

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

JESSICA NASCIMENTO MORAES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DO
EXTRATO ETANÓLICO E ÓLEO ESSENCIAL DE
Chenopodium ambrosioides L. NO CONTROLE DE
Ancylostoma spp. de CÃES**

ALEGRE-ES

2012

JESSICA NASCIMENTO MORAES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DO
EXTRATO ETANÓLICO E ÓLEO ESSENCIAL DE
Chenopodium ambrosioides L. NO CONTROLE DE
Ancylostoma spp. de CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Orientadora: Profa. Dra. Lenir Cardoso Porfírio.

ALEGRE-ES

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Monteiro, Jessica Nascimento Moraes, 1986-

M775a Avaliação do potencial anti-helmíntico do extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no controle de *Ancylostoma* spp. de cães / Jessica Nascimento Moraes Monteiro. – 2013.

58 f. : il.

Orientadora: Lenir Cardoso Porfirio.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Cão - Doenças. 2. Erva-de-santa-maria. 3. Plantas medicinais. 4. Essências e óleos essenciais. 5. Helmintos. I. Porfirio, Lenir Cardoso. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

JESSICA NASCIMENTO MORAES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DO
EXTRATO ETANÓLICO E ÓLEO ESSENCIAL DE
Chenopodium ambrosioides L. NO CONTROLE DE
Ancylostoma spp. de CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovada em: ____/____/____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Lenir Cardoso Porfírio
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Profa. Dra. Isabella Vilhena Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Fúlvia Maria dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Adilson Vidal Costa
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico este trabalho as pessoas que sempre estiveram ao meu lado pelos caminhos da vida, me acompanhando, apoiando e principalmente acreditando em mim: Meus pais Jair Caetano Monteiro e Denise Nascimento Moraes Monteiro e minha irmã Erica Nascimento Moraes Monteiro.

Dedico também a pessoa que sempre foi exemplo de caráter, dignidade e principalmente bondade muito presente em minha vida: Vovó Edy Nascimento Moraes.

Ao meu namorado Ramon de Paiva Januário pelo incentivo, companheirismo e paciência em períodos de ausência para completar mais esta jornada.

Vocês são muito especiais para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por estar sempre comigo e ter dado a chance de concluir mais uma etapa da minha vida.

À minha orientadora Lenir Cardoso Porfirio por ter plantado a grande ideia, acreditado na importância deste trabalho, estimulado a realizá-lo e acompanhado durante toda a trajetória e ainda dedicou muito, muito mesmo, do seu tempo me orientando. Sem você não teria conseguido. Obrigada pelos ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo deste período, muito obrigada.

A professora Isabella Vilhena Freire Martins pela ajuda nas etapas mais importantes do experimento, obrigada pelo seu precioso ensinamento, sempre disposta a clarear minhas dúvidas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e a Universidade Federal do Espírito Santo agradeço pelo conhecimento, e principalmente pela postura ética que me ensinaram.

Ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinário, VetLab-ES, pelo auxílio e realização das análises hematológicas e bioquímicas. Muito obrigada a Adrienne Brêtas Lanis e Clarisse Máximo Arpini pela ajuda, que com certeza foi indispensável.

Agradeço aos amigos que me apoiaram e fizeram este período de mestrado mais feliz Barbara Rauta de Avelar, Bianca Barcelos Martins, Daniel Cometti Borlini, Edlayne Pimentel de Moraes, Gabriela Porfirio Passos e Lívia Caliman Ferreira.

E claro, espero que não tenha esquecido ninguém, mas se isso aconteceu agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me auxiliaram neste trabalho, mas não posso deixar de agradecer aquele que sem eles, esse trabalho não teria sentido, os cães, meu sincero respeito e reconhecimento pela sua importância para a Ciência.

Muito obrigada a todos

Concedei-nos Senhor, serenidade necessária, para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir umas das outras.

Reihold Niebuhr

RESUMO

A fitoterapia é frequentemente utilizada no controle das parasitoses de diversas espécies animais. Objetivou-se avaliar as larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma* spp. imersas em extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no teste *in vitro*. Utilizou-se água destilada (controle negativo) e albendazole e associação comercial de praziquantel, pamoato de pirantel e febantel (controles positivos). O extrato etanólico de *C. ambrosioides* L. nas concentrações 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 8,0%, 10,0%, 12,0% e 20% apresentaram insuficiente atividade para o efeito larvicida. O óleo essencial na concentração de 150µL.mL⁻¹ foi eficaz contra L₃. A formulação de biscoito manipulado com a concentração de 37,5µL.g⁻¹ do óleo essencial *C. ambrosioides* L reduziu o número de ovos por grama de fezes dos cães. Vinte e seis cães adultos foram divididos em três grupos para o teste *in vivo*: F1 (biscoito sem princípio ativo), F2 (biscoito com princípio ativo de *C. ambrosioides* L.), F3 (biscoito com princípio ativo alopático). No hemograma, houve diferença significativa no F1 para os valores de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e albumina na bioquímica sérica. O F2 apresentou diferença no CHCM e na bioquímica a proteína sérica e globulina. O F3, os valores para linfócitos e monócitos no hemograma e a albumina e globulina foram diferentes entre o M1 e M2. No exame parasitológico o F1 manteve-se parasitado, enquanto o F2 reduziu de forma significativa a infecção e o F3 apresentou resultado negativo no M2. Conclui-se que a formulação de biscoito manipulado com óleo essencial *C. ambrosioides* L reduziu a infecção de *Ancylostoma* spp. em cães naturalmente parasitados.

Palavras-chave: erva-de-santa-maria, planta medicinal, óleo essencial. helmintos.

ABSTRACT

Phytotherapy is often used for parasitic diseases controlling in several animal species. This study aimed to evaluate the infective larvae (L3) of *Ancylostoma* spp. immersed in ethanol extract and *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil in the *in vitro* test. It was used distilled water (negative control) and albendazole and commercial association of praziquantel, pyrantel pamoate and febantel (positive controls). The ethanol extract of *C. ambrosioides* L. at concentration of 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%, 6.0%, 8.0%, 10.0%, 12.0% and 20% had insufficient activity to the larvicidal effect. The essential oil at concentration of $150\mu\text{L.mL}^{-1}$ was effective against L₃. The formulation of a biscuit manipulated with a concentration of $37,5\mu\text{L.g}^{-1}$ of the *C. ambrosioides* L. essential oil reduced the number of eggs per gram of the dogs' feces. Twenty-six adult dogs were divided into three groups for *in vivo* testing: F1 (biscuit without active ingredient), F2 (biscuit with *C. ambrosioides* L. active principle), F3 (biscuit with allopathic active ingredient). At the CBC, there were significant differences in F1 for values of red blood cells, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and albumin in serum biochemistry. The F2 showed difference in MCHC and in biochemical the serum protein and globulin. The F3, lymphocytes and monocytes values in the blood count and albumin and globulin were different between M1 and M2. At the parasitological exam F1 remained parasitized, while the F2 reduced significantly the infection and F3 showed negative result in M2. It is concluded that the formulation of a biscuit manipulated with *C. ambrosioides* L. essential oil reduced the *Ancylostoma* spp. infection in naturally infected dogs.

Keywords: herb-of-santa-maria, medicinal plants, essential oil, Helminths.

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

<i>A. braziliensis</i>	<i>Ancylostoma braziliensis</i>
<i>A. caninum</i>	<i>Ancylostoma caninum</i>
<i>A. ceylanicum</i>	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>
<i>A. glaucus</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>
<i>A. Níger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. ochraceous</i>	<i>Aspergillus ochraceous</i>
a.C	Antes de Cristo
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
<i>C. ambrosioides</i>	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.
<i>C. musae</i>	<i>Colletotrichum musae</i>
CCZ	Centro de controle de zoonoses
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ESM	Erva-de-santa-maria
<i>F. semitectum</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
F1	Grupo experimental que consumiu biscoito sem princípio ativo
F2	Grupo experimental que consumiu biscoito com princípio ativo do óleo essencial de <i>C. ambrosioides</i> L.
F3	Grupo experimental que consumiu biscoito com princípio ativo alopático
FA	Fosfatase alcalina
ID	Intestino delgado
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
L ₃	Larva infectante
M1	Momento inicial
M2	Momento final
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Ovos por grama de fezes
<i>P. brachyurus</i>	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
<i>T. canis</i>	<i>Toxocara canis</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	FITOFÁRMACOS E FITOTERÁPICOS.....	15
2.2	METABOLISMO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	16
2.3	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	16
2.3.1	Classificação científica.....	17
2.3.2	Descrição botânica.....	17
2.3.3	Composição química.....	17
2.3.4	Mecanismo de ação e toxicidade do <i>C. ambrosioides</i> L.....	18
2.3.5	Aplicações do <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	21
2.4	CLASSIFICAÇÃO, BIOLOGIA E PATOLOGIA DO <i>Ancylostoma</i> spp.....	22
2.5	TRATAMENTOS UTILIZADOS EM ANCILOSTOMÍASE DE CÃES.....	24
	CAPÍTULO 1	26
3	Cap.1 - Avaliação do potencial anti-helmíntico do extrato etanólico e óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. no controle de <i>Ancylostoma</i> spp. de cães.....	
3.1	RESUMO	27
3.2	ABSTRACT	28
3.3	INTRODUÇÃO	29
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.4.1	Obtenção da planta.....	30
3.4.2	Obtenção do extrato etanólico de <i>C. ambrosioides</i> L.....	30
3.4.3	Obtenção do óleo essencial de <i>C. ambrosioides</i> L.....	31
3.4.4	Obtenção de larvas de terceiro estágio de <i>Ancylostoma</i> spp.....	31
3.4.5	Formação dos grupos e teste <i>in vitro</i> com extrato etanólico e óleo essencial de <i>C. ambrosioides</i> L.....	32
3.4.6	Formulação do biscoito com óleo essencial de <i>C. ambrosioides</i> L.	33
3.4.7	Seleção dos animais, formação dos grupos e teste <i>in vivo</i> com óleo essencial de <i>C. ambrosioides</i> L. em biscoito medicamentoso	33

3.4.8	Hematologia, bioquímica sérica e parasitológico de fezes dos animais	34
3.5	RESULTADOS.....	35
3.6	DISCUSSÃO.....	36
3.7	CONCLUSÃO.....	39
3.8	REFERÊNCIAS.....	40
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
5	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A noção pelos povos primitivos das propriedades terapêuticas de plantas foram passadas de geração em geração. Muitas passaram a fazer parte das farmacopéias a partir do século XIX, quando iniciaram a pesquisar de novos medicamentos por meio da etnofarmacologia caracterizada pelo uso tradicional por populações e a coincidência de usos entre diferentes populações (PINTO, AMOROZO e FURLAN, 2006).

Porém, a continuidade do uso de plantas medicinais, pelo uso tradicional foi ameaçada pela interferência de fatores externos à dinâmica social dos grupos como a maior exposição das comunidades à sociedade envolvente e, às pressões econômicas e culturais; maior facilidade de acesso aos serviços da medicina alopática; deslocamento das pessoas de seus ambientes naturais para regiões urbanas, o que leva à perda do caráter utilitário do conhecimento popular acumulado há várias gerações (AMOROZO, 2002).

A primeira citação sobre plantas medicinais com atividade anti-helmíntica foi identificada no papiro de Ebers, que descrevia o uso da infusão da casca de romã, *Punica granatum* (Punicaceae), para o tratamento de Heltu, helmintose comum no antigo Egito (SPINOSA et al., 2002). Hoje, a principal forma de controle dos parasitos do trato digestivo é baseada em tratamento com antiparasitário sintético (MORENO et al., 2010).

Com a necessidade de reduzir o uso dos anti-helmínticos sintéticos iniciou diferentes pesquisas, nesta área, como o controle biológico com fungos nematófagos (LARSEN, 2000); produção de vacinas contra helmintos (VERCRUYSSSE et al., 2007) e uso de metabólitos secundários das plantas ricas em tanino (OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, a planta *Chenopodium ambrosioides* L. neste início de século, ainda usada nas Américas como remédio popular contra infecções por verme intestinal na forma de infusão, e com o óleo essencial (MACDONALD et al., 2004).

No presente estudo objetivou-se avaliar o potencial anti-helmíntico do extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no controle de *Ancylostoma* spp. de cães

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FITOFÁRMACOS E FITOTERÁPICOS

O papiro de Ebers é um documento datado de 1550 a.C. e faz menção a várias substâncias químicas utilizadas como remédio pela antiga civilização egípcia, como os metais pesados (chumbo e cobre), venenos de animais e extratos de plantas (genciana, óleo de rícino) (SPINOSA et al., 2002).

Desde os primórdios, o homem vem se relacionando com as plantas, dependendo delas para a sobrevivência, manipulando-as para suas necessidades (MEDEIROS et al., 2004). A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006).

Nas farmacopéias existentes no século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais. Como na Farmacopéia Geral para o Reino e Domínios de Portugal, de 1794, constavam 30 produtos de origem mineral, 11 produtos de origem animal e cerca de 400 espécies vegetais (SCHENKEL, GOSMANN e PETROVICK, 2003). No século XX a fitoterapia é descontinuada em virtude do aparecimento de medicamentos sintéticos, após o início do isolamento de princípios ativos da cada planta (MAURY, 2002).

Deve-se considerar que a oferta de fitoterápicos registrados, com espectro de ação adequado e com indicações terapêuticas definidas, conta com a segurança de medicamento padronizado e com eficácia garantida (KLEIN et al., 2009), pois em diversos países desenvolvidos, mais pessoas estão usando práticas tradicionais e complementares combinadas para aliviar dores crônicas e/ou melhorar a qualidade de vida (SAVO et al., 2011), entretanto o estímulo ao uso de fitofármacos não visa a substituição de medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica (KLEIN et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), agência especializada em saúde, estabelece políticas públicas que determinam pesquisas, geração, difusão e utilização de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, no

intuito de que os países utilizem recursos naturais disponíveis em seus próprios territórios para promover a atenção primária à saúde (ANVISA, 2010).

2.2 METABOLISMO DAS PLANTAS MEDICINAIS

As plantas, de forma semelhante aos micro-organismos, produzem diversas substâncias químicas derivadas do metabolismo secundário, entre elas os flavonoides, alcaloides, taninos, antraquinonas, óleos essenciais, saponinas, cumarinas, dentre outras. Há três principais precursores de metabólitos secundários: o ácido chiquímico como precursor de compostos aromáticos; o acetato como precursor de ácidos graxos, polifenóis, prostaglandinas, isopreno, etc; e os aminoácidos como precursores de alcaloides (CASTRO et al., 2004). Estas substâncias são as fontes de componentes químicos responsáveis por amplas atividades terapêuticas (MACEDO et al., 2010).

Muitos desses compostos ou grupos deles são chamados de princípios ativos e podem provocar reações nos organismos, que dependendo da dose utilizada podem ser tóxicas. Os componentes químicos farmacológicos da maioria das espécies de plantas são bem conhecidos, no entanto, estudos fitoquímico e farmacológico ainda são necessários (CAPASSO et al., 1982), pois desta forma muitas drogas importantes foram descobertas, como a aspirina, codeína, pilocarpina, quinina e outras (GERTSCH, VIVEROS-PAREDES e TAYLOR, 2011), as quais foram estudadas sob os pontos de vista químico, farmacológico e toxicológico para que sejam utilizadas na terapêutica com segurança (GADANO et al., 2006).

2.3 *Chenopodium ambrosioides* L.

2.3.1 Classificação científica

Reino:	Plantae	Sub-famílias:
Filo:	Magnoliophyta	Amaranthoideae
Classe:	Magnoliopsida	Chenopodioideae
Ordem:	Caryophyllales	Gomphrenoideae
Família:	Amaranthaceae	Salicornioideae
Gênero:	<i>Chenopodium</i>	Salsoloideae
Espécie:	<i>ambrosioides</i>	

Quadro 1: Classificação do *Chenopodium ambrosioides* L.

(STEVENS, 2012)

2.3.2 Descrição botânica

C. ambrosioides L., erva-de-santa-maria ou mastruz é descrita como planta herbácea anual ou perene, de forte aroma, normalmente ereta, com cerca de 1 m de altura, reproduzida por semente. A produção de sementes é muito intensa, podendo chegar a dezenas de milhares por planta (BLANCKAERT et al., 2012). É uma planta aromática, utilizada como condimento e manipulada desde tempos pré-hispânicos (SANTOS et al., 2012). No Brasil é extensa a sua distribuição, com ocorrência em todo o território, sendo considerada erva daninha (MATOS, 2000).

Chenopodium ambrosioides L. pertence à família Amaranthaceae (Quadro 1), que possui distribuição cosmopolita, exceto pelas regiões mais frias do Hemisfério Norte. Esta família inclui cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, e no Brasil ocorrem 20 gêneros nativos e aproximadamente 100 espécies (DOS SANTOS et al., 2010).

2.3.3 Composição química

Na abordagem fitoquímica da *C. ambrosioides* L. ocorre a presença de flavonóides, saponinas e óleo essencial (JORGE, FERRO e KOSCHTSCHAK, 1986). O óleo essencial de *C. ambrosioides* L. ou erva-de-santa-maria (ESM)

apresenta composição variável em qualidade e quantidade, o que depende da localização geográfica da planta (GILLIJ, GLEISER e ZYGADLO, 2008).

Na composição do óleo foram identificadas o α -terpineno em Ruanda (MUHAYIMANA, CHALCHATA e GARRY, 1998) com 64%; na Índia (GUPTA et al., 2002) com 56%; na Nigéria, por Onocha, Oloyede e Afolabi (1999). O ascaridol foi identificado por Muhayimana, Chalchata e Garry et al. (1998) com 7% e por Gupta et al. (2002). O p-cimeno obtido por Gupta et al. (2002) com 19%; por Onocha, Oloyede e Afolabi (1999) com 15,5% e em Cuba por Pino et al. (2003) com 4,3% e acetato de terpenila foi identificado por Onocha, Oloyede e Afolabi (1999) em 15,7% e por Pino et al. (2003) com 73,9%.

No Brasil, em Viçosa, MG, as 13 substâncias químicas encontradas foram α -Terpineno (0,9%), p-Cimeno (2,0%), Benzil álcool (0,3), p-Crezol (0,3%), p-Menta-1,3,8-triene (0,2%), p-Cimen-8-ol (0,6%), α -Terpineol (0,5%), Z-Ascaridol (61,4%), Piperitone (0,9%), Carvacrol (3,9%), (E)-Ascaridol (18,6%), (E)-Piperitol acetato (0,5%), (Z)-Carvyl acetato (0,2%) (JARDIM et al., 2010).

Na análise da composição química do óleo volátil das folhas de *C. ambrosioides*, coletadas no município de Alegre-ES, e realizada pelo Professor Doutor Adilson Vidal Costa, resultou na identificação de cinco compostos totalizando 98,81% da sua composição, piperitone (0,7%), α -terpineno (1,24%), p-cymeno (4,83%), (E)-ascaridol (5,04%), (Z)-ascaridol (87%), sendo o último o principal componente presente na mistura (VIEIRA et al., 2011).

2.3.4 Mecanismo de ação e toxicidade do *C. ambrosioides* L.

No início do século 19, a *C. ambrosioides* L. foi destilada a vapor para produzir o óleo essencial, conhecido como "óleo de Baltimore". Este óleo foi amplamente utilizado como vermífugo. No entanto, a produção em escala comercial declinou devido ao surgimento de medicamentos modernos, e principalmente pela toxicidade (MONZOTE et al., 2009).

O óleo essencial da *C. ambrosioides* L. constitui proteção da planta contra predadores e infestantes, atrativos para sua polinização e repelente contra

herbívoros (PEREIRA et al., 2010). Os componentes ativos extraídos do óleo essencial de *C. ambrosioides* L. como o ascaridol, carvacrol e óxido cariofileno inibiram o crescimento de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Este estudo também demonstrou que o mecanismo de ação citotóxica do óleo e de seus componentes está relacionado com a inibição da função respiratória desempenhada pelas mitocôndrias dentro das células (MONZOTE et al., 2009). Para Rattan (2010) o mecanismo de ação da *C. ambrosioides* L. ocorre como uma teia em que os caminhos e as moléculas interagem em uma forma flexível e dinâmica nesse fitocomplexo.

A toxicidade da *C. ambrosioides* na maioria das vezes está relacionada ao óleo essencial, cuja concentração na planta é variável com a região onde a mesma se encontra (SINGH et al., 2008) e alguns casos têm ocorrido em seres humanos e ratos, especialmente quando utilizado em grandes quantidades, com manifestação dos seus efeitos nos rins, fígado e intestino (PEREIRA et al., 2010). Para Gadano et al. (2006) há gastroenterites com hiperemia difusa, seguidas de alterações no sistema nervoso central, com cefaleia, rubor facial, visão turva, vertigem, incoordenação, parestesia e por isso, sugerem o uso de extratos desta planta, visto que, o óleo essencial possui potencial tóxico e em overdoses pode levar a morte.

A toxicidade do ascaridol, principal constituinte do óleo essencial de *C. ambrosioides* foi confirmada por MacDonald et al. (2004) ao observarem os efeitos deste constituinte e da infusão das folhas da planta isenta de ascaridol sobre a musculatura lisa gastrintestinal de ratos; constataram que a redução da contração muscular foi observada apenas na presença do ascaridol. Sugeriram que a utilização da infusão isenta de ascaridol como anti-helmíntico seja mais segura para mamíferos.

A dose que provoca efeitos adversos é muito próxima da dose eficaz, portanto, cuidado extremo ao ser utilizado em tratamento de animais com o óleo, pois não há cura para as sobredoses em caprinos ($0,2\text{mL.kg}^{-1}$), ovinos ($0,1\text{mL.kg}^{-1}$), gatos ($0,2\text{mL.kg}^{-1}$), cães ($0,2\text{mL.kg}^{-1}$) e coelhos ($0,5\text{mL.kg}^{-1}$). Quando se utilizava o óleo de *C. ambrosioides* era por meio de cápsulas de gel e acompanhados com óleo de rícino ou óleo de linhaça. As doses recomendadas para cães: $0,03\text{-}0,1\text{mL.kg}^{-1}$ seguido de 30mL de óleo de rícino, jejum por 24h antes do tratamento, cavalos: 16-18mL e 1 litro de óleo de linhaça 36h antes do tratamento; suínos: $0,5\text{-}1\text{mL.}11,5\text{kg}^{-1}$,

com 60mL de óleo de rícino; gatos: 0,03-0,05mL.kg⁻¹, mais 30mL de óleo de rícino; frangos: 0,3mL de óleo essencial em 3mL de óleo de rícino (CORNELL, 2009).

O tratamento oral de caprinos com 0,2 e 0,4mL.Kg⁻¹ de peso vivo do óleo essencial de *C. ambrosioides* contendo 87% de ascaridol não foi efetivo na redução de ovos e do número de nematoides adultos. No entanto, pode ser utilizado com alimento para controlar o número de larvas infectantes nas pastagens (KETZIS et al., 2002).

Monzote et al. (2007) demonstraram que o tratamento intraperitoneal de camundongos com óleo na dose de 30mg.Kg⁻¹ de peso vivo causou a morte de dois animais dentre os 12 tratados, após a vigésima quinta aplicação consecutiva, esta toxicidade foi reduzida quando os camundongos foram submetidos ao tratamento oral com o óleo.

O tratamento oral prolongado (quinze dias) de camundongos com o extrato hidroalcolico das folhas de *C. ambrosioides* nas doses de 5,50 e 500mg.Kg⁻¹ resultou em alterações comportamentais com ereção da cauda e piloereção, além de alterações hepatotóxicas (redução na concentração de albumina e triglicerídeos) e nefrotóxicas (aumento nos níveis de uréia e no peso dos rins) observadas nos grupos tratados com doses elevadas (10 e 100 vezes maior do que a dose terapêutica de 5mg.kg⁻¹). Com 5mg.kg⁻¹ tem efeito imunoestimulante, com aumento significativo do número de células hematopoéticas, quando comparado com o grupo controle (PEREIRA et al., 2010).

Aumento de aberrações cromossômicas, diminuição dos indices mitóticos e de replicação conduzindo à morte celular foram observadas em cultura de linfócitos humanos tratadas com o extrato aquoso de ESM, sugerindo o potencial carcinogênico desta planta. Efeitos genotóxicos e citotóxicos também foram relatados para outra espécie aromática desse mesmo gênero, o extrato aquoso de *Chenopodium multifidum* induziu aumento no percentual de cromossomos aberrantes e na morte celular em cultura de linfócitos humanos, embora, nenhum efeito sobre estas células tenha sido observado para o extrato aquoso da espécie não aromática, *Chenopodium album*, sugerindo que o óleo essencial da planta pode está envolvido com estes efeitos tóxicos (GADANO et al., 2006)

2.3.5 Aplicações do *Chenopodium ambrosioides* L.

A administração oral e intraperitoneal do óleo essencial de ESM em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*, impediu o desenvolvimento de lesões cutâneas e reduziu o número de parasitos nessas lesões, quando comparado com o grupo tratado com anfotericina B. Resultados de estudos *in vitro* também demonstraram que o óleo essencial dessa planta potencializa o efeito leishmanicida da pentamidina quando utilizados simultaneamente contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MONZOTE et al., 2007).

A atividade leishmanicida do extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* foi demonstrada *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, inibindo 63,6% do crescimento das formas promastigotas na concentração de 0,5mg.mL⁻¹ (BEZERRA et al., 2006).

O óleo essencial nas concentrações de 0,3% e 0,1% inibiu em 100% o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *A. glaucos*, *A. ochraceous*, *A. níger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*. A análise cromatográfica revelou a presença do ascaridol no óleo (80%), sugere que este constituinte corresponde ao principal componente antifúngico da planta (JARDIM et al., 2008).

Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial sobre fungos dermatófitos, causadores de micoses no homem e animais também foi demonstrada por Prasad et al. (2009) ao utilizarem as concentrações de 700 e 350 ppm do óleo em meio ágar para inibir *in vitro* o crescimento dos fungos *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum*, respectivamente. No teste *in vivo* o óleo também se mostrou eficaz no tratamento tópico em porquinhos-da-índia acometidos por micose após 21 dias de tratamento.

Ação repelente sobre ninfas do carrapato *Amblyomma cajennense* foi evidenciada com o extrato etanólico dessa planta, que repeliu 100% das ninfas na maior concentração de 2200mg.(cm²)⁻¹ durante o período de uma hora. Maior proteção poderia ser obtida em concentrações mais altas, mas com menor tempo de repelência (SOARES et al., 2010).

Para o extrato hexânico de *C. ambrosioides* foi observada atividade moluscicida na espécie *Bulinus truncatus*. O estudo fitoquímico revelou a presença de flavonóides, terpenóides e saponinas aos quais foram atribuídos esta atividade (HMAMOUCI, LAHLOU e AGOUMI, 2000).

2.4 CLASSIFICAÇÃO, BIOLOGIA E PATOLOGIA DO *Ancylostoma* spp

Os vermes adultos de *Ancylostoma* spp. vivem fixados à mucosa do intestino delgado (ID). Todas as três espécies de ancilostomídeos caninos são pertencentes ao gênero de *Ancylostoma* conhecidos por provocarem infecção endêmica, principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais da Ásia e da Austrália, sendo *Ancylostoma ceylanicum* e *Ancylostoma caninum* as espécies mais difundidas e predominante de ancilostomíase (TAWEETHAVONSAWAT et al., 2010).

Classe:	Secernentasida
Ordem:	Strongylorida
Superfamília:	Ancylostomatidae
Gênero:	<i>Ancylostoma</i>
Especies:	<i>A. caninum</i> e <i>A. braziliense</i>
Hospedeiros	
<i>A. caninum</i> :	cães, gatos e raposas
<i>A. braziliense</i> :	cães e gatos

Quadro 2. Classificação do *Ancylostoma* spp. em cães (Matos Jr. 2008).

No ciclo biológico, os ovos são postos na luz do ID e eliminados para o meio exterior com as fezes. As fêmeas ovipõem diariamente milhares de ovos não embrionados. *A. caninum* fêmeas põe em média 16.000 e *Ancylostoma braziliense* 4.000 ovos diariamente. No meio exterior, em condições adequadas, evolui para larva de primeiro estágio em 24 a 48 horas, no interior do ovo. Esta larva eclode (L₂) e evolui no meio externo para larva de terceiro estágio L₃ (infectante). Cães e gatos se infectam pelas vias, oral, mais frequente, percutânea, transplacentária e lactogênica (DATU et al., 2008).

Quando as larvas infectantes são ingeridas, penetram na parede intestinal, sofrem uma muda, retornam à luz intestinal e atingem a fase adulta. Quando a infecção é pela via percutânea, as larvas infectantes passam pelos capilares subcutâneos de forma ativa, alcançam os pulmões, onde sofrem muda para o quarto estágio e por expectoração e deglutição chegam ao ID, onde se tornam adultas. Em cães, a partir dos seis meses de idade sensibilizados por infecções anteriores, as larvas infectante que penetram na pele ou mucosa não chegam ao intestino e ficam em latência na musculatura. No periparto das cadelas, estas larvas, pela ação provável dos esteróides sexuais ou de substâncias protéicas do tipo albuminóide e peso molecular elevado, podem se reativar, mobilizando-se para atravessar a barreira placentária e a glândula mamária (MATOS Jr., 2008).

Normalmente, os parasitas não utilizam a mucosa intestinal como alimento. Porém, quando os animais desenvolvem alguma resistência, os hábitos do parasita se modificam e, no lugar de sangue, utilizam a mucosa (KALKOFEN, 1987).

As larvas, ao penetrarem ativamente pela pele, podem provocar irritação local. Alterações pulmonares podem ser observadas por meio do exame clínico e exames radiológicos, pela migração das larvas. Entretanto, a principal patogenia dos ancilostomídeos nos cães e gatos ocorre pela espoliação sanguínea. Úlceras na mucosa intestinal são associadas à fixação das formas adultas pela peça bucal. Um adulto de *A. caninum* pode sugar até 0,8mL de sangue ao dia e, em média, a perda de sangue decorrente de hemorragia da mucosa intestinal e ingestão de sangue pelo parasita é de 0,1 a 0,2mL (WOJNAROWICZ e SMITH, 2007).

O quadro é mais severo em cães jovens e caracteriza-se por diarreia sanguinolenta a partir de múltiplas lacerações no intestino e anemia. Os animais parasitados emagrecem, ficam anoréticos e podem ficar desidratados, deprimidos e menos ativos. Em alguns casos, os cães podem morrer. O controle se baseia em alguns fatores como localizar e eliminar as fontes de infecção com tratamento dos animais infectados, higiene ambiental, manejo dos animais a fim de evitarem áreas onde as larvas possam sobreviver e certificar-se que os cães e gatos sejam alimentados somente com ração, evitando assim a infecção pela esfoliação dos hospedeiros paratênicos que mantêm a larva de terceiro estágio, infectante, nos tecidos. No solo úmido e aquecido as larvas infectantes podem sobreviver até 15 semanas (MÍLLAN e BLASCO-COSTA, 2001).

Parasitas intestinais estão entre as doenças infecciosas mais comuns nos animais de companhia. Os parasitos que infectam cães têm o potencial para infectar os seres humanos. Portanto, controle destas infecções beneficia a saúde do cão e reduz o risco de infecções zoonóticas (WANG et al., 2010).

2.5 TRATAMENTOS UTILIZADOS EM ANCILOSTOMÍASE DE CÃES

Muitos produtos estão disponíveis para tratar e prevenir endoparasitoses em cães (WANG et al., 2010). Estas infecções por parasitas são normalmente tratados com medicamentos anti-helmínticos (ABUBUCHER et al., 2007), como o febantel pertence ao grupo dos pró-benzimidazóis e atua impedindo a absorção de glicose, causando inanição do parasita. Após absorção intestinal este composto é biotransformado no fígado em metabólitos ativos, principalmente em fembendazol. O longo período de meia vida e a lenta metabolização em substâncias inativas permite maior eficácia dos componentes deste grupo (VIRBAC, 2011).

O anti-helmíntico pamoato de pirantel é um agonista colinérgico e utilizado para controlar os nematóides importantes em pequenos animais, equínos, suínos e em humanos. É relativamente barato e tem um excelente perfil de segurança. Pertence ao grupo das pirimidinas, que atua causando paralisia espástica dos nematódeos. Este composto é bem absorvido no trato intestinal e sua concentração máxima ocorre entre 4 e 6 horas após administração. A importante característica do pirantel é sua baixa solubilidade em água, o que lhe permite alcançar os tricúrideos que se localizam na porção final do intestino grosso (KOPP et al., 2008).

O principio ativo praziquantel é conhecido por ser muito eficaz e atua sobre o potencial de membrana das células musculares, possivelmente alterando o fluxo de íons cálcio, que resulta na vacuolização e desintegração do tegumento do helminto. Após a administração oral, 80% do medicamento é absorvido pelo trato digestivo em 24 horas, distribuindo-se amplamente e atingindo as diversas localizações dos cestóides no hospedeiro (KIM et al., 2011).

Medicamentos a base de ivermectina demonstraram ser mais que uma "droga maravilha" na saúde humana, melhorando a nutrição, saúde geral e bem-estar de bilhões de pessoas em todo o mundo desde que foi usado pela primeira vez

para tratar da Oncocercose em humanos, em 1988. Possui alta afinidade por canais de cloro controlados por glutamato, específico dos nematóides, fato que parece estar relacionado com a paralisia e morte do parasita. Utilizada segundo as doses recomendadas, a ivermectina apresenta ampla margem de segurança para os mamíferos, pois em função de seu alto peso molecular, não atravessa a barreira hematoencefálica desses animais (CRUMP e ÔMURA, 2011).

Para Ribeiro (2003) o controle biológico é descrito quando se utiliza agentes antagonistas naturais na tentativa de reduzir uma população de pragas causadoras de perdas na produção de plantas e animais. Os fungos nematófagos apresentam melhores resultados para este controle alternativo de nematóides parasitas do trato gastrointestinal de animais em comparação com bactérias, vírus e protozoários.

Frassy et al. (2010) avaliaram *in vitro* a ação ovicida do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Toxocara canis* em diferentes intervalos de tempo e sugerem a empregabilidade deste fungo como uma alternativa de controle biológico dos ovos embrionados de *Toxocara canis*, pois causa a sua destruição.

Maciel, Araújo e Cecon (2006) avaliaram a capacidade predatória de três isolados das espécies de fungos predadores de nematóides *Arthrobotrys robusta* (131), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Manacrosporium thamasium* (NF34A) no controle *in vitro* de larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães e observaram que podem ser utilizados para controlar no ambiente as fases pré-parasitárias de *Ancylostoma* spp. de cães.

CAPÍTULO 1

Avaliação do potencial anti-helmíntico do extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no controle de *Ancylostoma* spp. de cães

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Ciência Rural

3 Cap. 1 - Avaliação do potencial anti-helmíntico do extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no controle de *Ancylostoma* spp. de cães¹

Evaluation of anthelmintic potential of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil and ethanol extract on control of canine *Ancylostoma* spp.

Jessica Nascimento Moraes Monteiro², Anderson Barros Archanjo², Adilson Vidal Costa², Gabriela Porfirio-Passos², Carlos Cesar Jordem Almança³, Isabella Vilhena Freire Martins², Lenir Cardoso Porfirio²

3.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar as larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma* spp. imersas em extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no teste *in vitro*. Utilizou-se água destilada (controle negativo) e albendazole e associação comercial de praziquantel, pamoato de pirantel e febantel (controles positivos). O extrato etanólico de *C. ambrosioides* L. nas concentrações 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 8,0%, 10,0%, 12,0% e 20% apresentaram insuficiente atividade para o efeito larvicida. O óleo essencial na concentração de 150µL.mL⁻¹ foi eficaz contra L₃. A formulação de biscoito manipulado com a concentração de 37,5µL.g⁻¹ do óleo essencial *C. ambrosioides* L reduziu o número de ovos por grama de fezes dos cães. O teste *in vivo*, com 26 cães adultos, hígidos, sem distinção de raça e sexo foram divididos em três grupos: F1 (biscoito sem princípio ativo), F2 (biscoito com princípio ativo de *C. ambrosioides* L.), F3 (biscoito com princípio ativo alopático). No hemograma, houve diferença significativa no F1 para os valores de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e albumina na bioquímica sérica. O F2 apresentou diferença no CHCM e na bioquímica a

¹ Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) do primeiro autor.

² Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre-ES, Brasil. Rua: Alto Universitário, s/n. Centro, Alegre-ES. CEP: 29500-00 Caixa Postal 16. E-mail para contato: lenir.porfirio@ufes.br; lenircp@yahoo.com.br.

³ Farmacêutico Bioquímico da Prefeitura Municipal de Muniz Freire/ES. Mestre em Ciências Veterinárias.

proteína sérica e globulina. O F3, os valores para linfócitos e monócitos no hemograma e a albumina e globulina foram diferentes entre o M1 e M2. No exame parasitológico o F1 manteve-se parasitado, enquanto o F2 reduziu de forma significativa a infecção e o F3 apresentou resultado negativo no M2. Conclui-se que a formulação de biscoito manipulado com óleo essencial *C. ambrosioides* L reduziu a infecção de *Ancylostoma* spp. em cães naturalmente parasitados.

Palavras-chave: erva-de-santa-maria, planta medicinal, óleo essencial. helmintos.

3.2 ABSTRACT

This study aimed to assess the infective larvae (L3) of *Ancylostoma* spp. immersed in ethanol extract and *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil with in vitro test. It was used distilled water (negative control) and albendazole and commercial association of praziquantel, pyrantel pamoate and febantel (positive controls). The ethanol extract of *C. ambrosioides* L. at a concentration of 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%, 6.0%, 8.0%, 10.0%, 12.0 % and 20% had insufficient activity for larvicidal effect. The essential oil at a concentration of 150 μ L.mL⁻¹ was effective against L3. The formulation of a biscuit manipulated with a concentration of 37.5 μ L.g⁻¹ of the *C. ambrosioides* L essential oil reduced the number of eggs per gram of dogs' feces. The *in vivo* test with 26 adult dogs, healthy, without distinction of race and sex were divided into three groups: F1 (biscuit without active ingredient), F2 (biscuit with *C. ambrosioides* L. active ingredient), F3 (biscuit with allopathic active ingredient). The CBC showed significant differences in F1 for values of red blood cells, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and albumin in serum biochemistry. The F2 showed difference in MCHC and in the biochemical serum protein and globulin. In the F3, values for lymphocytes and

monocytes in the blood cell count and the albumin and globulin were different between M1 and M2. At the parasitological exam F1 remained parasitized, while the F2 reduced significantly infection and F3 showed negative result in M2. It is concluded that the formulation of a biscuit manipulated with *C. ambrosioides* L essential oil reduced the infection of *Ancylostoma* spp. in naturally infected dogs.

Keywords: herb-of-santa-maria, medicinal plants, essential oil, helminths.

3.3 INTRODUÇÃO

A fitoterapia é utilizada no controle das enteroparasitoses de diversas espécies animais e SILVA (2012) reporta a eficácia de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre endoparasitos de pequenos ruminantes, assim como a infusão das folhas em humanos (MACDONALD et al., 2004); o extrato hexânico e diclorometano em teste *in vitro* com larvas de *Toxocara canis* (REIS et al., 2010); atividade antiinflamatória (BORBA e AMORIM, 2004); antifúngica, acaricida (AVANCINI et al., 2008) e analgésica (CASTELLANOS, 2008), mas não há relato na literatura da atividade desta planta no controle de *Ancylostoma* spp. em cães.

Para eliminar os inconvenientes sabores desagradáveis e pouco palatáveis dos princípios ativos dos anti-helmínticos, podem-se manipular biscoitos fitoterápicos preparados a base de substrato de ração, nos quais se incorpora princípios ativos de *C. ambrosioides*, o que facilita a administração oral para os cães, além da vantagem de apresentarem baixo custo (MONTEIRO et al., 2011).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial anti-helmíntico do extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no controle de *Ancylostoma* spp. de cães.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foi realizado um ensaio clínico pareado obedecendo aos princípios da Comissão de Ética no uso de animais em pesquisa com protocolo experimental aprovado sob o número 0200018/2010.

3.4.1 Obtenção da planta

Foram colhidas partes aéreas de exemplares de *Chenopodium ambrosioides* L., do Horto de Plantas Medicinais do município de Alegre, ES. A exsicata número CGMS-32.496, foi identificada pela Professora Doutora Vali Joana Pott como *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae) e está depositada no herbário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

O município de Alegre, Espírito Santo, possui área de 778,6km². Temperatura média anual de 22,2°C, variando entre 16,9°C e 29,0°C. Clima quente e úmido no verão e seco no inverno. Altitude da Sede: 250m. Altitude Mínima: 100m. Altitude Máxima: 1.326m. Latitude - 20°45'49". Longitude - 41°31'57". O município faz limite ao Norte com Ibitirama, Muniz Freire e Castelo. Ao Sul com Mimoso de Sul. Ao Leste com Jerônimo Monteiro e Cachoeiro de Itapemirim. E a Oeste com Guaçuí e São José do Calçado (PMA, 2012).

3.4.2 Obtenção do extrato etanólico de *C. ambrosioides* L.

Na preparação dos extratos etanólicos, as folhas depois de secas em câmara de secagem a 40°C com desumidificador, até peso constante, foram trituradas na forma de pó e pesados 200g colocada para macerar em 1,0L de etanol (Vetec a 99,8% P.A. ACS) em temperatura ambiente durante uma semana, protegido da luz. Após este período os preparados foram filtrados, remacerados por mais três vezes. Todo

o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo a 40°C, com pressão reduzida e colocada em estufa para evaporação de todo o álcool, formado o extrato etanólico, com rendimento de 6,45 gramas. Este extrato foi armazenado a 4°C até a sua utilização.

3.4.3 Obtenção do óleo essencial de *C. ambrosioides* L.

Partes aéreas da planta fresca foram coletadas na parte da manhã, entre 10 e 12 horas, pesadas e secas em câmara de secagem, trituradas e moídas em liquidificador com moedor (Walita HR2943/00) e 100g colocadas em balão de fundo redondo com capacidade de 3L, onde se adicionou 1,5L de água destilada. Colocou-se o balão com a planta na manta aquecedora, promovendo a hidrodestilação durante 4 horas, conforme recomenda a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). A quantidade de óleo essencial de *C. ambrosioides* obtido por hidrodestilação com aparelho de Clevenger foi de 0,4%, após retirar todo resíduo de água com sulfato de sódio anidro.

3.4.4 Obtenção das larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp.

Para a realização do teste *in vitro* foram obtidas amostras de fezes coletadas diretamente da ampola retal de cães infectados naturalmente e com presença de ovos de *Ancylostoma* spp. As fezes foram mantidas em sacos plásticos sob-refrigeração para realização dos exames parasitológicos pelo método de WILLIS (1921).

A obtenção das larvas de *Ancylostoma* spp. foi por meio do cultivo das fezes pelo método de coprocultura quantitativa, adaptado de UENO & GONÇALVES (1998) e descrito inicialmente por ROBERTS & O'SULLIVAN (1950).

3.4.5 Formação dos grupos e teste *in vitro* com extrato etanólico e óleo essencial de *C. ambrosioides* L.

Foram formados os grupos A (controle negativo) com a utilização de água destilada; B1 (controle positivo) com anti-helmíntico albendazole; B2 (controle positivo) com vermífugo de amplo espectro em associação praziquantel, pamoato de pirantel e febantel, ambos em apresentação comercial líquida; grupo C (tratamento EE) com extrato etanólico de *C. ambrosioides* nas concentrações: C1: 0,005g.mL⁻¹; C2: 0,01 g.mL⁻¹; C3: 0,02 g.mL⁻¹; C4: 0,03 g.mL⁻¹; C5: 0,04 g.mL⁻¹; C6: 0,05 g.mL⁻¹; C7: 0,06 g.mL⁻¹; C8: 0,08 g.mL⁻¹; C9: 0,1 g.mL⁻¹; C10: 0,12g.mL⁻¹; C11: 0,2g.mL⁻¹; grupo D (tratamento OE) com óleo essencial de *C. ambrosioides* nas concentrações: D1: 50µL.mL⁻¹; D2: 100µL.mL⁻¹ e D3: 150µL.mL⁻¹ e grupo E (solvente) E1: Propilenoglicol e E2: Polissorbato.

Os testes *in vitro* com o extrato etanólico e óleo essencial foram realizados em duplicata para cada grupo. Para isso utilizaram-se microtubos de polipropileno com capacidade de 1500µL (Eppendorf®), onde foram pipetadas 500µL da substância testada e adicionado mais 500µL da solução com as larvas. Após 48h de exposição aos tratamentos, conforme REIS et al. (2010), foi depositado 10µL da solução em lâmina de vidro para a observação a motilidade de 30 larvas por campo de 40x em microscopia de luz.

A atividade larvicida foi avaliada quanto aos escores (Quadro 1) observados nas larvas pela técnica desenvolvida originalmente por KIUCHI et al. (1987) e modificada por REIS et al. (2010). Para um movimento específico foi atribuída às larvas presentes, o escore correspondente. Os valores obtidos foram analisados pela porcentagem de escores pontuados (Quadro 1).

3.4.6 Formulação do biscoito com óleo essencial de *C. ambrosioides* L.

Os biscoitos foram preparados com ração seca peletizada, gelatina farmacêutica, biscoito água e sal, gordura vegetal, ração úmida como flavorizante e óleo essencial de *C. ambrosioides* na concentração que alcançou 100% de atividade larvicida no teste *in vitro* $150\mu\text{L.mL}^{-1}$. Após proceder a mistura dos componentes, foram moldadas e colocadas em estufa a 40°C por 4 horas. Cada biscoito ficou com aproximadamente quatro gramas e concentração de $37,5\mu\text{L.g}^{-1}$ de óleo essencial.

3.4.7 Seleção dos animais, formação dos grupos e teste *in vivo* com óleo essencial de *C. ambrosioides* L. em biscoito medicamentoso

Utilizaram-se 26 cães com idade acima de seis meses, entre 12 a 15kg de peso vivo, sem distinção de raça e sexo, não prenhez e alojados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), localizado no Município da Serra, Espírito Santo. Todos foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Durante o tratamento, os animais permaneceram alojados em canis com acesso ao sol. Após avaliação clínica e laboratorial somente os animais sem alteração sistêmica, mas com infecção natural por *Ancylostoma* spp. foram selecionados para o estudo.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo F (biscoito)

F1: (sem princípio ativo) com nove cães, F2 (princípio ativo óleo essencial) de *C. ambrosioides* L. com 10 cães, F3 (princípio ativo alopático) com sete cães. Cada animal do F1 e F2 recebeu tratamento no momento inicial (M1), um biscoito por dia durante três dias consecutivos, com repetição após 15 dias. Os animais do F3 receberam dose única da associação medicamentosa de amplo espectro em

formulação de biscoito, na dose recomendada pelo fabricante e repetida após 15 dias.

3.4.8 Hematologia, bioquímica sérica e parasitológico de fezes dos animais

Foram coletadas amostras de sangue periférico da veia cefálica para realização do hemograma (M1 e M2), armazenado em tubos com ácido etileno diamino tetracético a 10% (EDTA) e processados imediatamente em analisador automático Mindray BC-2800Vet. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por citoscopia, em esfregaço sanguíneo corado pelo *kit* rápido Panótico, marca NewProv[®].

Para as análises bioquímica, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm para obtenção do soro e realização da dosagem da atividade sérica das enzimas alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), e para os analitos ureia, creatinina, proteínas totais e albumina. As amostras foram processadas no analisador bioquímico semi-automático modelo Bioplus Bio-200[®].

Para avaliação parasitológica foram coletadas amostras de fezes de todos os animais e acondicionadas em frascos, identificadas e refrigeradas a 4°C, para posterior análise, não excedendo 24h após a coleta. A técnica empregada no exame parasitológico foi pelo método quantitativo do tipo flutuação, e observação por meio de microscopia de luz, para contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (SLOSS et al., 1999).

Os valores obtidos foram analisados pelo teste T paramétrico pareado a 5% de significância, com o programa BioEstat 5.0.

3.5 RESULTADOS

No teste *in vitro* o grupo A (controle negativo) realizado com água destilada, e grupo E (solventes) não foi observada atividade larvicida, tendo todas as amostras apresentado escore 5 (Quadro 1). Os grupos B1 e B2 (controles positivos) com antiparasitários comerciais, apresentaram escore 2 e 3, respectivamente. Nos grupos C1 a C11 (tratamento EE) as larvas obtiveram escore 5. No grupo D (tratamento OE) as larvas apresentaram para D1 e D2 escore 4 e 3, respectivamente, e para D3 com escore zero (Tabela 1).

Nos testes *in vivo*, foram observadas alterações hematológicas significativas ($p < 5\%$) no hemograma para o grupo de animais que não receberam medicação (F1) houve redução significativa nas hemácias, hematócrito e CHCM. O grupo formado pelos animais que receberam formulação de biscoito medicamentoso com óleo essencial de *C. ambrosioides* (F2) foi observado redução do CHCM e no grupo de animais que receberam a medicação comercial de amplo espectro (F3) a redução foi observada nos linfócitos e aumento dos monócitos. Na bioquímica sérica de F1 houve redução de albumina. No grupo F2 as proteínas totais e globulinas aumentaram estatisticamente. No grupo F3 a albumina reduziu e as globulinas aumentaram (Tabela 2).

Para o exame parasitológico de fezes houve redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de ovos por grama de fezes dos parasitos *Ancylostoma* spp. Para o F1 a redução foi de 7,42% no número de ovos por grama de fezes, para o F2 de 82,14% e no F3 foi 100%. (Tabela 3).

3.6 DISCUSSÃO

Os grupos A, controle negativo com água destilada, E1 com propilenoglicol e E2 com polissorbato não alteraram a motilidade larval e todas as larvas examinadas permaneceram com escore 5, o que já era esperado. Para os controles positivos, com antiparasitários comerciais, observou-se escore 2 e 3, o que demonstra pouca atividade larvicida já que os medicamentos comerciais utilizados neste experimento são os preferenciais para a clínica médica de animais de companhia para tratar verminoses. A resistência anti-helmíntica ao albendazole, levamisol e ivermectina, tem sido relatada no Brasil, em pequenos ruminantes (LIMA et al., 2010), porém ainda não foi relatada em helmintos de animais de companhia.

Os grupos tratamento C1 a C11, com extrato etanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. nas concentrações C1: 0,005g.mL⁻¹; C2: 0,01g.mL⁻¹; C3: 0,02g.mL⁻¹; C4: 0,03g.mL⁻¹; C5: 0,04g.mL⁻¹; C6: 0,05g.mL⁻¹; C7: 0,06g.mL⁻¹; C8: 0,08g.mL⁻¹; C9: 0,1g.mL⁻¹; C10: 0,12g.mL⁻¹; C11: 0,2g.mL⁻¹ não demonstraram efeito larvicida em testes *in vitro*, com as larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma* spp. e como todas as larvas dos grupos diluídos com propilenoglicol permaneceram vivas, com escore 5, isto demonstra que o solvente usado para solubilizar o extrato etanólico não interferiu na atividade das larvas.

REIS et al. (2010) coletaram vermes adultos de *Toxocara canis* de filhotes caninos, e após remoção dos ovos do útero dos vermes, mantiveram em 1% de formalina a 27^oC até o desenvolvimento do estágio infectante. Para o teste *in vitro* utilizaram o extrato hexânico de *C. ambrosioides* L., nas doses de 0,01; 0,05 e 0,1mg.mL⁻¹ diluído em DMSO em larvas de segundo estágio e relatam efeito larvicida na dose mais baixa de 0,01mg.mL⁻¹, diferente deste trabalho, no qual foi obtido extrato hidroalcólico e como solvente propilenoglicol.

No presente trabalho, os testes *in vitro* com larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp., o óleo essencial de *C. ambrosioides* L., nas concentrações de $50\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D₁), 88,33% das larvas apresentaram escore 4 e 11,66% das larvas estavam mortas. Para a concentração de $100\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D₂) o escore foi classificado como 3 para 95% das larvas examinadas e 5% estavam mortas. Para o óleo essencial na concentração de $150\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D₃) a atividade larvicida foi de 100%, isto é, todas as larvas estavam mortas. A atividade larvicida do teste *in vitro*, pode ter ocorrido pelo contato direto do óleo essencial com as larvas infectantes em concentrações potencialmente ativas. Este óleo apresenta um componente conhecido como ascaridol, um monoterpene encontrado em grande quantidade no óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides*. As plantas desse estudo foram coletadas no município de Alegre-ES e apresentaram 87% de (Z)-ascaridol em sua composição (VIEIRA et al., 2011). Para Castellanos (2008) este componente se comporta como potente agente antiparasitário

No teste *in vivo* o grupo de animais que não receberam medicação (F1) apresentaram redução significativa nos parâmetros do eritrograma como as hemácias ($p=0,01$), hematócrito ($p=0,01$) e CHCM ($p=0,001$) e associado com a redução da albumina ($p=0,01$) o que pode ter ocorrido pela própria infecção parasitária que permaneceu durante o período experimental, visto que, um adulto de *A. caninum* pode sugar até 0,8mL de sangue ao dia e, em média, a perda de sangue decorrente de hemorragia da mucosa intestinal e ingestão de sangue pelo parasita é de 0,1 a 0,2mL (WOJNAROWICZ e SMITH, 2007). Estes resultados ressaltam a importância do tratamento dos animais, pois esta parasitose, o animal pode desenvolver anemia e perda de albumina em pouco tempo.

Nos cães do grupo tratado com biscoitos medicamentosos (F2) contendo óleo essencial de *C. ambrosioides* na dose de $37,5\mu\text{L.g}^{-1}$ foram observadas alterações significativas com a diminuição do CHCM ($p=0,04$) e aumento das proteínas séricas ($p=0,005$) e globulinas ($p=0,001$). PEREIRA et al. (2010) trataram camundongos por via oral, durante 15 dias, com extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* na dose de 5mg.kg^{-1} e observaram efeito imunoestimulante, com aumento significativo do número de células hematopoéticas, quando comparado com o grupo controle, estes resultados concordam com o presente estudo, se considerar o aumento no valor obtido para globulinas.

Os animais do grupo F3 apresentaram alterações no hemograma com redução de linfócitos ($p=0,03$) e aumento de monócitos ($p=0,03$) o que pode significar estresse sistêmico. E para a bioquímica sérica, neste grupo foi observado redução na albumina ($p=0,007$) e aumento de globulina ($p=0,006$).

Em relação ao exame parasitológico, ao analisar as médias do número de ovos por grama de fezes, de *Ancylostoma* spp. dos animais tratados com biscoito medicamentoso acrescido de óleo essencial de *C. ambrosioides* a $150\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Tabela 3), observa-se que apresentaram redução de 82,15%. Apesar destes animais não apresentarem resultados negativos para o exame parasitológico pode-se considerar que a redução no OPG foi satisfatória, visto que quando se utiliza produtos derivados de plantas medicinais, procura-se para promover o controle da infecção parasitária, mantendo contato com o antígeno, em menor escala e espera-se estimular o sistema imunológico.

GITHIORI et al. (2006) reportam que teste *in vivo* e *in vitro* nas mesmas concentrações, nem sempre corresponde a mesma biodisponibilidade, e para BRAUNE et al. (2001) pode ocorrer decomposição dos compostos químicos de

plantas por bactérias presentes no intestino de monogástricos, antes que haja absorção para ser metabolizado, no entanto estas alterações não interferiram no efeito parasiticida do óleo essencial de *C. ambrosioides* no presente trabalho.

O uso de plantas medicinais pode se tornar complementar no tratamento ou controle de endoparasitos em animais de companhia, de acordo com RATTAN (2010) o fitocomplexo que compõe *C. ambrosioides* L. apresenta mecanismo de ação entre as suas moléculas que interagem de forma flexível e dinâmica, desta forma pode-se reduzir o uso de produtos químicos largamente comercializados no Brasil, pois se observa que os produtos atuais estão agregando maior quantidade de substâncias químicas sem relato das interações medicamentosas que possam apresentar estes compostos.

3.7 CONCLUSÃO

O extrato etanólico das partes aéreas da erva-de-santa-maria (*C. ambrosioides* L), em diferentes concentrações, diluídas em propilenoglicol não apresentou efeito anti-helmíntico para larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp.

A formulação de biscoito manipulado com a concentração de $37,5\mu\text{L.g}^{-1}$ do óleo essencial *C. ambrosioides* L. apresentou resultado satisfatório na redução do número de ovos por gramas de fezes, em cães naturalmente infectados com *Ancylostoma* spp.

3.8 REFERÊNCIAS

AVANCINI, C. et al. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. **Latin american journal of pharmacy**, v.27, n.6, p.894-899, 2008.

BORBA, H.R.; AMORIM, A.D. Ação anti-helmíntica de plantas xiv. avaliação da atividade de extratos aquosos de *C. ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspicularis tetraptera*. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v.13, n.4, p.133-136, 2004. Disponível em: http://www.cbpv.com.br/rbpv/documentos/1342004/c134133_136.pdf, Acesso em: 28 mar. 2012.

BRASIL. **Farmacopéia brasileira**, v.1, 5ª Ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

BRAUNE, A. et al. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. **Applied and environmental microbiology**. v.67, n.12, p.5558-5567, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93344/pdf/am1201005558.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2012. doi: 10.1128

CASTELLANOS, J.R.G. Epazote (*C. ambrosioides*). A revision to its morphological characteristics, pharmacological activity, and the biogenesis of its principal active ingredient, ascaridole. **Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas**, v.7, n.1, p.3-9, 2008. Disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/856/85670103.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2012.

GITHIORI, J.B. et al. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary parasitology**,

v.139, n.4, p.308-320, 2006. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725262>, Acesso em: 15 abril 2012.

KIUCHI, F. et al. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. **Chemical & pharmaceutical bulletin** v.35, p.2880–2886, 1987.

LIMA, W.C. et al. Nematoides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa veterinária brasileira**, v.30, n.12, p.1003-1009, 2010. Disponível em: Acesso em: 15 mar. 2012.

MACDONALD, D. et al. Ascaridole-less infusions of *C. ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of ethnopharmacology**, v.92, n.2-3, p.215-221, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://000221717000008 >. Acesso em: 15 mar. 2012. doi:10.1016/j.jep.2004.02.018.

MONTEIRO et al. Biscoito fitoterápico de erva-de-santa-maria (*C. ambrosioides* L.). In:XXII Congresso brasileiro de parasitologia, **Anais...** São Paulo, SP, 2011.

PEREIRA, W.S. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *C. ambrosioides* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v.127, n.3, p.602-605, 2010.

Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109007739>. Acesso em: 15 mar. 2012. doi: 10.1016/j.jep.2009.12.018.

PMA. Prefeitura de Municipal de Alegre-ES, 2012, Acesso em 14 dez. 2012. Online.

Disponível em: http://www.alegre.es.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=96.

RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop protection**, v.29, n.9, p.913-920, 2010.

REIS, M. et al. *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae *in vitro* and *in vivo*. **Experimental parasitology**, v.126, n.2, p.191-197, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20447397>. Acesso em: 21 agos. 2012. doi: 10.1016/j.exppara.2010.04.023.

ROBERTS, F.H.S. e O'SULLIVAN, J.P. Methods of egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian agricultural research**, v.1, p.99-102, 1950.

SILVA, G.D. Avaliação da atividade anti-helmíntica e toxicológica do extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) sobre nematoides gastrintestinais de caprinos. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)- Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2012.

SLOSS, M.W.; et al. **Parasitologia clinica veterinaria**. São Paulo:Manole, 1999. 198p.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de bovinos**. 4.ed. Toquio: JIICA, 1998. 143p.

VIEIRA, D.F. et al. **Composição química do óleo essencial de *C. ambrosioides* L.** In: XI EPG, Anais Encontro latino americano de pós graduação, 2011.

WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical journal australia**, v.2, p.375-37, 1921.

WOJNAROWICZ, C.; SMITH, K. *Ancylostoma caninum* infection in a Texas-born Blue Lacy dog — Alberta, **Canadian veterinary journal** v.48, n.11, p.1185–1186, 2007.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recomenda-se o uso do biscoito manipulado com a concentração de $37,5\mu\text{L.g}^{-1}$ do óleo essencial *C. ambrosioides* L., pois apresentou resultado satisfatório na redução do número de ovos por gramas de fezes, em cães naturalmente infectados com *Ancylostoma* spp. Deve-se levar em consideração a ausência de efeitos colaterais e a facilidade na sua administração.

Adicionalmente sugere-se mais pesquisas relacionadas ao uso de plantas medicinais para tratamento das verminoses.

Estágio da larva	Escore
Movimento rápido utilizando todo o corpo	5
Movimento intermediário utilizando todo o corpo	4
Movimento lento utilizando todo o corpo	3
Movendo somente a parte do corpo durante a observação	2
Imóvel, mas não morto	1
Morto	0

Quadro 1. Critério para avaliação do efeito do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. em larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp.

Fonte: REIS et al. (2010)

Tabela 1. Atividade anti-helmíntica de *Chenopodium ambrosioides* em larvas infectantes de *Ancylostoma* spp.

Grupos	Teste	Escore	% de larvas	
			vivas	imóveis
A (controle negativo)	Água destilada	5	100,00	0,00
B1(controle positivo)	Albendazol	2	35,00	65,00
B2 (controle positivo)	Ampla espectro*	3	38,33	61,67
C1 a C11 (tratamento EE)	Extrato etanólico	5	100,00	0,00
D1(tratamento OE)	50µL.mL ⁻¹ Óleo essencial	4	88,33	11,66
D2(tratamento OE)	100µL.mL ⁻¹ Óleo essencial	3	95,00	5,00
D3(tratamento OE)	150µL.mL ⁻¹ Óleo essencial	0	0,00	100,00
E (solventes)	Propileno e polissorbato	5	100,00	0,00

* praziquantel, pamoato de pirantel e febantel

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de 26 cães, média e desvio padrão (DP) não tratados (F1) tratados com óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (F2) e com praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina (F3).

Parâmetros**	F1*			F2			F3			Referência*****
	M1***	M2	P****	M1	M2	p	M1	M2	p	
Hem	6,9±0,94a	6,32±0,73b	0,01	6,40±0,47a	5,91±1,15a	0,11	6,26±0,65a	5,80±1,32a	0,23	5,5-8,5 x10 ⁶ /μL
Hb	13,62±1,88a	13,06±1,74a	0,12	12,96±1,04a	11,96±2,50a	0,11	13,14±1,19a	11,68±2,43a	0,14	12,0 – 14,0 g/dL
Ht	42,50±5,26a	39,36±4,34b	0,01	39,38±2,82a	37,34±7,54a	0,19	38,95±3,26a	35,84±7,65a	0,19	37 a 55 %
VCM	61,94±4,52a	62,61±3,12a	0,13	61,61±2,50a	63,20±1,76a	0,06	62,22±3,05a	62,10±2,55a	0,46	67 a 77 fL
CHCM	31,85±0,84a	33,09±1,11b	0,001	32,85±1,11a	31,96±0,63b	0,04	33,41±1,61a	32,60±0,40a	0,13	30 a 34 %
Leuc	10,02±3183a	10,11±1753a	0,47	11,02±4631a	10,35±4058a	0,36	10,90±3317a	11,20±4435a	0,42	6,0-17,0 x10 ³ /μL
Neutr	5,54±2721a	5,51±1514a	0,48	6,19±2618a	5,50±2595a	0,28	6,32±2037a	9,05±4097a	0,06	3,0-11,5 x10 ³ /μL
Linf	3,60±1250a	3,39±2109a	0,40	3,57±2397a	3,54±3292a	0,48	3,40±2485a	1,32±594b	0,03	1,0-4,8 x10 ³ /μL
Mon	0,38±248a	0,23±97a	0,07	0,62±386a	0,49±299a	0,18	0,23±144a	0,49±370b	0,03	0,15-1,35 x10 ³ /μL
Eos	0,48±309a	0,56±695a	0,38	0,61±652a	0,79±822a	0,16	0,94±1319a	0,16±204a	0,07	0,1-0,75 x10 ³ /μL
Ur	35,7±14,5a	34,4±11,9a	0,71	36,1±13,7a	37,6±16,0a	0,85	72,9±29,1a	48,9±17,1b	0,009	21-56g.dL ⁻¹
Cr	0,9±0,2a	0,8±0,3a	0,61	0,9±0,1a	0,9±0,2a	0,44	1,0±0,3a	1,1±0,2a	0,38	0,5-1,5g.dL ⁻¹
ALT	26,1±9,4a	30,6±10,5a	0,38	30,4±6,6a	26,4±11,3a	0,39	47,1±40,0a	81,0±56,8a	0,07	21-102g.dL ⁻¹
AST	30,6±10,5a	25,0±5,1a	0,09	30,2±11,5a	32,0±10,9a	0,11	33,8±12,3a	63,0±57,4a	0,20	23-63g.dL ⁻¹
FA	54,5±21,4a	53,8±21,7a	0,94	95,7±25,6a	90,0±29,6a	0,14	126,2±99,0a	109,5±82,7a	0,09	20-156
PT	7,3±0,6a	8,0±1,6a	0,29	6,7±0,7a	7,8±1,1b	0,005	6,7±0,5a	7,3±1,2a	0,13	5,4-7,1
Alb	2,5±0,4a	2,2±0,3b	0,01	2,2±0,6a	2,0±0,6a	0,23	2,5±0,5a	1,9±0,1b	0,007	2,6-3,3
Glob	4,7±0,6a	5,8±1,9a	0,12	4,4±0,9a	5,8±0,5b	0,001	4,0±1,0a	5,4±1,4b	0,006	2,7-4,4

* F1: Cães não tratados. F2: Cães tratados com $37,5\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de óleo essencial de *C. ambrosioides*. F3: Cães tratados com praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina.

** Hem: Hemácias; Hb: Hemoglobina; Ht: Hematócrito; VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio; Leuc: Leucócitos Totais; Neutr: Neutrófilo; Linf: Linfócitos; Mon: Monócitos; Eos: Eosinófilos; Ur: Uréia; Cr: Creatinina; ALT: Alanina Amino Transferase; AST: Aspartato Amino Transferase; FA: Fosfatase Alcalina; PS: Proteína Sérica; Alb: Albumina; Glob: Globulina.

*** M1: Momento inicial, imediatamente antes da medicação. M2: Momento final.

**** p: probabilidade

.***** Weiss e Wardrop (2010). Kaneko et al. (2008).

Tabela 3. Quantidade de ovos por grama de fezes (OPG), média e desvio padrão (DP) dos cães não tratados (F1) tratados com óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (F2) e tratados com praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina (F3).

Animais	F1		F2		F3	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2
1	800	600	600	200	600	0
2	400	600	400	0	800	0
3	400	400	600	0	1000	0
4	400	200	400	200	800	0
5	800	600	600	0	1200	0
6	400	400	800	200	1000	0
7	1000	1000	800	200	800	0
8	600	400	400	0	-	-
9	600	800	600	200	-	-
10	-	-	400	0	-	-
Média,	600	555,5	560,0	100,0	885,7	0,0
DP	±223,6a	±240,3a	±157,7a	±105,4b	±195,1a	±0,0b
p	p=0,44		p<0,0001		p<0,0001	
% de redução	7,42%		82,15%		100%	

F1: Cães não tratados. F2: Cães tratados com $37,5\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de óleo essencial de *C. ambrosioides*. F3: Cães tratados com praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina. p: probabilidade. DP: desvio padrão. M1: Momento inicial, imediatamente antes da medicação. M2: Momento final, 21 dias após a medicação. Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste T pareado.

5 REFERÊNCIAS

ABUBUCKER, S.; MARTIN, J.; YIN, Y.; FULTON, L.; YANG, S.; HALLSWORTH-PEPIN, K.; JOHNSTON, J.S.; HAWDON, J.; MCCARTER, J.P.; WILSON, R.K.; MITREVA, M. The canine hookworm genome: analysis and classification of *Ancylostoma caninum* survey sequences. **National institutes of health**. v.157, n.2, p.187-192, 2007.

AMOROZO, M. C. D. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta botanica brasilica**, v.16, p.189-203, 2002.

ANVISA. **Esclarecimentos sobre matérias sobre plantas medicinais veiculadas na revista época e no fantástico**. 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/me/medicamentos/...>>. Acesso em: 23 jun. 2012.

AVANCINI, C.; WIEST, J.M.; DALL'AGNOL, R.; HAAS, J.S.; POSER, G.L. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. **Latin american journal of pharmacy**, v.27, n.6, p.894-899, 2008.

BLANCKAERT, I.; PAREDES-FLORES, M.; ESPINOSA-GARCÍA, F.J.; PINERO, D.; LIRA, R. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*C. ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. **Genetic resources and crop evolution**, v.59, n.4, p.557-573, 2012.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.16, p.631-637, 2006.

BORBA, H. R.; AMORIM, A. D. Ação anti-helmíntica de plantas xiv. avaliação da atividade de extratos aquosos de *C. ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) em

camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v.13, n.4, p.133-136, 2004.

BRASIL. **Farmacopéia brasileira**, v.1, 5ª Ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

BRAUNE, A. et al. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. **Applied and environmental microbiology**. v.67, n.12, p.5558-5567, 2001.

CAPASSO, F. et al. Traditional phytotherapy in the agri valley, lucania, southern italy. **Journal of ethnopharmacology**, v.6, n.2, p.243-250, 1982.

CASTELLANOS, J.R.G. Epazote (*C. ambrosioides*). A revision to its morphological characteristics, pharmacological activity, and the biogenesis of its principal active ingredient, ascaridole. **Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas**, v.7, n.1, p.3-9, 2008.

CASTRO, H.G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2°. Viçosa-MG: 2004.

CORNELL UNIVERSITY. Department of animal science. **C. ambrosioides**. Toxicidade. 2009. Acesso em 23 mar. 2012. Online. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/epazote.html>

CRUMP, A.; ÔMURA, S. Ivermectin, 'Wonder drug' from Japan: the human use perspective. **Proceedings of the japan academy**. v.87, n.2, p.13-27, 2011.

DATU, B.J.D. Transcriptional Changes in the Hookworm, *Ancylostoma caninum*, during the Transition from a Free-Living to a Parasitic Larva. **Plos neglected tropical diases**. v.2 n.1 p.1-15, 2008.

OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACEDO, I.F. Plantas taniníferas e o controle de

nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**. v.41 n.11, 2011.

DOS SANTOS, E.A.; DE CARVALHO, C.M.; COSTA, A.L.S.; CONCEIÇÃO, A.S.; MOURA, F.B.P.; SANTANA, A.E.G. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2012.

DOS SANTOS JÚNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.F.; DE CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of natural medicines**, v.64, n.2, p.231-238, 2010.

FRASSY, L.N.; BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; FERREIRA, S.R.; FREITAS, L.G. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydospori*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.1, n.43, p.102-104, 2010.

GADANO, A. B.; GURNI, A. A.; CARBALLO, M. A. Argentine folk medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **Journal of ethnopharmacology**, v.103, n.2, p.246-251, 2006.

GERTSCH, J.; VIVEROS-PAREDES, J.M.; TAYLOR, P. Plant immunostimulants-Scientific paradigm or myth? **Journal of ethnopharmacology**, v.136, n.3, p.385-391, 2011.

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing. **Bioresource technology**, v.99, n.7, p.2507-2515, 2008.

GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary parasitology**, v.139, n.4, p.308-320, 2006.

GUPTA, D.; CHARLES, R.; MEHTA, V.K.; GARGA, V.K.; KUMARA, S. Chemical examination of the essential oil of *C. ambrosioides* L. from the southern hills of India. **The journal of essential oil research**, v.14, n.12, p.93-94, 2002.

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

JARDIM, C.M.; JHAM, G.N.; DHINGRA, O.D.; FREIRE, M.M. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Hexane Extract of the Brazilian *C. ambrosioides* L. **Journal of the brazilian chemical society**, v.21, n.10, p.1814-1818, 2010.

JARDIM, C.M.; JHAM, G.N.; DHINGRA, O.D.; FREIRE, M.M. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal Chemical Ecologic**. v.34, p.1213-1218, 2008.

JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O.; KOSCHTSCHAK, M.R.W. Diagnose comparativa das espécies *C. ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) e *Coronopus didymus* (L.) Sm (mastruço): principais características morfo-histológicas e químicas. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.1, n.2, p.143-153, 1986.

KALKOFEN, U.P. Hookworms of dogs and cats. **Veterinary clinics of north america: small animal practice**. v.17, n.6, p.1341-1354, 1987.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSSET, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5^a ed., London: Academic Press, 2008. 932p.

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

KLEIN, T.; LONGHINI, R. BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.3, p.241-248, 2009.

KIM, C.H.; LEE, J.; CHUNG, B.; LI, S.; CHOI, M.; HONG, S. Influencing Factors for Cure of Clonorchiasis by Praziquantel Therapy: Infection Burden and CYP3A5 Gene Polymorphism. **The korean journal of parasitology**. v.49, n.1, p.45-49, 2011.

KIUCHI, F.; MIYASHITA, N.; TSUDA, Y.; KONDO, K.; YOSHIMURA, H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. **Chemical & pharmaceutical bulletin** v.35, p.2880–2886, 1987.

KOPP, S.R.; COLEMAN, G.T.; MCCARTHY, J.S.; KOTZE, A.C. Phenotypic Characterization of Two *Ancylostoma caninum* Isolates with Different Susceptibilities to the Anthelmintic Pyrantel. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.52, n.11, p. 3980–3986, 2008.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v.120, p.121-131, 2000.

LIMA, W.C.; ATHAYDE, A.C.R; MEDEIROS, G.R.; LIMA, D.A.S.D; BORBUREMA, J.B.; SANTOS, E.M.; VILELA, V.L.R.; AZEVEDO, S.S. Nematoides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa veterinária brasileira**, v.30, n.12, p.1003-1009, 2010.

MACDONALD, D.; VANCREY, K.; HARRISON, P.; RANGACHARI, P.K.; ROSENFELD, J.; WARREN, C.; SORGER, G. Ascaridole-less infusions of *C. ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of ethnopharmacology**, v.92, n.2-3, p.215-221, 2004.

MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; DE OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; OLIVEIRA, F.R.; QUEIROZ-JUNIOR, E.M.; TOMÉ, A.R.; NASCIMENTO, N.R.F. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana*

essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary parasitology**, v.173, n.1-2, p.93-98, 2010.

MACIEL, A.S.; ARAUJO, J.V.; CECON, P.R. Atividade predatória *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma spp.* de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia veterinária**. v.15, n.2, p71-75, 2006.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**. Fortaleza: Impr. Universitária 2000.

MATOS Jr, D.G. **Manual de helmintoses comuns em cães**. 2ed: LFlivros, 2008.

MAURY, E. A. **Guia das plantas medicinais**. 1. São Paulo-SP: 2002.

MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítios da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v.18, p.391-399, 2004.

MÍLLAN, J.; BLASCO-COSTA, I. Molecular evidence of shared hookworm *Ancylostoma tubaeforme* haplotypes between the critically endangered Iberian lynx and sympatric domestic cats. **Veterinary parasitology**. v.186, p.518-522, 2012.

MONTEIRO et al. Biscoito Fitoterápico de Erva-De-Santa-Maria (*C. ambrosioides* L.). In:XXII Congresso Brasileiro de parasitologia, **Anais...** São Paulo, SP, 2011.

MONZOTE, L.; MONTALVO, A.M.; SCULL, R.; MIRANDA, M.; ABREU, J.. Combined effect of the essential oil from *C. ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Revista do instituto de medicina tropical**. S. Paulo, v.49, n.4, p.257-260, 2007.

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K.; GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *C. ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and applied pharmacology**, v.240, n.3, p.337-347, 2009.

MORENO, F.C.; GORDON, I.J.; WRIGHT, A.D.; BENVENUTTI, M.A.; SAUMELL, C.A. Efecto antihelmíntico in vitro de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. **Archivos de medicina veterinaria**, v.42, p.155-163, 2010.

MUHAYIMANA, A.; CHALCHATA, J.; GARRY, R. Chemical composition of essential oils of *C. ambrosioides* L. from Rhuanda. **The journal of essential oil research**, v.10, p.690-692, 1998.

ONOCHA, P.A.; OLOYEDE, G.K.; AFOLABI, Q.O. Cytotoxicity and Free Radical Scavenging Activities of Hexane Fractions of Nigeria Specie of African Pear (*Dacryodes edulis*). **International journal of biological chemistry**, v.5, p.143-149.

PEREIRA, W.S.; RIBEIRO, B.P.; SOUSA, A.I.P.; SERRA, I.C.P.B.; MATTAR, N.S.; FORTES, T.S.; Aramys S. REIS, A.S.; Lucilene A. SILVA, L.A.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *C. ambrosioides* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v.127, n.3, p.602-605, 2010.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; REAL, I. M. Essential Oil of *C. ambrosioides* L. **The journal of essential oil research**, v.15, p.213-214, 2003.

PINTO, E.P.P.; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v.20, p.751-762, 2006.

PMA. Prefeitura de Municipal de Alegre-ES, 2012, Acesso em 14 dez. 2012. Online. Disponível em: http://www.alegre.es.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=96.

PRASAD, C.S.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; DUBEY, N.K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *C. ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. **Blackwell verlag gmbh, mycoses**, v.53, n.2, p.123-129, 2009.

RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop protection**, v.29, n.9, p.913-920, 2010.

REIS, M.; TRINCA, A.; FERREIRA, M.J.U.; MONSALVE-PUELLO, A.R.; GRÁCIO, M.A.A. *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae *in vitro* and *in vivo*. **Experimental parasitology**, v.126, n.2, p.191-197, 2010.

RIBEIRO, R.R. Atividade predatória sobre larvas de trichostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Manacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. 2003. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, J.P. Methods of egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian agricultural research**, v.1, p. 99-102, 1950.

SAVO, V.; GIULIA, C.; MARIA, G.P.; DAVID, R. Folk phytotherapy of the Amalfi Coast (Campania, Southern Italy). **Journal of ethnopharmacology**, v.135, n.2, p.376-392, 2011.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003, cap. 1, p. 13-28.

SILVA, G.D. Avaliação da atividade anti-helmíntica e toxicológica do extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) sobre nematoides gastrintestinais de caprinos. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)-Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2012.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K.; MITTAL, S.; YADAV, S. Chemical composition of essential oil from leaves of *C. ambrosioides* from Chandigarh, India. **Chemistry of natural compounds**, v.44, n.3, p.378-379, 2008.

SLOSS, M.W; ZAJAC, A.M.; KEMP, R.L. **Parasitologia clinica veterinaria**. São Paulo:Manole, 1999. 198p.

SOARES, S.F.; BORGES, L.M.F.; BRAGA, R.S.; FERREIRA, L.L.; LOULY, C.C.B.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; FERRI, P.H. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. **Veterinary parasitology**, v.167, p.67-73, 2010.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 3ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 247.

STEVENS, P.F. (2001 onwards). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 12, 2012.

TAWEETHAVONSAWAT, P.; CHUNGPIVAT, S.; SATRANARAKUN, P.; TRAUB, R.J.; SCHAPER, R. Efficacy of a combination product containing pyrantel, febantel and praziquantel (Drontal Plus Flavour, Bayer Animal Health) against experimental infection with the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* in dogs. **Parasitology research**, v.106, n.2, p.533-537, 2010.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de bovinos**. 4.ed. Toquio: JIICA, 1998. 143p.

VERCRUYSSSE, J.; SCHETTERS, T.P.M.; KNOX, D.P.; WILLADSEN, P.; CLAEREBOUT, E. Control of parasitic disease using vaccines: an answer to drug resistance? **Revue scientifique et technique-office international des epizooties**, v.26, n.1, p.105-115, 2007.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v.29, n.2, p.326 a 337, 2006.

VIEIRA, D.F.; AZEVEDO, M.M.; MARINS, A.K.; PINHEIRO, P.F.; QUEIROZ, V.T.; COSTA, A.V. **Composição química do óleo essencial de *C. ambrosioides* L.** In: XI EPG, Anais Encontro latino americano de pós graduação, 2011.

VIRBAC. **Produtos: animais de companhia**, 2011. Acesso em: 23 agos. 2012. Disponível em: <http://www.virbac.com.br/linhas/companhia/produto/endogard/>

WANG, Z.; ABUBUCKER, S.; MARTIN, J.; WILSON, R.K.; HAWDON, J.; MITREVA, M. Characterizing *Ancylostoma caninum* transcriptome and exploring nematode parasitic adaptation. **Research article**. v.11; n.307 p.1471-2164, 2010.

WEISS D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. 6° ed. Oxford: Willey-Blackwell, 2010, 1206p.

WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detectation of hookworm ova. **Medical journal australia**, v.2, p.375-37, 1921.

WOJNAROWICZ, C.; SMITH, K. *Ancylostoma caninum* infection in a Texas-born Blue Lacy dog — Alberta, **Canadian veterinary journal** v.48, n.11, p.1185–1186, 2007.