogiloidíase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHMAN, M. Z.; ZEEHAIDA, M.; RAHMAH, N.; NORSYAHIDA, A.; MADIHAH, B.; AZLAN, H.; NAZLEE, W. Z. Fatal septicemic shock associated with *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a case report and literature review. **Parasitology International**, v. 61, p. 508-511, set. 2012.
- ADEDAYO, O.; GRELL, G.; BELLOT, P. Hyperinfective Strongyloidiasis in the Medical Ward: Review of 27 Cases in 5 Years. **Southern Medical Journal**, v. 95, n. 7, p. 711-716, jul. 2002.
- ADELL, R. I.; MÁRQUEZ, V. D. Estrongiloidiasis: epidemiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. Experiencia en una zona endémica: la comarca de La Safor (Valencia). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Valencia, v. 25, n. 3, p. 38-44, out. 2007.
- ADEMOLA, I. O.; ELOFF, J. N. *In vitro* anthelmintic activity of Combretum molle (R. Br. ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.198-2013, 2010.
- ADENUSI, A. A.; OKE A. O.; ADENUSI A. O Comparison of ivermectin and thiabendazole in the treatment of uncomplicated human *Strongyloides stercoralis* infection. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 11, p. 465-469, nov. 2003.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, jan/mar. 2007.
- AGUIAR, R. W. S.; SANTOS, S. F.; MORGADO, F. S.; ASCENCIO, S. D.; LOPES, M. M.; VIANA, K. F.; DIDONET, J.; RIBEIRO, B. M. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negrámina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1-14, fev. 2015.
- AKHTAR, M. S.; IQBAL, Z.; KHAN, M. N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**, v. 38, n. 2, p.99-107, 2000.
- AKHTAR, N.; RASHID, A.; MURAD, W.; BERGMEIER, E. Diversity and use of ethno-medicinal plants in the region of Swat, North Pakistan. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 9, n. 25, p. 1-13, 2013.
- AL-ROFAAI, A.; RAHMAN, W. A.; ABDULGHANI, M. Sensitivity of two *in vitro* assays for evaluating plant activity against the infective stage of *Haemonchus contortus* strains. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p.893-898, 2013.
- ALVINO, F. O.; SILVA, M. F. F.; RAYOL, B. P. Potencial de uso das espécies arbóreas de uma floresta secundária, na Zona Bragantina, Pará, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 4, p. 413-420, 2005.

AMATO NETO, V.; CARIGNANI, F. L.; MATSUBARA, L.; BRAZ, L. M. A. Tratamento de ratos, experimentalmente infectados pelo *Strongyloides venezuelensis*, através da Ivermectina administrada por via oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, n. 30, n. 6, p. 481-584, nov/dez. 1997.

ANAMNART, W.; PATTANAWONGSA, A.; INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W. Albendazole stimulates the excretion of *Strongyloides stercoralis* larvae in stool specimens and enhances sensitivity for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4216-4220, nov. 2010.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; GOMES, M. S.; AZEREDO, C. M. O.; BATISTA, L. R.; SOARES, M. J.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 189-194, 2015.

ARAKAKI, T.; HASEGAWA, H.; ASATO, R.; IKESHIRO, T.; KINJO, F.; SAITO, A.; IWANAGA, M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, p. 11-17, 1988.

ASAE. American Society of Agricultural Engineers; Standards Engineering Practices Data, Moisture Measurement ASAE S358.2 DEC99, **Forages**, 2000.

ASSIS, L.M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S.; COSTA, C. T. C.; SOUZA, J. A. L. **Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus***. *Veterinary Parasitology*, v.117, p.43-49, 2003.

BAEK, B. K.; ISLAM, M. K.; KIM, J. H. Development of an *in vitro* culture method for harvesting the free-living infective larvae of *Strongyloides venezuelensis*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 15-22, mar. 1998.

BAEK, B. K.; ISLAM, M. K.; MATSUDA, K. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained *in vitro*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, n. 2, p. 99-107, jun. 1998.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomun* (Nematoden) Larven in Erdproben: Weltevreden. Geneesk Batavia. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

BARBOSA, W. I. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, E. C. C.; PINTO, L.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M; Manual para análise fitoquímica e cromatografia de extratos vegetais. **Revista científica da UFPA**. v. 4, 2004.

BARRAU, E. et al. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, v. 131, n. 4, p. 531-538, 2005.

BASTOS, L. A. D. **Efeito anti-helmintico dos extratos etanólicos das folhas de diferentes espécies de árvores frutíferas sobre *Strongyloides venezuelensis* in vitro**. Campinas, 2011. 89 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

BENINCASA, C. C. AZEVEDO, F. O.; CANABARRO, M. S.; VALENTIM, H. M.; SILVA, V. D.; SUPERTI, S. V.; DIAS, F. S. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*: Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 1, p. 413-415, jan/mar. 2007.

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; ANGHEBEN, A.; BOSCOLO, M.; ANSELMINI, 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. 1-6, jul. 2011.

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; MUÑOZ, J.; KROLEWIECKI, A. J.; GOTUZZO, E.; MENA, M. A.; CHIODINI, P. L.; ANSELMINI, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1-4, maio. 2013.

BISWAS, A.; HAQ, W. M.; AKBER, M.; FERDAUSI, D.; SERAJ, S.; JAHAN, I.; CHOWDHURY, A. N.; RAHMATULLAH, M. A survey of medicinal plants used by folk medicinal practitioners of Paschim Shawra and Palordi villages of Gaunardi Upazila in Barisal District, Bangladesh. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 15-22, 2011.

BOLLELA, V. R.; FELICIANO, C.; TEIXEIRA, A. C.; JUNQUEIRA, A. C. R.; ROSSI, M. A. Fulminant gastrointestinal hemorrhage due to *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an AIDS patient. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 111-113, jan/fev. 2013.

BONA, S.; BASSO, R. M. C. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* associada ao uso crônico de corticosteroide. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 247-250, 2008.

BONNE-ANNÉE, S.; HESS, J.A.; ABRAHAM, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunologic Research**, v. 51, n. 2-3, 205-214, 2011.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; SILVA, M. E.; FERNANDES, F. M. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.3, p.389-391, maio/jun. 2011.

BRAZ, A. S.; ANDRADE, C. A. F.; MOTA, L. M. H.; LIMA, C. M. B. L. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre diagnóstico e tratamento das parasitoses intestinais em pacientes com doenças reumáticas autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 4, p. 368-380, 2015.

CABRAL, A. C.; IÑIGUEZ, A. M.; MORENO, T.; BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A. Clinical conditions associated with intestinal strongyloidiasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p.321-325, maio/jun. 2015.

- CALA, A. C.; FERREIRA, J. E. S.; CHAGAS, A. C. S.; GONZALEZ, J. M.; RODRIGUES, R. A. E.; FOGGIO, M. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; SOUSA, I. M. O.; MAGALHÃES, P. M.; BARIONI JÚNIOR, W. Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. extracts *in vitro* and the effect of an aqueous extract and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2345-2353, 2014.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.
- CARRANZA-RODRÍGUEZ, C.; MATEOS-RODRÍGUEZ, F.; MURO, A.; ARELLANO, J. L. P. Tratamiento antiparasitário. **Medicine**, v. 10, n. 54, 3664-3672, 2010.
- CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C. S.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L. G.; CHAVES, F. C. M.; STEPHAN, M. P.; BIZZO, H. R.; AMARANTE, A. F. T. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.
- CATALÁN, S. B.; ALBIACH, J. F. C.; GARCIA, A. I. M.; MARTÍNEZ, G.; TERUEL, J. L. G.; MATEU, L. M. P. Infección por *Strongyloides stercoralis* en pacientes trasplantados renales. **Nefrologia**, v.29, n.5, p.482-485, 2009.
- CAVALIERI, E.; RIGO, E.; BONIFACIO, M.; PRATI, A. C.; GUARDALBEN, E.; BERGAMINI, C.; FATO, R.; PIZZOLO, G.; SUZUKI, H.; VINANTE, F. Pro-apoptotic activity of α -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 45, p. 1-13, 2011.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 35-44, 1992.
- CONCHA, R.; HARRINGTON JR, W.; ROGERS, A. I. Intestinal Strongyloidiasis recognition, management, and determinants of outcome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, n. 3, p. 203-211, mar. 2005.
- CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P.; BIANCO, A. E. *Strongyloides stercoralis*: Characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 99-105, 1994.
- CORDEIRO, L. N.; ATHAYDE, A. C. R.; VILELA, V. L. R.; COSTA, J. G. M.; SILVA, W. A.; ARAUJO, M. M.; RODRIGUES, O. G. Efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 421-426, 2010.
- CORRAL, M. A.; PAULA, F. M.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D. M. C. L.; CHIEFFI, P. P.; GRYSCHKEK, R. C. B. Brief communication membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de**

Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 57, n. 1, p.77-80, jan/fev. 2015.

COSTA, C. T. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais de Botucatu**, v. 10, n. 4, p. 108-116, 2008

COSTA, N. C. A. **Avaliação da atividade antioxidante e triagem fitoquímica das espécies *Caryocar brasiliense* e *Siparuna guianensis***. Jataí, 2017. 32 p. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Química Bacharelado). Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí.

COSTA-CRUZ, J. M.; MADALENA, J.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; CAMPOS, D. M. B.; TAKETOMI, E. A. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 265-268, set/out. 2003.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

DARRA, E.; ABDEL-AZEIM, S.; MANARA, A.; SHOJI, K.; MARÉCHAL, J. D.; MARIOTTO, S.; CAVALIERI, E.; PERBELLINI, L.; PIZZA, C.; PERAHIA, D.; CRIMI, M.; SUZUKI, H. Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 113-123, 2008.

DEMELER, J.; ZEVEREN, A. M. J. V.; VERCRUYSSSE, J.; HÖGLUND, J. KOOPMANN, R.; CABARET, J.; CLAEREBOU, E.; ARESKOG, M.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary parasitology**, v. 160, p. 109-115, 2009.

DIAS, A. J. L. G. **Estudos para a preparação de tetraidrofuranos substituídos a partir do α -(-)-bisabolol e obtenção de análogos de compostos com atividade biológica**. Campinas, 2009. 175 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas.

DINIZ, J. A. *Siparuna guianensis* Aublet como nova fonte de α -bisabolol para o controle de *Rhipicephalus microplus*. Viçosa, 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 2014.

DONADELLO, K.; CRISTALLINI, S.; TACCONE, F. S.; LORENT, S.; VINCENT, J. L.; BACKER, D.; JACOBS, F. *Strongyloides* disseminated infection successfully treated with parenteral ivermectin: case report with drug concentration measurements and review of the literature. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 580-583, 2013.

DOORN, H. R. V.; KOELEWIJN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTEYN, J. C. F. M.; WISMANS, P. J.; SARFATI, C.; VERVOORT, T.; GOOL, T. V. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.2, p. 438-442, fev. 2007.

EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 108-113, 2011.

EGUALE, T.; TILAHUM, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 428-433, 2007.

FEMEX, E. V. S.; DÍAZ, M. A. A.; GIVES, P. M.; MORA, B. V.; ZAMLLPA, A.; CORTAZAR, M. G. Ovicidal activity of extracts from four plant species against the cattle nematode *Cooperia punctata*. **Veterinaria México OA**, Mexico, v. 3, n. 2, p. 1-14, abr/jun. 2016.

FERREIRA, L. E.; CASTRO, P. M. N.; CHAGAS, A. C. S.; FRANÇA, S. C.; BELEBONI, R. O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 327-332, 2013.

GEERTS, S.; GRYSEELS, B.. Anthelmintic resistance in human helminths: a review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 2, p. 915-921, nov. 2001.

GONÇALVES, A. L. R.; MACHADO, G. A.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; FERREIRA-JÚNIOR, A.; SILVA, D. A. O.; COSTA-CRUZ, J. M. Evaluation of strongyloidiasis in kennel dogs and keepers by parasitological and serological assays. **Veterinary parasitology**, v. 147, p. 132-139, 2007.

GREAVES, D.; COGGLE, S.; POLLARD, C.; HALIYU, S.; MOORE, E. *Strongyloides stercoralis* infection. **British Medical Journal**, v. 347, p. 30-33, ago. 2013.

GROVE, D.I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251-09, 1996.

HARADA U.; MORI, O. A. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Medicine**, v. 1, p. 177-179, 1955.

HINO, A.; TANAKA, T.; TAKAISHI, M.; FUJII, Y.; PALOMARES-RIUS, J. E.; HASEGAWA, K.; MARUYAMA, H; KIKUCHI, T. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 141, p. 1736-1745, 2014.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 253-261, 2006.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 400-404, 2011.

KERBOUF, D.; RIOU, M.; GUÉGNARD. Flavonoids and Related Compounds in Parasitic Disease Control. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 116-128, 2008.

KOZAN, E.; ANUL, S.A.; TATLI, I.I. *In vitro* anthelmintic effect of *Vicia pannonica* var.

purpurascens on Trichostrongylosis in sheep. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 299-303, 2013.

KOZUBSKY, L.; ARCHELLI, S. Consideraciones sobre la biología y el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v. 38, n. 3, p. 333-338, 2004.

KRYCHAK-FURTADO, S.; SILVA, A. L. P.; MIGUEL, O. G.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; COSTA, S. S.; NEGRELLE, R. R. B. Effectiveness of Asteraceae extracts on Trichostrongylidae eggs development in sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 3, p. 215-218, 2011.

LAM, C. S.; TONG, M. K.; CHAN, K. M.; SIU, Y. P. Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, p. 14-18, 2006.

LAU CHONG, C.; SAMALVIDES CUBA, F.; TERASHIMA IWASHITA, A. Evaluación de técnicas parasitológicas en el diagnóstico de estrongiloidiasis por *Strongyloides stercoralis*. **Revista Médica Herediana**, v. 16, n. 1, p. 11-18, 2005.

LEITÃO, G. G.; EL-ADJI, S. S.; MELO, W. A. L. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianensis* by gradient and isocratic CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2041-2051, 2005.

LEVENHAGEM, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 135, p.33-43, 2014.

LIM, A.; KATZ, K.; KRAJDEN, S.; FUKSA, M.; KEYTONE, J. S., KAIN, K. C. Complicated and fatal *Strongyloides* infection in Canadians: risk factors, diagnosis and Management. **Canadian Medical Association or its Licensors**, v. 171, n. 5, 2004.

LUNA, O. B.; GRASSELLI, R.; ANANIAS, M.; PINTO, T. S. Estrongiloidíase disseminada: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, 463-468, out.dez. 2007.

MACEDO, I. T. F. **Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *eucalyptus* spp sobre nematóides gastrintestinais**. Fortaleza, 2008. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JÚNIOR, E. M.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F. **Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, 2012. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 2012.

MACEDO, T. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-

VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 504-509, 2012.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 52-55, 2001.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n.6, p. 849-851, set. 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.; VEIGA JR. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3., p. 429-438, 2002.

MAKKER, J.; BALAR, B.; NIAZI, M.; DANIEL, M. Strongyloidiasis : A case with acute pancreatitis and a literature review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 11, p. 3367–3375, mar. 2015.

MANRIQUE-RODRÍGUEZ, S.; MARTÍN-RABADÁN, P.; DÍAZ-CÁMARA, M.; FERNÁNDEZ-LLAMAZARES, C.M. Ivermectina subcutánea en estrogiloidiasis diseminada: a propósito de la autorización de un medicamento veterinario para uso humano. **Medicina Clínica**, Barcelona, v. 146, n. 8, p. 373-377, 2016.

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; CANALES, M.; GOTUZZO, E. Update on Strongyloidiasis in the immunocompromised host. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 1, p. 35-46, 2011.

MARTÍN DEL BARCO, O. H.; MAZANARES, P. A.; IZQUIERDO, R. L. Parasitosis intestinal. **Formacion Médica Continuada en Atención Primaria**, v. 16, n. 1, p. 14-24, 2009.

MEDEIROS, P. B. S. **Atividade anti-helmíntica do estrato etanólico e frações de *Spondias lutea* (Anacardiaceae) sobre *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabditoidea) *in vitro***. Campinas, 2014. 65 p. Dissertação (Mestrado em Biologia animal). Universidade Estadual de Campinas.

MELO, A. L. Helminths. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 12 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

MILLER, A.; SMITH, M. L.; JUDD, J. A.; SPEARE, R. *Strongyloides stercoralis*: systematic review of barriers to controlling strongyloidiasis for Australian indigenous communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3141, 2014.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil. **Economic Botany**, v. 50, n. 1, p. 10-25, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério

da Saúde, 8 ed. rev. – Brasília, 2010.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae.** Viçosa, 2010. 159 p. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa.

MORAES, D.; LEVENHAGEM, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA NETTO, A. P.; RODRIGUES, R.M. *In vitro* efficacy of latex and purified papain from *Carica papaya* against *Strongyloides venezuelensis* eggs and larvae. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, n. e7, 2017.

MORAES, R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 1, p. 507-624, 1948.

MORALES-YUSTE, M.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; VALERO-LÓPEZ, A.; NAVARRO-MOLL, M. C. Activity of (-)[alpha]-bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 279-281, 2010.

MOURA, E. B.; MAIA, M. O.; GHAZI, M.; AMORIM, F. F.; PINHATI, H. M. Salvage treatment of disseminated strongyloidiasis in an immunocompromised patient: therapy success with subcutaneous ivermectin. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 479-481, 2012.

NEGRI, G.; SANTI, D.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1024-1034, set/out., 2012.

NOGUEIRA, D. C. F. **Atividade antiulcerogênica do óleo essencial e da fração rica em alfa-bisabolol, obtidos de espécies do gênero *Eremanthus*.** Campinas, 2000. 80 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

NOVAES, L. R. **Potencialização das atividades biológicas através de modificações estruturais do α -Bisabolol.** Lorena, 2013. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

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

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

PASSALACQUA, N. G.; GUARRERA, P. M.; FINE, G. Contribution to the knowledge of

the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). **Fitoterapia**, v. 78, n. 1, p. 52-68, 2007.

PAULA, F. M.; CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MARÇAL, M. G.; CAMPOS, D. M. B; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 51-55, 2000.

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, p. 1-10, ago. 2011.

PIRES, M. L.; DREYER, G. The importance of *Strongyloides stercoralis* revisited. **Revista do Hospital das Clínicas São Paulo**, v. 48, p. 175-182, 1993.

PORTO, M. A. F.; MUNIZ, A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.; CARVALHO, E. M. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 641-649, nov/dez. 2002.

PUTHIYAKUNNON, S.; BODDU, S.; 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, p. e3018, ago. 2014.

RAMOS, D. F.; LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J. V.; LEITÃO, S. G.; FERNÁNDEZ, S. L. S.; SILVA, P. E. A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 669-674, out.dez. 2008.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REBOLLO, C. D. E.; TAIRA, N.; WILLIAMS, J. C. Larvicidal effects of several chemicals on *Strongyloides* infective larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 165-168, dez. 2003.

REPETTO, S. A.; DURÁN, P. A.; LASALA, M. B.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M. High rate of strongyloidosis infection, out of endemic area, in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 82, p. 1088-1093, 2010.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REZENDE, M. C. **Desenvolvimento de *Strongyloides venezuelensis* em camundongos co-infectados em diferentes fases da infecção por *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte, 2011. 105 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R.; AMATO NETO, V. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 648-653, nov/dez. 2008.

ROCHA, N. F. M.; OLIVEIRA, G. V.; ARAÚJO, F. Y. R.; RIOS, E. R. V.; CARVALHO, A. M. R.; VASCONCELOS, L. F.; MACÊDO, D. S.; SOARES, P. M. G.; SOUSA, D. P. (-)-a-Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 455-461, 2011.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. In: BRASIL. **Práticas Integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Ministério da Saúde, 2012.

RODRIGUES, R. M.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by ige antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 89-93, 2004.

ROMERO-CABELLO, R.; GÓMEZ, J. V.; GONZÁLEZ, M. H.; FERREGRINO, R. R. Hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*. **BMJ Case Reports**, p. 1-5, 2012.

ROTTINI, M. M.; AMARAL, A. C. F.; FERREIRA, J. L.; SILVA, J. R. A.; TANIWAKI, N. N.; SOUZA, C. S. F.; ESCOFFIER, L. N.; ALMEIDA-SOUZA, F.; HARDOIM, D. J.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S. *In vitro* evaluation of (-)alpha-bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 66-72, 2015.

RUANO, A. L.; LÓPEZ-ABÁN, J.; FERNÁNDEZ-SOTO, P.; MELO, A.L Treatment with nitric oxide donors diminishes hyperinfection by *Strongyloides venezuelensis* in mice treated with dexamethasone. **Acta Tropica**, v. 152, p. 90-95, 2015.

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. 5-8, 1954.

SALLUH, J. I.; FERES, G. A, VELASCO, E.; HOLANDA, G. S.; TOSCANO, L.; SOARES, M. Successful use of parenteral ivermectin in an immunosuppressed patient with disseminated strongyloidiasis and septic shock. **Intensive Care Med**, v. 31, p. 1292, 2005.

SANT'ANNA, V.; VOMMARO, R.C.; SOUZA, W. *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: ultrastructural study of the effects of albendazole. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 1-8, 2013.

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

SATOH, M.; KIYUNA, S.; SHIROMA, Y.; TOMA, H.; KOKAZE, A.; SATO, Y. Predictive markers for development of strongyloidiasis in patients infected with both *Strongyloides stercoralis* and HTLV-1. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 133, p. 391-396, 2003.

SATOU, T.; KOGA, M.; KOIKE, K.; TADA, I.; NIKAIDO, T. Nematocidal activities of thiabendazole and ivermectin against the larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*.

Veterinary Parasitology, v. 99, n. 4, p. 311-322, 2001.

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

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, 2013a.

SCHÄR, F.; ODERMATT, P.; PANNING, M.; DUONG, S.; MUTH, S.; MARTI, H.; KRAMME, S. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. **Acta Tropica**, v. 126, p. 89-92, 2013b.

SCHNEIDER-ORELLI, O. **Entomologisches praktikum**. Aarau: Sauerlander, p. 149, 1947.

SIDDIQUI, A. A.; BERK, A. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infections Diseases**, v. 33, n. 7, p. 1040-1047, 2001.

SIREESHA, R.; RAJU, K. L.; RAO, C. L.; BABU, K. K.; PUSHPALATHA, B.; SANDEEP, D.; ALI, S. M. *In vitro* anthelmintic activity of different solvent extracts of *Sesamum indicum* seeds. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 2, p. 1208-1212, 2013.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SCHELBAUER, C. A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1363-1367, 2008.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, F. C. B. **Incorporação de alfa-bisabolol em membranas de policaprolactona e de quitosana complexada com goma guar**. Campinas, 2014. 123 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011.

SOUZA, J. N.; TEIXEIRA, M. C.; SOARES, N. M. Associação entre hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* e HTLV-1: um relato de caso. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 427-430, 2014.

SULTANA, Y.; JEOFFREYS, N.; WATTS, M. R.; GILBERT, G. L.; LEE, R. Real-Time Polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 1048-1051, 2013.

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 907-911, 1995.

TRACY; J.W.; WEBSTER JR, L. T. Fármacos usados na quimioterapia das helmintíases. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L.E; GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, p. 841-855, 2005.

VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and molecular allergy**, v. 4, n. 8, p. 1-13, 2006.

VAIYAVATJAMAI, P.; BOITANO, J. J. P.; TECHASINTANA, TUNGTRONGCHITR, A. Immunocompromised group differences in the presentation of intestinal strongyloidiasis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 5-8, 2008.

VALENTINI, C. M. A.; COELHO, M. F. B.; RODRÍGUES-ORTÍZ, C. E.; ALMEIDA, J. D. Uso e conservação da negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em Bom Sucesso, Várzea Grande-MT. **INTERAÇÕES**, Campo Grande, v. 10, n. 2, p. 195-206, 2009.

VALENTINI, C. M. A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010.

VASCONCELOS, A. L. C. F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrointestinais de ovinos**. Fortaleza, 2006. 83 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E. A. T.; POLDERMAN, A. M.; LIESHOUT, L. V. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 342-346, 2009.

VIEIRA, F. M.; LIMA, S.; BESSA, E. C. Morfologia e biometria de ovos e larvas de *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae) parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (rodenta: Hydrochaeridae), no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 7-12, 2006.

VIGG, A.; MANTRI, S.; REDDY, A. P.; BIYANI, V. Acute respiratory distress syndrome due to *Strongyloides stercoralis* in non-Hodgkin's lymphoma. **Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences**, v. 48, p. 67-69, 2006.

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

WINK, M. Medicinal Plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012.