

**Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Instituto de Biociências de Botucatu**

**Atividade *in vitro* do extrato hidroalcólico da casca de  
*Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae) sobre  
trofozoítos de *Giardia duodenalis***

Monografia apresentada à Universidade  
Estadual Paulista como exigência parcial  
para a obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biomédicas

**Gabriel Rodrigues Manolio**

**Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana**

**Botucatu**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Manolio, Gabriel Rodrigues.

Atividade in vitro do extrato hidroalcoólico da casca de *Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae) sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis* / Gabriel Rodrigues Manolio. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Capes: 21301000

1. Parasitologia médica. 2. Doenças parasitárias. 3. Giardia.

Palavras-chave: Aderência; *Astronium fraxinifolium*; Crescimento; Extratos de planta; *Giardia duodenalis*; Trofozoítos;

## DEDICATÓRIA

“O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar”.

(Albert Einstein)

Aos meus pais Telma e Roberto, à minha irmã Natália e ao meu amor,  
Mariana, pelo amor, carinho, compreensões e incompreensões e por  
mostrarem sempre o lado bom das coisas. Sem vocês não ia ter a mesma  
graça.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À professora Semíramis Guimarães Ferraz Viana, pela orientação, pelas ajudas, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas conversas e risadas.

## **AGRADECIMENTOS**

À Thaís, por todo apoio, todo auxílio, todos os conselhos e por ouvir todas as minhas dúvidas e sempre responder com paciência.

À minha grande amiga Isabela (Bola), por sempre tentar mostrar o lado engraçado de tudo.

À Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho do Departamento de Bioestatística, por realizar o delineamento e a análise estatística deste trabalho.

À Profa. Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima do Departamento de Fisiologia e à Raquel, por seu apoio acadêmico.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Valdir, Roberto e Nilza, pela colaboração, pelo apoio e pela atenção.

À Profa. Dra. Thereza Cristina Goulart de Oliveira-Sequeira do Departamento de Parasitologia, por sempre me ensinar algo novo.

À Érica e à Silvana, sempre dispostas a me ajudar e dar conselhos.

Aos funcionários da Seção de Graduação, pelos esclarecimentos, pelo apoio e pela atenção.

À XLIII turma de Biomedicina, por quatro anos de histórias, alegrias e tristezas.  
Sem vocês seria tudo diferente.

Aos amigos de São Paulo: Cauê, César, Robson, Marcio, André, Luiz, Verniz,  
Zagatto, Danilo, Brunão, que mesmo estando distantes, estavam sempre  
presentes.

Muito Obrigado!

## ***Sumário***

---

---

## Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Cepa de <i>Giardia duodenalis</i>	11
3.2. Manutenção da cepa de <i>G. duodenalis</i> e obtenção de massas de trofozoítos	11
3.3. Extrato hidralcoólico de <i>Astronium fraxinifolium</i>	12
3.4. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do extrato hidroalcólico de <i>A. fraxinifolium</i> sobre trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	12
3.4.1. Atividade sobre o crescimento dos trofozoítos	12
3.4.2. Atividade sobre a aderência dos trofozoítos	13
3.5. Análise estatística	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Atividade do extrato de <i>Astronium fraxinifolium</i> sobre o crescimento de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	15
4.2. Atividade do extrato de <i>Astronium fraxinifolium</i> sobre a aderência dos trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	20
5. DISCUSSÃO	23
6. RESUMO	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32



## ***1. Introdução***

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

*Giardia duodenalis* (sin. *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*), protozoário que parasita o intestino delgado de várias espécies de mamíferos, é considerado um dos 10 principais parasitas que infectam o homem, especialmente, nos países em desenvolvimento, onde é uma das principais causas de diarreia infecciosa (THOMPSON et al., 1990).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2000), estima-se que haja 200 milhões de pessoas com giardíase sintomática no mundo e 500 mil novos casos registrados anualmente em populações residentes na Ásia, África e América Latina. Apesar da infecção por *Giardia* apresentar ampla distribuição mundial, os índices de prevalência variam nas diferentes regiões do mundo, no entanto, as maiores prevalências são observadas em áreas onde as condições sanitárias e sócio-econômicas da população são precárias. Nessas populações, além da alta prevalência, essa infecção é uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa, sobretudo em crianças (APPELBEE et al., 2005).

Quanto à biologia, *Giardia duodenalis* apresenta um ciclo de vida relativamente simples, que envolve duas formas evolutivas distintas, o trofozoíto e o cisto. O trofozoíto é a forma que coloniza o intestino delgado do hospedeiro, enquanto que o cisto consiste na forma de resistência sendo, portanto, responsável pela transmissão do parasita. A maioria das infecções por *Giardia* é adquirida a partir da ingestão de cistos presentes na água, nos alimentos ou no ambiente contaminados com fezes. A água consiste em um importante veículo para a transmissão de *Giardia*, seja pela ingestão direta ou

indiretamente pelo consumo de alimentos ou bebidas preparados com água contaminada, além da contaminação acidental durante as atividades recreativas. De acordo com informações apresentadas por KARANIS e colaboradores (2007), até 2007, no mundo, de 325 registros de surtos associados à veiculação hídrica e causados por parasitas intestinais, em aproximadamente 40% dos casos, *Giardia* foi reconhecido como o agente contaminante. Além da transmissão hídrica, a transmissão direta de pessoa a pessoa tem importância, principalmente, na disseminação do parasita entre crianças que frequentam creches e escolas.

No que se refere à sintomatologia, a infecção por *Giardia* apresenta um espectro clínico diverso, que varia desde indivíduos assintomáticos até pacientes sintomáticos com quadro de diarreia aguda ou crônica. Maior impacto clínico da infecção por *Giardia* tem sido observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e em crianças. Vale destacar que nos países em desenvolvimento, onde a desnutrição é um dos grandes problemas de saúde da população, especialmente na infância, complicações decorrentes da giardíase, como a diarreia persistente e a má absorção intestinal, podem determinar déficit no crescimento linear e ponderal e impedir o desenvolvimento cognitivo das crianças (FARTHING et al., 1986).

Ainda hoje, o tratamento da infecção tem sido uma das principais alternativas adotadas para o controle da giardíase. Atualmente, as principais drogas empregadas no tratamento da infecção incluem compostos derivados dos 5-nitroimidazóis (metronidazol, tinidazol, ornidazol, secnidazol), dos nitrofuranos (furazolidona), dos corantes de acridina, dos benzimidazóis (albendazol) e, mais recentemente, dos 5-nitrotiazóis. Muito embora estas

drogas apresentem altas taxas de cura, o tratamento ainda exhibe inconvenientes associados à alta incidência de efeitos colaterais, sobretudo para as crianças que, com freqüência, devido às reinfecções, necessitam ser tratadas várias vezes (THOMPSON & REYNOLDSON, 1993).

Dentre as drogas disponíveis, o metronidazol, tem sido o medicamento de escolha para o tratamento da giardíase, eliminando a infecção em 80 a 95% dos indivíduos tratados (GARDNER & HILL, 2001). Vários estudos têm demonstrado *in vitro* e *in vivo* a eficácia deste quimioterápico sobre trofozoítos de *Giardia* (BOREEHAM et al., 1986; PAGET et al., 1989; WEBSTER, 1990), sendo que o seu efeito está associado à alteração no DNA do parasita (LIU et al., 2000; SANGSTER et al., 2002). A ferredoxina, proteína presente no parasita, ao ser reduzida pela enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase, ativa o grupo 5-nitro do metronidazol, radical que dá toxicidade à substância, sendo responsável por alterações no DNA do parasita, impedindo-o de se multiplicar (LIU et al., 2000; SANGSTER et al., 2002).

A despeito da eficiência comprovada e da ampla utilização, o tratamento com o metronidazol apresenta muitos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, vertigens, gosto metálico desagradável ao paladar, glossite, dores de cabeça, urticária e pancreatites ocasionais e, em alguns pacientes, complicações como toxicidade do sistema nervoso central e leucemia transiente (THOMPSON & REYNOLDSON, 1993).

Além disso, efeitos mutagênicos e carcinogênicos foram detectados, respectivamente, em bactérias e roedores, quando altas doses do composto foram empregadas durante longos períodos (UPCROFT & UPCROFT, 2001; BENDESKY et al., 2002). Este efeito carcinogênico em humanos ainda é uma

questão a ser investigada, pois todos os estudos realizados até o presente momento apresentaram resultados ambíguos; há experimentos que consideraram o metronidazol como um fator de risco para o câncer de pulmão e outros que não revelaram nenhum aumento dos índices de câncer nos grupos tratados com a droga (BENDESKY et al., 2002). Recentemente, foi possível verificar que esta resistência ocorre devido a uma alteração na transcrição dos RNAs mensageiros que codificam as proteínas piruvato-ferredoxina oxidorreductase e ferredoxina, levando a uma diminuição da ativação do metronidazol e alteração da sua atividade sobre o parasita (LIU et al., 2000; SANGSTER et al., 2002).

Entre outras limitações do uso do metronidazol, em alguns casos, tem-se observado baixa eficácia do metronidazol na eliminação do parasita no intestino, fato que tem sido associado à resistência de cepas de *Giardia* ao tratamento com esta droga (KULDA & NOHÝNKOVÁ, 1995; BARAT & BLOLAND, 1997). Há relatos de que a prevalência de resistência clínica ao metronidazol é superior a 20% (FARTHING, 1996) e, muitas vezes, com taxas de recorrência superiores a 90% (ZAAT et al., 1997).

Mesmo que a avaliação de outros quimioterápicos tenha revelado novas opções para o tratamento da giardíase, como, por exemplo, os compostos albendazol e nitazoxanida, ainda persistem a ocorrência de efeitos colaterais e a possibilidade de refratariedade aos tratamentos instituídos.

Em busca de alternativas para o tratamento das infecções parasitárias, diferentes princípios ativos disponíveis na natureza, sejam de origem animal ou vegetal, têm sido avaliados com esse objetivo. Estes estudos têm demonstrado resultados promissores que reforçam o fato de que, entre os produtos

biológicos existem substâncias que apresentam atividade antiparasitária, sem, contudo, causar prejuízos ao hospedeiro (ANTHONY et al., 2005; CALZADA et al., 2006; ANTHONY et al., 2007).

No que se refere à infecção por *Giardia*, até o presente, ainda são poucas as investigações, mas tem sido crescente o interesse em se avaliar o potencial giardicida de diferentes produtos naturais. Além disso, o desenvolvimento do cultivo axênico, ou seja, a manutenção e o crescimento do parasita em meio de cultura isento de outros organismos, tem permitido avanços significativos na avaliação de várias substâncias. Geralmente, nos ensaios *in vitro*, o efeito de cada substância testada sobre os trofozoítos é avaliado considerando-se alguns dos seguintes parâmetros: (1) alterações morfológicas; (2) redução da viabilidade; (3) inibição do crescimento e/ou da aderência e (4) alterações no metabolismo.

Dentre os produtos naturais já investigados, incluem-se os extratos e óleos essenciais das plantas (HAWRELAK, 2009; ANTHONY et al., 2005), a própolis (MIYARES et al., 1988; FREITAS et al., 2006; ABDEL-FATTAH et al., 2007) e até venenos de serpentes (SHINOHARA et al., 2006).

Até o presente, a maioria das investigações tem revelado que as plantas representam uma importante fonte de moléculas bioativas, além do que, há muitos séculos, têm sido empregadas para o tratamento das mais diversas enfermidades, desde dores de cabeça até as infecções parasitárias (ANTHONY et al., 2005). No entanto, como grande parte do conhecimento sobre o uso terapêutico das plantas se baseia nas indicações populares, ainda são necessárias pesquisas que demonstrem a real efetividade dos remédios

derivados de plantas e os respectivos mecanismos de ação (AMARAL et al., 2006).

Atualmente, estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos têm demonstrado entre muitas aplicações, a ampla utilização de diferentes espécies de plantas no tratamento de distúrbios gastrintestinais, como a diarreia, que consiste em uma das manifestações clínicas mais frequentes nas infecções causadas por parasitas intestinais, inclusive *Giardia*.

Um dos primeiros estudos desenvolvidos com o propósito de avaliar a atividade giardicida de plantas foi realizado na África em 1995. Nessa investigação, JOHNS et al. (1995) testaram 36 espécies de plantas nativas empregadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais pela população local e demonstraram *in vitro* que extratos obtidos de 21 espécies promoveram a morte ou inibição do crescimento dos trofozoítos de *Giardia*.

Posteriormente, empregando extratos e frações obtidas de espécies de plantas dos continentes americano e asiático, outros autores demonstraram o efeito giardicida desses compostos (AGARWAL et al., 1997; McALLISTER et al., 2001; CALZADA et al., 2006). Apesar dos poucos estudos realizados até o momento, a maior contribuição nessa área provém de pesquisas desenvolvidas no México, onde diversas espécies de plantas são empregadas na medicina popular para o tratamento das enfermidades gastrintestinais. (CALZADA et al., 2006; PÉREZ-ARRIAGA et al., 2006; PONCE-MACOTELA et al., 2006; CALZADA et al., 2010).

No que se referem às plantas brasileiras, diversas espécies são ricas fontes de compostos que podem ser úteis no desenvolvimento de novos fármacos, entretanto muitas substâncias isoladas e caracterizadas quanto à

composição química ainda não foram avaliadas quanto às propriedades biológicas. Com base nas indicações populares, uma variedade de plantas brasileiras é utilizada no tratamento de distúrbios gastrintestinais e/ou infecções causadas por parasitas intestinais. Até o momento, muito embora o Brasil possua a maior diversidade de espécies vegetais do mundo, ainda são escassas as evidências científicas que confirmam o potencial antiparasitário das plantas e de seus componentes ativos, especialmente no que se refere à infecção por *Giardia*. Considerando os cerca de 20 estudos sobre o efeito giardicida de componentes ativos de diferentes espécies de plantas, apenas quatro foram realizados no Brasil (GADELHA et al., 2005; VIDAL et al., 2007; de ALMEIDA et al., 2007; BRANDELLI et al., 2009).

Atualmente, várias plantas da flora nacional têm despertado o interesse não apenas pela importância etnobiológica e etnofarmacológica, mas também pela necessidade de se estabelecer a conservação e o manejo sustentável das espécies. Muitas dessas espécies compõem a flora do Cerrado brasileiro, a maioria ainda utilizada de forma empírica pela população, como é o caso de *Astronium fraxinifolium* Schott, planta pertencente à família *Anacardiaceae* e popularmente conhecida como Gonçaleiro, Gonçalo-Alves ou aroeira do campo. *A. fraxinifolium* é uma das espécies típicas dos Cerrados do Brasil Central que tem sido investigada sob o ponto de vista farmacológico, além do que, é uma das espécies que inclui a lista oficial do IBAMA de espécies da flora brasileira com deficiência de dados. Este grupo refere-se a espécies cujas informações (distribuição geográfica, ameaças/impactos e usos, entre outras) são ainda deficientes, não permitindo seu enquadramento com segurança na condição de ameaçadas por extinção (BRASIL, 2008).



Dentre as 35 espécies que compõem o gênero *Astronium*, de acordo com informações disponíveis na literatura científica, apenas a espécie *Astronium urundeuva* foi investigada sob o ponto de vista farmacológico, tendo sido relatadas atividades antiulcerogênica (BANDEIRA, 1993; RAO et al., 1987) e antiinflamatória (MENEZES et al., 1985) e efeitos no trânsito gastrointestinal (MENEZES et al., 1988) e em colites (RAO et al., 1986). No que se refere à *A. fraxinifolium*, até o presente, foram avaliados somente os óleos essenciais (MAIA et al., 2002; CHEN et al., 1984).

Na medicina popular, *A. fraxinifolium* é indicada para o tratamento de inflamações gástricas, diarréias e disenterias. Suas folhas e cascas são compostas por uma grande diversidade de metabólitos secundários – desde derivados do ácido cafeoilquínico, flavonóides até inúmeros derivados do ácido gálico, muito embora os componentes majoritários dos extratos da casca sejam os taninos condensados. O extrato das folhas tem um efeito anticonceptivo, mas o extrato da casca do *A. fraxinifolium* possui, além de atividade antiinflamatória e de gastroproteção contra úlceras, uma significativa atividade antidiarréica já demonstrada em ensaios *in vivo* empregando animais de experimentação (SERIKAVA, 2009).

Diante de tudo que foi exposto, pode-se constatar que a infecção por *Giardia* é uma das principais causas de diarréia, sobretudo em crianças residentes nos países em desenvolvimento, onde tem sido constante a busca por medidas que permitam o controle da giardíase. Ainda hoje, o tratamento da infecção com o metronidazol é uma das alternativas, no entanto, a despeito da alta eficácia, esse quimioterápico apresenta muitos inconvenientes relativos à toxicidade e à resistência apresentada por algumas cepas. Com isso, é grande

o interesse em se investigar novas alternativas para o tratamento desta infecção, especialmente entre os produtos naturais de origem vegetal que são ricas fontes de princípios ativos precursores para o desenvolvimento de novos medicamentos. Somando-se a esses aspectos, é importante ressaltar que além da grande diversidade da flora brasileira, muitas espécies de plantas ainda são utilizadas de forma empírica como medicamentos naturais, inclusive para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, muitas vezes associados a infecções causadas por parasitas intestinais.

Frente a essas considerações, o presente trabalho foi proposto para avaliar *in vitro* o efeito do extrato hidroalcoólico da casca de *Astronium fraxinifolium* sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Vale ressaltar que *A. fraxinifolium* é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, cujas casca e entrecasca são indicadas na medicina popular contra quadros de diarreia, uma das principais manifestações nos casos de infecção por *Giardia*.

## ***2. Objetivos***

---

---

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo foi proposto para avaliar o efeito *in vitro* do extrato de casca de *Astronium fraxinifolium* sobre trofozoítos de cepa axênica de *G. duodenalis*, isolada e axenizada em Botucatu. Para este fim, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- 2.1. Atividade do extrato de *A. fraxinifolium* sobre o crescimento dos trofozoítos;
- 2.2. Atividade do extrato de *A. fraxinifolium* sobre a aderência dos trofozoítos;

### ***3. Material e Métodos***

---

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cepa de *Giardia duodenalis*

Foram empregados trofozoítos de *G. duodenalis* pertencentes à cepa BTU-11 (91/JFC), isolada e axenizada pela Dra Maria Inês T. L. Sogayar, no Laboratório de Giardíase do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu/SP, a partir de cistos de paciente do sexo masculino, proveniente de São Paulo, apresentando giardíase sintomática e crônica, caracterizada por diarreia freqüente, flatulência e dor abdominal, além de marcante resistência à terapêutica convencional.

#### 3.2. Manutenção da cepa de *G. duodenalis* e obtenção de massas de trofozoítos

O cultivo axênico de trofozoítos foi mantido em tubos Vacutainer® (5 mL), contendo meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina (KEISTER, 1983), em estufa a 37°C. Para a manutenção dos cultivos, repiques foram feitos a cada 72-96 horas, retirando-se do meio exaurido uma suspensão de trofozoítos (aproximadamente  $10^4$  trofozoítos/0,01 mL) e transferindo-a para um tubo contendo meio novo.

Massas de trofozoítos foram produzidas a partir de repiques em lotes de seis a oito tubos de cultura. Após incubação por 72 horas, os tubos foram colocados em gelo por 10 min e, em seguida, centrifugados a 250 g por 10 min

a 4°C. Os trofozoítos obtidos foram contados em câmara de Neubauer (hemocitômetro).

### **3.3. Extrato hidralcoólico de *Astronium fraxinifolium***

O extrato hidroalcoólico testado foi preparado pela Profa. Dra. Viviane Cândida da Silva (Instituto de Química/UNESP/Araraquara) e cedido pela Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma (Depto. de Fisiologia/IB/UNESP/Botucatu).

Para o preparo do extrato, cascas de *A. fraxinifolium* coletadas no município de Porto Nacional, Estado do Tocantins, foram secas em estufa a 40°C com ventilação forçada e trituradas em moinho de facas. Em seguida, o material vegetal seco e moído, foi exaustivamente extraído com etanol 96%, por maceração, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em funil simples, usando papel de filtro, a cada três dias e o solvente foi concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida para fornecer o extrato bruto etanólico. Em seguida, o extrato bruto etanólico foi solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) e submetido à partição líquido-líquido com hexano, fornecendo dois extratos: extrato hexânico e o extrato hidroalcoólico.

### **3.4. Avaliação *in vitro* da atividade do extrato hidroalcoólico de**

#### ***A. fraxinifolium* sobre trofozoítos de *G. duodenalis***

##### **3.4.1. Atividade sobre o crescimento dos trofozoítos**

Para avaliar o efeito do extrato de *A. fraxinifolium* sobre o crescimento de *G. duodenalis*, trofozoítos obtidos como descrito no item 3.2 foram contados

em câmara de Neubauer e  $10^5$  parasitas foram inoculados em tubos contendo meio TYI-S-33 e o extrato hidroalcolico diluido em PBS (pH 7,2) e filtrado em membrana esterilizante 0,22  $\mu\text{m}$ . Os trofozoítos expostos ao extrato nas concentrações de 500, 375, 250 e 125  $\mu\text{g/ml}$  foram incubados a 37°C durante 24, 48 e 72 horas. Decorridos os períodos de incubação, os tubos foram mantidos em gelo durante 10 minutos, centrifugados a 250 g (10 minutos a 4°C) e os trofozoítos obtidos foram contados em câmara de Neubauer. Em todos os ensaios, culturas não tratadas (cultivos puros) foram incluídas como controles.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade das diferentes concentrações do extrato sobre o crescimento de trofozoítos foi avaliado comparando-se a média do número de organismos recuperados nas culturas tratadas e nas culturas controle (não-tratadas). O efeito inibitório de cada concentração do extrato testada sobre o crescimento dos trofozoítos foi expresso como porcentagem de inibição em relação ao número total de parasitas recuperados nas culturas não tratadas.

#### **3.4.2. Atividade sobre a aderência dos trofozoítos**

O efeito do extrato sobre a aderência dos trofozoítos foi avaliado segundo a metodologia descrita por EDLIND et al. (1990), com modificações. Trofozoítos obtidos como descrito no item 3.2 foram contados em câmara de Neubauer e  $10^5$  parasitas foram inoculados em tubos contendo meio TYI-S-33 e incubados durante 4 horas a 37°C. Em seguida, o meio puro foi substituído por meio contendo o extrato nas concentrações de 500, 375, 250 e 125  $\mu\text{g/ml}$



e, os trofozoítos tratados foram incubados a 37°C durante 24 e 48 horas. Ao final da incubação, o meio de cada tubo foi substituído por 4,5 mL de PBS, os tubos foram mantidos em gelo por 10 minutos e centrifugados (250 g/10 min a 4°C). O número de trofozoítos aderidos em cada tubo foi determinado em câmara de Neubauer. Em todos os ensaios, culturas não tratadas (cultivos puros) foram incluídas como controles.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade das diferentes concentrações do extrato sobre a aderência dos trofozoítos foi avaliada comparando-se a média do número de organismos aderidos e recuperados nas culturas tratadas e não tratadas. O efeito inibitório de cada concentração do extrato testada sobre a aderência dos trofozoítos foi expresso como porcentagem de inibição em relação ao número de parasitas aderidos e recuperados nas culturas não tratadas.

### **3.5. Análise estatística**

Na análise dos resultados obtidos nos ensaios para avaliar a atividade do extrato sobre o crescimento e a aderência *in vitro* de *G. duodenalis*, empregou-se a análise de variância no delineamento inteiramente ao acaso no esquema fatorial, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## ***4. Resultados***

---

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Atividade do extrato de *Astronium fraxinifolium* sobre o crescimento de trofozoítos de *G. duodenalis*

Os resultados obtidos nos ensaios com o extrato de *A. fraxinifolium* estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 e nas Figuras 1 e 2. O efeito do extrato sobre o crescimento *in vitro* de trofozoítos foi observado somente após incubação por 72 horas, quando o número de parasitas recuperados após o tratamento foi menor que o obtido nas culturas controle ( $p < 0,05$ ) (Tabelas 1 e 2; Figuras 1 e 2). Após incubação por 24 e 48 horas, o número de trofozoítos recuperados nos cultivos expostos ao extrato foi similar àquele obtido nas culturas não tratadas ( $p < 0,05$ ), exceto nos tubos tratados com o extrato na concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$  (Tabelas 1 e 2; Figuras 1 e 2).

Considerando o número de parasitas recuperados após o tratamento com o extrato, a maior taxa de inibição (90%) do crescimento foi observada no cultivo exposto à concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$  por 72 horas (Tabela 3). Nas culturas tratadas com o extrato a 500  $\mu\text{g/ml}$ , o crescimento foi inibido nos diferentes tempos de incubação, no entanto, a maior redução do crescimento foi observada após 24 horas. Nos cultivos tratados com o extrato nas concentrações de 250 e 375  $\mu\text{g/ml}$ , discreta inibição do crescimento foi verificada após 24 horas de incubação, no entanto, nas culturas incubadas por 48 horas, não foi possível detectar qualquer efeito inibitório. O tratamento dos cultivos com o extrato a 125  $\mu\text{g/ml}$ , apenas inibiu o crescimento dos trofozoítos (42,7%) após 72 de exposição.

Durante as contagens dos parasitas recuperados após incubação com as diferentes concentrações do extrato, não foram evidenciadas alterações como aumento de tamanho e vacuolização dos trofozoítos e perda da motilidade flagelar.

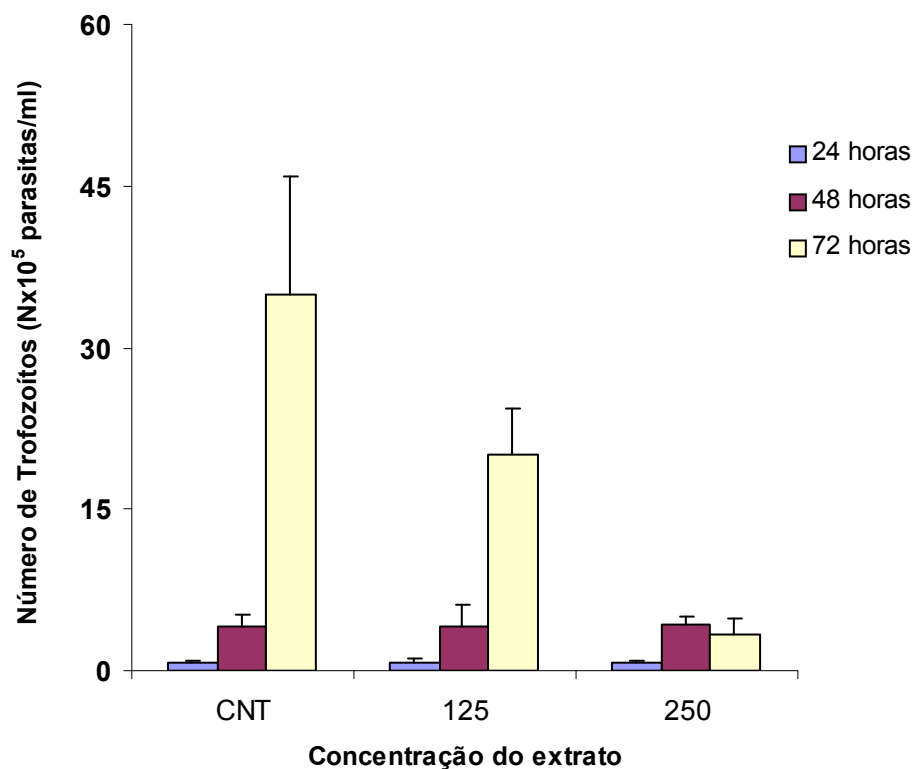
**Tabela 1:** Número de trofozoítos ( $\times 10^5$ ) de *Giardia duodenalis* em cultivos axênicos tratados com extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium*, segundo a concentração do extrato e o tempo de incubação.

Tempo (horas)	Culturas não tratadas	Culturas tratadas com extrato Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		125	250
24	$0,8 \pm 0,2$ bA	$0,8 \pm 0,3$ bA	$0,7 \pm 0,2$ bA
48	$4,1 \pm 1,2$ bA	$4,2 \pm 1,9$ bA	$4,3 \pm 0,8$ bA
72	$35 \pm 10,9$ aA	$20 \pm 4,3$ aB	$3,3 \pm 1,4$ aC

Os resultados expressam a média e o desvio padrão ( $n=3$ ).  $P<0,05$

(1) Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula em cada uma das linhas não diferem entre si.

(2) Médias seguidas de uma mesma letra minúscula em cada uma das colunas não diferem entre si.



**Figura 1:** Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium* nas concentrações de 125 e 250  $\mu\text{g/ml}$  sobre o crescimento de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, após incubação durante 24, 48 e 72 horas. Em todos os ensaios, culturas não tratadas (CNT) foram incluídas como controle.

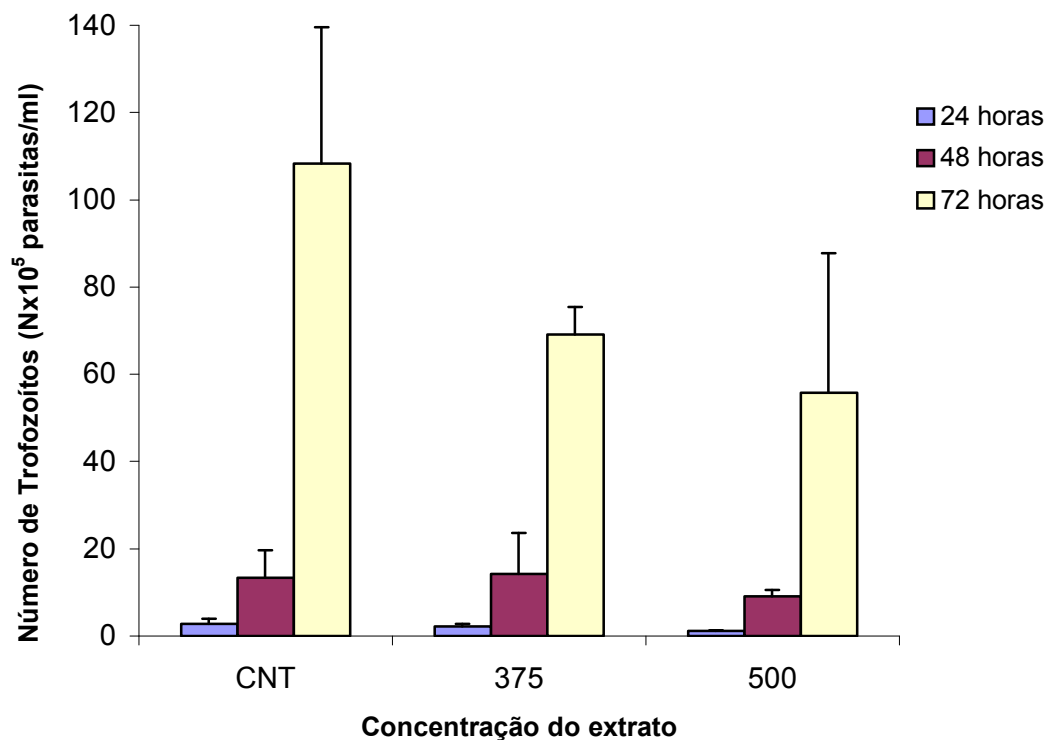
**Tabela 2:** Número de trofozoítos ( $\times 10^5$ ) de *Giardia duodenalis* em cultivos axênicos tratados com extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium*, segundo a concentração do extrato e o tempo de incubação.

Tempo (horas)	Culturas não tratadas	Culturas tratadas com extrato Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		375	500
24	$2,8 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,1$
	bA	bA	bB
48	$13,3 \pm 6,3$	$14,2 \pm 9,5$	$9,2 \pm 1,4$
	bA	bA	bB
72	$108,3 \pm 31,3$	$69,2 \pm 6,3$	$55,8 \pm 31,9$
	aA	aB	aB

Os resultados expressam a média e o desvio padrão ( $n=3$ ).  $P<0,05$

(1) Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula em cada uma das linhas não diferem entre si.

(2) Médias seguidas de uma mesma letra minúscula em cada uma das colunas não diferem entre si.



**Figura 2:** Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium* nas concentrações de 375 e 500  $\mu\text{g/ml}$  sobre o crescimento de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, após incubação durante 24, 48 e 72 horas. Em todos os ensaios, culturas não tratadas (CNT) foram incluídas como controle.

**Tabela 3:** Porcentagem de inibição *in vitro* do crescimento de trofozoítos de *Giardia duodenalis* tratados com extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium*, segundo a concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) do extrato e tempo de incubação.

Tempo (horas)	Culturas tratadas com extrato			
	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	125	250	375	500
24	NI*	12,5	21,5	57,0
48	NI*	NI*	NI*	31,3
72	42,7	90,5	36,15	48,5

\*NI = não inibiu

#### **4.2. Atividade do extrato de *Astronium fraxinifolium* sobre a aderência dos trofozoítos de *G. duodenalis***

Os resultados obtidos nos ensaios com o extrato hidroalcoólico nas diferentes concentrações estão apresentados nas Tabelas 4 e 5 e na Figura 3. Nas culturas tratadas e incubadas por 24 horas, apenas o extrato testado nas concentrações 375 e 500 µg/ml promoveu discreta redução do número de trofozoítos aderidos à parede do tubo. Maior efeito sobre a aderência foi observado nos ensaios em que os parasitas foram expostos ao extrato nas concentrações de 375 e 500 µg/ml e incubados durante 48 horas. Nestes cultivos, o número de parasitas aderidos que foi recuperado após o tratamento foi significativamente menor que o obtido nas culturas não tratadas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4; Figura 3). Nas culturas expostas ao extrato nas concentrações de 125 e 250 µg/ml, o número de trofozoítos aderidos não diferiu ( $p < 0,05$ ) dos cultivos não tratados (controle negativo).

O maior efeito inibitório sobre a aderência dos trofozoítos foi observado nos tubos contendo o extrato a 375 e 500 µg/ml, sendo que após 48 horas de incubação, as taxas de inibição foram, respectivamente, 99,8% e 99,6% (Tabela 5).



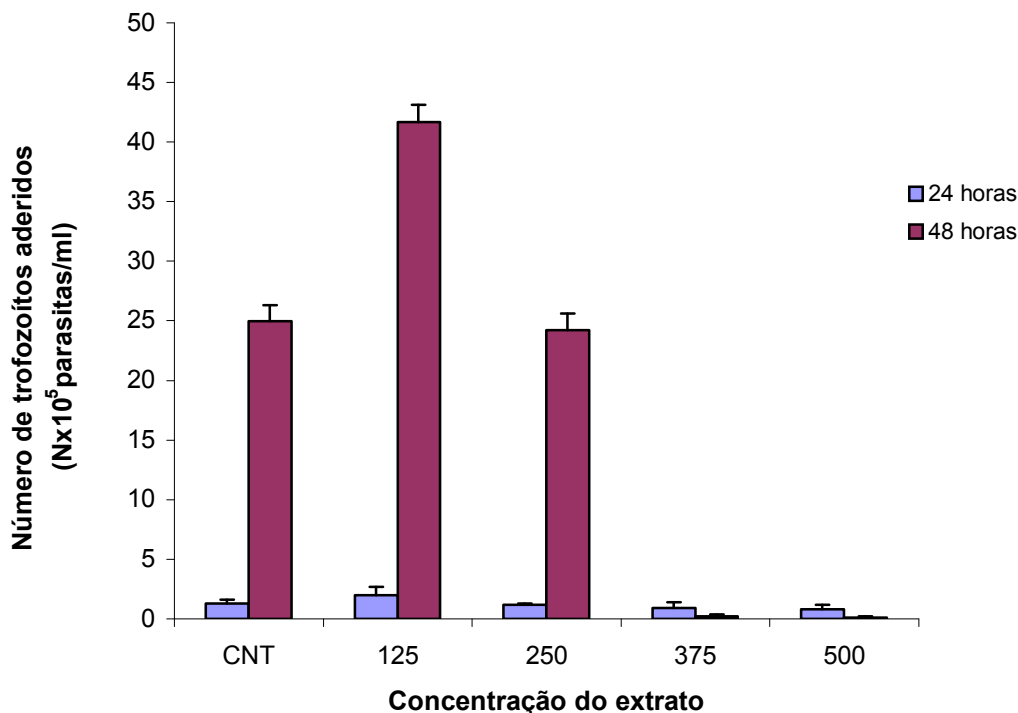
**Tabela 4:** Número de trofozoítos ( $\times 10^5$ ) de *Giardia duodenalis* aderidos após exposição ao extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium*, segundo a concentração do extrato e o tempo de incubação.

Tempo (horas)	Culturas tratadas com extrato				
	Culturas não tratadas	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		125	250	375	500
24	$1,3 \pm 0,3$ bA	$2,0 \pm 0,7$ bA	$1,2 \pm 0,1$ bA	$0,9 \pm 0,5$ aB	$0,8 \pm 0,4$ aB
48	$25 \pm 1,3$ aB	$41,7 \pm 1,4$ aA	$24,2 \pm 1,4$ aB	$0,2 \pm 0,2$ aC	$0,1 \pm 0,1$ aC

Os resultados expressam a média e o desvio padrão (n= 3).  $P < 0,001$

(1) Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula em cada uma das linhas não diferem entre si.

(2) Médias seguidas de uma mesma letra minúscula em cada uma das colunas não diferem entre si.



**Figura 3:** Efeito *in vitro* do extrato de *Astronium fraxinifolium* sobre a aderência de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, após incubação durante 24 e 48 horas, a  $37^\circ\text{C}$ . Em todos os ensaios, culturas não tratadas (CNT) foram incluídas como controle.

**Tabela 5:** Porcentagem de inibição da aderência de trofozoítos de *Giardia duodenalis* tratados com o extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium*, segundo a concentração do extrato e o tempo de incubação.

Tempo (horas)	Culturas tratadas com extrato			
	125	250	375	500
24	NI*	7,7	30,8	38,5
48	NI*	3,2	99,8	99,6

\*NI = não inibiu

## ***5. Discussão***

---

---

## 5. DISCUSSÃO

A infecção causada por *Giardia duodenalis* apresenta grande distribuição mundial, sendo as maiores prevalências registradas nas populações residentes nos países em desenvolvimento, onde as condições sócio-econômicas e sanitárias são precárias. Nessas populações, além da elevada prevalência, a giardíase é uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa.

Há cerca de cinco décadas, desde que DARBON et al. (1962) demonstraram que o metronidazol poderia ser empregado no tratamento da giardíase, este ainda tem sido o medicamento de escolha. Apesar da sua eficácia, apresenta muitos inconvenientes relacionados à toxicidade e à resistência desenvolvida por algumas cepas do parasita.

A fim de encontrar novas alternativas terapêuticas que possam substituir o tratamento com o metronidazol, os produtos naturais de origem vegetal têm sido investigados quanto ao potencial antiparasitário, no entanto, ainda são escassas as pesquisas que demonstram a atividade destas substâncias sobre *Giardia*. O uso das plantas e de seus extratos no tratamento de diversas enfermidades é um hábito muito difundido em diferentes regiões do mundo, uma vez que as plantas consistem em importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos (AMARAL et al., 2006).

Embora uma considerável variedade de espécies de plantas seja utilizada como medicamentos, apenas uma pequena parcela tem sido investigada quanto às suas propriedades biológicas, químicas e farmacológicas, inclusive no que se refere às infecções causadas por parasitas

intestinais, como *Giardia*. Dentre as diferentes espécies avaliadas quanto à atividade giardicida, muitas são comumente utilizadas de forma empírica por diversas populações para o tratamento de distúrbios gastrintestinais como diarreia, principal manifestação decorrente da infecção por *Giardia* (AMARAL et al., 2006).

Considerando as diversas espécies de plantas da flora brasileira, *Astronium fraxinifolium*, mais conhecida como Gonçalo-Alves, gonçaleiro ou aroeira do campo, é uma das que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreias e disenterias. Entretanto, não há dados na literatura científica que demonstrem a atividade desta planta sobre *Giardia duodenalis*. Diante disso, no presente estudo buscou-se avaliar *in vitro* o efeito do extrato hidroalcólico da casca de *Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae) sobre o crescimento e a aderência de trofozoítos de *Giardia* de cepa isolada e axenizada em Botucatu.

Nos ensaios realizados no presente estudo, o extrato hidroalcólico de *A. fraxinifolium* não apresentou atividade satisfatória sobre o crescimento dos trofozoítos. Frente à maioria das concentrações testadas, atividade moderada sobre a multiplicação do parasita foi observada apenas após incubação por 72 horas, exceto nas culturas expostas à concentração de 500 µg/ml, quando a inibição do crescimento foi evidenciada em todos os tempos validados (24, 48 e 72 horas). Vale destacar que a inibição do crescimento não foi dose-dependente, uma vez que a maior taxa de inibição (90%) foi detectada nos cultivos expostos à concentração de 250 µg/ml.

Além da atividade sobre o crescimento, o extrato hidroalcólico de *A. fraxinifolium* foi avaliado quanto ao efeito sobre a capacidade de adesão dos

trofozoítos. Nestes ensaios, observou-se que o extrato apresentou efeito sobre aderência do parasita, sendo que a maior redução do número de trofozoítos aderidos foi detectada nas culturas incubadas com o extrato nas concentrações de 375 e 500 µg/ml e durante 48 horas. Assim, foi possível verificar uma correlação positiva entre o aumento da concentração do extrato e a redução do número de trofozoítos aderidos.

Dentre os parâmetros considerados nos ensaios *in vitro*, os efeitos sobre o crescimento e a aderência dos trofozoítos são parâmetros indispensáveis para avaliar a atividade antiparasitária de diferentes substâncias sobre *Giardia*, uma vez que a multiplicação e a capacidade de aderência dos trofozoítos constituem fatores que estão intrinsecamente implicados na sobrevivência e no estabelecimento da infecção no intestino delgado do hospedeiro.

Até o presente, a despeito do reduzido número de investigações, a maioria reúne informações obtidas em estudos realizados na África, Américas e Ásia (JOHNS et al., 1995; ORDÓÑEZ et al., 2001; McALLISTER et al., 2001; PONCE-MACOTELA et al., 2001; SAWANGJAROEN et al., 2005; CALZADA et al., 2006). Todos estes estudos têm demonstrado o efeito *in vitro* de diferentes extratos, frações e compostos obtidos de plantas sobre o crescimento e a adesão dos trofozoítos de *Giardia*.

No Brasil, ainda há uma grande escassez de estudos, no entanto, investigações publicadas recentemente constataam o efeito de extratos e compostos de espécies de plantas sobre *Giardia*. Nestes estudos, extratos obtidos das plantas *Hovenia dulcis* (GADELHA et al., 2005), *Ocimum basilicum* (de ALMEIDA et al., 2007), *Mentha x piperita* (VIDAL et al., 2007), *Achyrocline satureioides*, *Eugenia uniflora*, *Foeniculum vulgare* e *Psidium guajava*

(BRANDELLI et al., 2009), espécies popularmente utilizadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais e de infecções por enteroparasitas, foram avaliadas quanto à atividade sobre o crescimento e adesão de trofozoítos de *Giardia*.

Em revisão recente da literatura sobre as plantas e os respectivos compostos que apresentam atividade giardicida, AMARAL et al. (2006) reportam que a avaliação *in vitro* já foi investigada em 153 espécies de plantas de diferentes regiões do mundo, das quais 117 apresentaram extratos com atividade sobre trofozoítos. Além disso, esses mesmos autores relatam que as plantas avaliadas estão distribuídas em 69 famílias, a maioria pertencente às famílias Asteraceae, Fabaceae, Rutaceae e Verbanaceae.

No que se refere à família Anacardiaceae, que inclui a espécie *Astronium fraxinifolium* avaliada no presente estudo, em apenas três investigações há relatos da atividade giardicida de extratos alcoólicos obtidos de plantas (*Lanea schweinfurthii*, *Mangifera indica*, *Ozoroa insignis*, *Rhus natalensis* e *Schimus molle*) pertencentes a este grupo e empregadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais no México (PONCE-MACOTELA et al., 1994; CALZADA et al., 2006) e na África (JOHNS et al., 1995). Nestes ensaios, todos os extratos promoveram a inibição do crescimento do parasita, sendo que em relação aos extratos obtidos de *Ozoroa insignis* (JOHNS et al., 1995) e *Mangifera indica* (PONCE-MACOTELA et al., 1994), ambos demonstraram letalidade significativa sobre os trofozoítos expostos a estes compostos.

No que se refere aos estudos desenvolvidos no Brasil, extratos de plantas da família Anacardiaceae já foram avaliados quanto à atividade sobre microrganismos como fungos e bactérias (BRAGA et al., 2007; ALVES et al., 2009). No que se referem à atividade antiparasitária de plantas desta família,

as únicas evidências disponíveis foram obtidas em estudos que constataram o efeito leishmanicida dos extratos das espécies *Anacardium occidentale* e *Schinus terebinthifolius* (FRANÇA et al., 1996; BRAGA et al., 2007).

Até o presente, não há registros, na literatura científica, de estudos que avaliam a atividade de extratos de planta dessa família botânica sobre *Giardia*. Dessa forma, este é o primeiro relato que demonstra *in vitro* a atividade do extrato hidroalcoólico de *A. fraxinifolium* sobre esse protozoário, especialmente no que se refere à adesão dos trofozoítos, uma vez que o efeito sobre a multiplicação não foi satisfatório. Dentre os parâmetros considerados nos ensaios *in vitro*, os efeitos sobre o crescimento e a aderência dos trofozoítos são parâmetros indispensáveis para avaliar a atividade antiparasitária de diferentes substâncias sobre *Giardia*, pois a multiplicação e a capacidade de aderência dos trofozoítos constituem fatores que estão intrinsecamente implicados na sobrevivência e no estabelecimento da infecção no intestino delgado do hospedeiro.

As plantas são capazes de produzir inúmeras substâncias com atividade biológica, todavia, é importante ressaltar que, nos extratos, esta atividade depende da presença de apenas uma ou de um grupo de substâncias. Diante disso, é pertinente considerar que a diferença observada em relação aos efeitos do extrato de *A. fraxinifolium* sobre o crescimento e a aderência dos trofozoítos de *Giardia* possa estar associada à composição dos extratos, que geralmente varia quanto à concentração e às características biológicas e bioquímicas de determinados componentes. Assim, os extratos vegetais são preparações complexas e incluem substâncias, que sob certas circunstâncias, podem apresentar mecanismos de ação distintos.



A caracterização química de substâncias isoladas de plantas tem demonstrado que a maioria dos extratos bioativos inclui em sua composição flavanóides, alcalóides e taninos (BRAGA et al., 2007). Análises fitoquímicas realizadas pelo grupo de Pesquisas em Química de Produtos Naturais (QNP) do Instituto de Química/UNESP/Arararquara e confirmadas por estudos anteriores (CORREIA et al., 2006) revelam que o extrato hidroalcolólico da casca de *A. fraxinifolium* apresenta uma diversidade de metabólitos secundários, que vão desde inúmeros derivados dos ácidos gálico e clorogênico a flavonóides e taninos complexos. Apesar da diversidade deste extrato, os taninos condensados são os componentes majoritários.

Plantas do gênero *Astronium* são ricas em substâncias tânicas, o que confirma os relatos de usos populares da “água das cascas” de *A. fraxinifolium* para o tratamento de inflamações gástricas e vaginais. Pesquisas sobre a atividade biológica dos taninos têm evidenciado importante ação anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorragica, cicatrizante e antiinflamatória destes compostos (MONTEIRO et al., 2005).

Apesar das evidências de que flavonóides, alcalóides e taninos presentes nas plantas têm atividade sobre bactérias, fungos e parasitas, os mecanismos de ação destes compostos ainda não foram totalmente elucidados. Considerando o predomínio dos taninos condensados no extrato hidroalcolólico de *A. fraxinifolium*, é importante chamar a atenção para o fato de que a atividade antimicrobiana destes compostos tem sido atribuída, especialmente, à habilidade de interagir com proteínas e inativar as adesinas e proteínas de transporte presentes na parede celular das bactérias (YA et al., 1988). À luz dessas informações e na tentativa de interpretar o efeito *in vitro* do

extrato hidroalcoólico apenas sobre a aderência dos trofozoítos de *Giardia*, não se poderia deixar de especular sobre a possível ação dos taninos sobre o mecanismo de adesão do parasita. Vale destacar que a aderência do parasita tem sido atribuída ao disco adesivo, por meio da combinação de forças mecânicas e hidrodinâmicas, às proteínas contráteis do citoesqueleto e às moléculas de adesinas presentes na superfície do trofozoíto (INGE et al., 1988).

Mesmo considerando que o extrato hidroalcoólico de *Astronium fraxinifolium* não apresentou efeito satisfatório sobre o crescimento de trofozoítos de *Giardia*, os seguintes aspectos devem ser ressaltados: (1) o extrato foi empregado na sua forma bruta e com isso, é provável que a avaliação das frações possa melhorar a atividade sobre o crescimento dos trofozoítos; (2) ainda não se conhece o(s) mecanismo(s) de ação do extrato testado sobre o parasita; (3) é crescente o interesse em pesquisar e desenvolver novas drogas para a terapêutica das infecções parasitárias a partir de produtos naturais.

Finalmente, os resultados obtidos no presente estudo, apesar de preliminares, vêm reforçar a necessidade de investigações mais aprofundadas, a fim de caracterizar o potencial de extratos de espécies de plantas usadas na medicina popular como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da infecção causada por *Giardia*.

## ***6. Resumo***

---

---

## 6. RESUMO

As investigações conduzidas para avaliar novas substâncias para o tratamento da giardíase justificam-se pelo fato dos medicamentos convencionais apresentarem inconvenientes relacionados à toxicidade, à resistência e aos custos. Diante disso, a busca por novas alternativas terapêuticas tem despertado grande interesse, principalmente, entre os extratos de plantas, produtos complexos com diferentes atividades biológicas e farmacológicas. Considerando que nas infecções por *Giardia*, a diarreia é um dos principais sintomas, tem sido crescente o interesse em se investigar o efeito de extratos de plantas com atividade antidiarréica. Com isso, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar *in vitro* o efeito do extrato hidroalcoólico da casca da planta *Astronium fraxinifolium*, espécie típica do Cerrado brasileiro e empregada na medicina popular no tratamento contra inflamações, diarreias e úlceras gástricas. Para este fim, avaliou-se a atividade sobre o crescimento e aderência de trofozoítos de cepa autóctone de *Giardia duodenalis* isolada e axenizada em Botucatu, São Paulo.

Em todos os ensaios,  $10^5$  trofozoítos da cepa BTU-11 foram inoculados em tubos contendo 4,5ml de meio TYI-S-33 e 100 $\mu$ l do extrato nas concentrações de 125; 250; 375 e 500  $\mu$ g/ml. Para avaliar a atividade sobre o crescimento, os parasitas foram incubados com o extrato durante 24, 48 e 72 horas a 37°C. Nos experimentos que verificaram o efeito sobre a aderência, somente os parasitas aderidos às paredes dos tubos foram incubados com o extrato, durante 24 e 48 horas a 37°C. Em cada ensaio, os trofozoítos recuperados foram contados em câmara de Neubauer e a atividade sobre as

culturas foi avaliada considerando o número de parasitas recuperados nos cultivos-controle.

Os ensaios realizados demonstraram atividade moderada do extrato sobre o crescimento *in vitro* de trofozoítos de *Giardia* somente após 72 horas de incubação, sendo que a maior taxa de inibição (90%) do crescimento foi observada no cultivo exposto à concentração de 250 µg/ml. Diferentemente do que foi observado nos ensaios de crescimento, o efeito sobre a aderência foi dose-dependente, sendo que as maiores taxas de inibição foram detectadas nos cultivos expostos às concentrações mais altas do extrato. Assim, o efeito inibitório foi marcadamente maior nos tubos contendo o extrato a 375 e 500 µg/ml, sendo que após 48 horas de incubação, as taxas de inibição foram, respectivamente, 99,8% e 99,6%.

Este é o primeiro estudo que avalia *in vitro* a atividade do extrato hidroalcólico de *Astronium fraxinifolium* e demonstra o efeito sobre o crescimento e, em especial, sobre a aderência dos trofozoítos. Considerando a busca por novas alternativas no tratamento das infecções parasitárias, inclusive por *Giardia*, os resultados da presente investigação fornecem evidências importantes sobre o potencial antiparasitário do extrato testado e abrem perspectivas para estudos futuros que possam avaliar o efeito de outros tipos de extratos de plantas comumente empregadas na medicina popular.

## ***7. Referências Bibliográficas***

---

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABDEL-FATTAH, N.S., NADA, O.H. Effects of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. **J. Egypt Soc. Parasitol.**, v.37, n.2, p.691-710, 2007.

AGARWAL, A.K. et al. Management of giardiasis by a herbal drug “Pippali Rasayana”: a clinical study. **J. Ethnopharmacol.**, v.56, n.3, p.233-236, 1997.

de ALMEIDA, I. et al. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitol. Res.**, v.101, n.2, p.443-452, 2007.

ALVES, P.M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Cândida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.42, n.2, p.222-224, 2009.

AMARAL, F.M.M. et al. Plants and chemical constituents with giardial activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, p.696-720, 2006.

ANTHONY, J.P., FYFE, L., SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends. Parasitol.**, v.21, n.10, p.462-468, 2005.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p

ANTHONY, J.P. et al. The effect of blueberry extracts on *Giardia duodenalis* viability and spontaneous excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *in vitro*. **Methods**, v.42, p.339-348, 2007.

APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C, OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife: current status and future needs. **Trends. Parasitol.**, v.21, n.8, p.370-376, 2005.

BANDEIRA, M.A.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste, Myracrodruon urundeuva Fr. All. (= Astronium urundeuva Engl.) aroeira-do-sertão**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Ceará, 1993.

BARAT, L.M., BLOLAND, P.B. Drug resistance among malaria and other parasites. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.11, n.4, p.969-987, 1997.

BENDESKY, A., MENÉNDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat. Res.**, v.511, n.2, p.133-144, 2002.

BOREHAM, P.F., PHILIPS, R.E., SHEPHERD, R.W. The activity of drugs against *Giardia intestinalis* in neonatal mice. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.18, n.3, p.393-398, 1986.

BRAGA, F.G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v.111, n.2, p.396-402, 2007.



BRANDELLI, C.L. et al. Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. **Parasitol. Res.**, v.104, n.6, p.1345-1349, 2009.

BRASIL. Instrução normativa, de setembro de 2008. Ministério do Meio Ambiente, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 2008. Anexo II: Lista de Espécies da Flora Brasileira com Deficiência de Dados, p.25.

CALZADA, F., YÉPEZ-MULIA, L., AGUILAR, A. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p.367-370, 2006.

CALZADA, F. et al. Evaluation of the antiprotozoal activity of neo-clerodane type diterpenes from *Salvia polystachya* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Phytother. Res.**, v.24, n.5, p.662-665, 2010.

CHEN, T.K., WIEMER, D.F., HOWARD, J.J. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. **Naturwissenschaften**, v.71, p.97-98, 1984.

CORREIA, S.J., DAVID, J.P., DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Quim. Nova**, v.29, n.6, p.1287-1300, 2006.

DARBON, A. et al. [Treatment of giardiasis (lambliasis) with metronidazole. Apropos of 100 cases]. **Presse Med.**, v.70, p.15-16, 1962.

EDLIND, T.D., HANG, T.I., CHAKRABORTY, P.R. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. **J. Infect. Dis.**, v.162, p.1408-1411, 1990.

FARTHING, M.J. Giardiasis. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v.25, n.3, p.493-515, 1996.

FARTHING, M.J. et al. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.43, n.3, p.395-405, 1986.

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

FREITAS, S.F. et al. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v.13, p.170-175, 2006.

GADELHA, A.P.R. et al. Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extract. **Parasitol Res.**, v.97, n.5, p.399-407, 2005.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.1, p.114-128, 2001.

HAWRELAK, J. Giardiasis: Pathophysiology and Management. **Alternative Medicine Review**, v.8, n.2, p.129-142, 2003.

INGE, P.M., EDSON, C.M., FARTHING, M.J. Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. **Gut.**, v.29, n.6, p.795-801, 1988.

JOHNS, T. Anti-giardial activity of gastrointestinal remedies of the Luo of east Africa. **J. Ethnopharmacol.**, v.46, n.1, p.17-23, 1995.

KARANIS, P., KOURENTI, C., SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J. Water Health**, v.5, n.1, p.1-38, 2007.

KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.77, p.487-488, 1983.

KULDA, J., NOHÝNKOVÁ, E. *Giardia* in humans and animals. In: **KREIER, J. P. (ed.), Parasitic Protozoa, Academic Press**, p.229-268, 1995.

LIU, S.M. et al. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.108, n.1, p.137-140, 2000.

MAIA, J.G.S., DA SILVA, M.H.L., ANDRADE, E.H.A. Essential oils from *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. and *A. fraxinifolium* Schott ex Spreng. **Flavour Fragr. J.**, v.17, p.72-74, 2002.

McALLISTER, T.A. et al. Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. **Vet. Parasitol.**, v.97, p.85-99, 2001.

MENEZES, A.M.S., RAO, V.S. Effect of *Astronium urundeuva* on gastrointestinal transit in mice. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.21, p.531-533, 1988.

MENEZES, A.M.S., RAO, V.S., FONTELES, M.C. Antiinflammatory activity of *Astronium urundeuva*: possible mechanisms involved. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.18, p.7224, 1985.

MIYARES, C. et al. Clinical trial with a preparation based on propolis "propolisina" in human giardiasis. **Acta Gastroenterol. Latinoam.**, v.18, n.3, p.195-201, 1988.

MONTEIRO, J.M., ALBUQUERQUE, U.P., ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem química à ecologia. **Quim. Nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

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

Organização Mundial da Saúde, 2000. **Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde**. 10a revisão, São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v. 1, 1191 p.

PAGET, T.A. et al. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **Journal of General Microbiology**, v.135, n.1, p.145-154, 1989a.

PÉREZ-ARRIAGA, L. et al. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. **Acta Tropica**, v.98, p.152-161, 2006.

PONCE-MACOTELA, M. et al. [In vitro effect against *Giardia* of 14 plant extracts]. **Rev. Invest. Clin.**, v.46, n.5, p.343-347, 1994.

PONCE-MACOTELA, M. et al. Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. **Proc. West Pharmacol. Soc.**, v.44, p.151-152, 2001.

PONCE-MACOTELA, M. et al. Oregano (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites *in vitro*: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. **Parasitol. Res.**, v.98, p.557-560, 2006.

RAO, V.S. et al. Effect of *Astronium urundeuva* engl. (aroeira) in experimental colitis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.19, p.568, 1986.

RAO, V.S. et al. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* engl. II. Aqueous extract. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.20, p.803-805, 1987.

SANGSTER, N. et al. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. **Int. J. Parasitol.**, v.32, n.5, p.637-653, 2002.

SAWANGJAROEN et al. The in vitro anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in southern Thailand. **Parasitol. Res.**, v.95, n.1, p.17-21, 2005.

SERIKAVA, S.M.O. **Avaliação da atividade anti-ulcerogênica, antidiarréica e antiinflamatória de *Astronium fraxinifolium* Schott.** 50f. Relatório (Projeto de Iniciação Científica) – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2009.

SHINOHARA, L. et al. *In vitro* effects of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* venoms on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Parasitol. Res.**, v.98, n.4, p.339-344, 2006.

THOMPSON, R.C., REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H. *Giardia* and giardiasis. **Adv. Parasitol.**, v.32, p.71-160, 1993.

THOMPSON, R.C. et al. The zoonotic transmission of *Giardia* species. **Vet. Rec.**, v.126, n.20, p.513-514, 1990.

UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.1, p.150-164, 2001.

VIDAL, F. et al. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. **Exp. Parasitol.**, v.115, n.1, p.25-31, 2007.

WEBSTER, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In "Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics", 8<sup>th</sup> ed. (A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor, eds), p.978-1007. **Pergamon Press, New York**, 1990.

YA, C. et al. Carbohydratepolyphenol complexation, p.553. *In* R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), Chemistry and significance of condensed tannins. New York, N. Y.: **Plenum Press**, 1988.

ZAAT, J.O., MANK, T.G., ASSENDELFT, W.J. A systematic review on the treatment of giardiasis. **Trop. Med. Int. Health**, v.2, n.1, p.63-82, 1997.