

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE ATIVIDADE GIARDICIDA DE *Chenopodium ambrosioides* L. E A PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS NA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

NEIVA, Vanessa do Amaral¹

RIBEIRO, Maria Nilce de Sousa²

CARTÁGENES, Maria do Socorro de Sousa²

MORAES-COUTINHO, Denise Fernandes²

NASCIMENTO, Flávia Raquel Fernandes³

REIS, Aramys Silva⁴

AMARAL, Flavia Maria Mendonça do^{5*}

Resumo: *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), conhecida como erva-de-Santa-Maria ou mastruz, representa espécie exótica, de grande ocorrência no estado do Maranhão, muito utilizada na prática popular para diversos fins terapêuticos. Estudos farmacológicos têm comprovado o potencial da espécie para desenvolvimento de bioprodutos como alternativa terapêutica. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia analítica para padronização dos extratos de *C. ambrosioides* empregando ensaios químicos e biológicos de atividade anti-*Giardia*, visando o desenvolvimento de tecnologia farmacêutica na obtenção de novos fármacos no tratamento da giardíase. Foram obtidos extratos das folhas de *C. ambrosioides* por planejamento fatorial dos parâmetros: natureza do solvente (etanol 70% e água), operação de extração (maceração, percolação e extração por Soxhlet) e hidromódulo; submetidos a análise química e avaliação da atividade giardicida *in vitro*. Os resultados permitem concluir que a obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. ambrosioides* pelo procedimento extrativo de percolação e maceração representam os extratos com melhor perfil químico e/ou atividade giardicida; evidenciando que a natureza do solvente, o procedimento extrativo e o hidromódulo são variáveis que influenciam na obtenção dos extratos da espécie em estudo.

Descritores: *Chenopodium ambrosioides*; Padronização de Extratos; Atividade Giardicida; *in vitro*.

Abstract: Pre-clinical study of giardicidal activity of *Chenopodium ambrosioides* L. and the standardization of extracts in the research and development of phytotherapies. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae, (herb-of-Santa-Maria or mastruz), represents high occurrence alien species, in the State of Maranhão, widely used in popular practice for many therapeutic purposes. Pharmacological studies have demonstrated the potential of species to develop therapeutic bioproducts such as new alternatives. Thus, the goal of this work was to develop analytical methodology for standardized extracts of *Chenopodium. ambrosioides* employing chemical and biological tests of giardicidal activity, aiming at the development of pharmaceutical technology in getting new drugs for *Giardia* treatment. Were obtained extracts of leaves of *C. ambrosioides* by factorial planning factors: nature of solvent (ethanol 70 and water), operation of extraction (maceration, percolation and Soxhlet extraction) and hydromodule (plant:solvent); subjected to chemical analysis and evaluation of giardicidal activity *in vitro*. The results suggest that the obtaining of hydroalcoholic extracts from the leaves of *C. ambrosioides* extractive of percolation and maceration represents the extract with better chemical profile and/or giardicidal activity; evidencing that the nature of the solvent, extractive procedure and hydromodule are variables that influence in obtaining extracts of the species under study.

Descriptors: *Chenopodium ambrosioides*; Standardization of Extracts; Giardicidal Activity; *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Giardíase, infecção predominante nos países em desenvolvimento, com alta prevalência e expressiva taxa de morbidade, tem sido negligenciada¹, situação preocupante principalmente no estado de Maranhão, com elevada prevalência nas áreas rurais e urbanas².

A análise do arsenal terapêutico disponibilizado para o tratamento da giardíase, comprova que não há inovação tecnológica de drogas, sendo constatado que os princípios ativos dos medicamentos usualmente empregados são especialmente os derivados do 5-nitroimidazólicos, furazolidona, quinacrina e benzimidazóis; os quais não apresentam características de droga ideal. Esses elementos

¹ Acadêmica do Curso de Medicina/CCBS/UFMA.

² Professora Doutora do Departamento de Fisiologia.

³ Professora Doutora do Departamento de Patologia.

⁴ Mestrando em Ciências da Saúde.

⁵ Professora Doutora do Departamento de Farmácia.

associados ao comprovado aumento de resistência do parasito ao tratamento convencional, vem estimulando as pesquisas em busca de novas alternativas mais eficazes e seguras^{3,4,5,6}.

Nesse sentido, os recursos naturais, especialmente de origem vegetal, representam importante fonte de drogas, considerando a ampla variedade e complexidade de metabólitos de potencial valor medicinal. Porém, a transformação de uma planta em produto tecnicamente elaborado, exige estudos de validação das espécies vegetais visando a comprovação da segurança, eficácia e qualidade^{7,8}.

Considerando que os extratos vegetais representam as preparações mais frequentemente empregadas nas formulações fitoterápicas, envolvendo etapas operacionais com diversas variáveis, que podem alterar a estabilidade dos constituintes químicos e atividade terapêutica, é fundamental o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para padronização dessas preparações^{8,9}. Assim, uma opção é a identificação e determinação das substâncias químicas relacionadas aos efeitos terapêuticos, geralmente representadas pelas que ocorrem em maior concentração ou potência farmacológica, denominadas marcadores químicos^{7,10}.

A padronização dos extratos vegetais fundamentada na análise química representa parâmetro de avaliação de integridade indispensável no controle de qualidade, considerando que as matérias primas vegetais podem apresentar variabilidade na composição química, dependendo de fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento do vegetal, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes e altitude, entre outros; influenciando na concentração de constituintes químicos na espécie vegetal e, conseqüentemente, no valor terapêutico das preparações derivadas ou fitoterápicos¹¹.

Os estudos químicos para padronização dos extratos vegetais envolvem avaliação qualitativa e quantitativa de constituintes, isolamento e elucidação estrutural dos princípios ativos e/ou substâncias responsáveis pela ação biológica, empregando métodos químicos, físicos e/ou físico-químicos envolvendo técnicas

de caracterização e doseamento de grupos ou substâncias químicas^{12,13,14,15}.

O controle de qualidade por meio de ensaios biológicos compreende estudos pré-clínicos e clínicos. Os ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* possibilitam avaliar a eficácia e segurança terapêutica, mantendo relação direta com a composição química do vegetal⁷. Desse modo, o conhecimento dos aspectos da atividade biológica permite avaliação da qualidade dos fitoterápicos, representando alternativa no desenvolvimento e validação de metodologia analítica nos estudos de padronização, requisito essencial para a transformação da planta no medicamento^{7,8}.

Chenopodium ambrosioides L. (Chenopodiaceae) conhecida como erva-de-Santa-Maria, mastruço, mastruz, menstruz e quenopódio, é uma espécie aromática, de hábito herbáceo, amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais da África e Américas, sendo exótica no Maranhão, porém bastante cultivada dado aos efeitos terapêuticos atribuídos na prática popular maranhense como vermífugo, antitussígeno, abortivo, no tratamento da tuberculose, gripe, bronquite, problemas digestivos, diarreia, enteroparasitoses, afecções pulmonares, hemorróidas, infecções fúngicas, úlceras leishmanióticas e na recuperação de fraturas ósseas^{2,16,17,18}.

Estudo desenvolvido pelo Grupo de Produtos Naturais/UFMA tem comprovado que *C. ambrosioides* induziu significativa redução da disseminação da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos, sugerindo que a ação pró-inflamatória local da espécie estaria controlando a infecção¹⁹. Além disso, a espécie demonstrou alta capacidade de restringir o desenvolvimento de células tumorais *in vivo*, aumentando a sobrevida de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, sugerindo potencial imunoestimulante²⁰.

De fato, estudo subsequente demonstrou que *C. ambrosioides* induz ativação de macrófagos, representando bom indicador do potencial anti-leishmanial *in vivo*²¹. Estudo de avaliação da atividade giardicida *in vitro* com extrato etanólico de partes aéreas de *C. ambrosioides* compro-

vou expressiva atividade anti-*Giardia*². Estudo de avaliação da toxicidade e ação na resposta inflamatória demonstrou que o extrato bruto hidroalcoólico de *C. ambrosioides*, na dose de 5mg/Kg, não demonstra toxicidade, apresentando efeito anti-inflamatório, agindo possivelmente na produção de prostaglandinas²².

Diante dos resultados promissores obtidos até o momento, com constatação do potencial para desenvolvimento de bioprodutos como novas alternativas terapêuticas a partir de *C. ambrosioides*, o reconhecimento da influência da qualidade dos extratos vegetais na estabilidade química e biológica; bem como a representatividade dos ensaios químicos e biológicos nos estudos de validação; evidenciando, desse modo, a necessidade de continuidade dos estudos com a espécie vegetal e, ainda, diante da inclusão de *C. ambrosioides* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS)²³; o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a padronização dos extratos de *C. ambrosioides*, fundamentada nos ensaios químicos e biológicos, visando o desenvolvimento tecnológico na obtenção de fitoterápicos anti-*Giardia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *C. ambrosioides* foram obtidas por coleta manual, em habitat natural, no bairro do Maracanã, município de São Luís, estado do Maranhão, Brasil, no período de setembro e outubro do ano de dois mil e nove^{24,25,26}. A identificação botânica foi realizada no Herbário “Ático Seabra”/UFMA, com exsicata de número 1148/SLS017213.

Secagem das amostras e determinação da granulometria

O material vegetal foi submetido à estufa com circulação de ar, em temperatura de 38°C; seguido de moagem em moinho de facas, obtendo pó com granulometria entre 250 e 710 µm, classificado como moderadamente grosso²⁷.

Obtenção dos extratos das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L.

A partir de amostras de 100 g de folhas secas e fragmentadas foram obtidos extratos, empregando planejamento fatorial das variáveis: natureza do solvente (etanol 70% e água), operação de extração a frio e a quente (maceração, percolação e extração por Soxhlet) e hidromódulo (relação droga/solvente)^{14,27,28,29,30,31}.

As amostras foram submetidas, separadamente, à extração com emprego de etanol 70% e água; pelos métodos de maceração, percolação e extração por Soxhlet; empregando as relações de hidromódulo 1:5, 1:7 e 1:9; sendo obtidos os extratos brutos hidroalcoólicos e aquosos. As soluções extrativas foram filtradas separadamente, retirando amostra para análises químicas. Para os ensaios biológicos, o restante dos extratos, em separado, foi submetido à concentração sob pressão reduzida em rota evaporador para obtenção dos resíduos secos que foram diluídos diretamente em solução tampoadade de fosfato (PBS/ pH: 7,2), em concentração final de 5 mg/mL. Todas as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm, em câmara de fluxo laminar, mantidas em frascos estéreis a 4°C, para a realização dos ensaios. Os extratos obtidos foram submetidos à determinação do rendimento por gravimetria^{26,27,28,29,30}.

Análises químicas

Os extratos das folhas de *C. ambrosioides* foram submetidos a métodos de avaliação qualitativo e semi-quantitativo de constituintes químicos^{14,26}.

Análise biológica: avaliação da atividade anti-*Giardia in vitro*

Cepas axênicas de *Giardia lamblia*, linhagem Portland-1 (ATCC 30888), foram mantidas em meio TYI-S-33, enriquecido com bile bovina e suplementado com soro bovino inativado, em tubos de vidro, mantidos em estufa a 37°C^{31,32,33}. Para manutenção e preservação *in vitro* das cepas, as culturas foram examinadas diariamente em microscópio invertido, verificando crescimento, atividade e grau de aderência dos trofozoítos a parede do tubo. Repiques foram realizados a cada

96 horas, correspondendo a fase exponencial de crescimento^{1,2}. O ensaio da atividade giardicida *in vitro* foi realizado segundo Cedillo-Rivera; Muñoz³⁴ (1992), Cedillo-Rivera³⁵ et al. (1992) e Calzada³⁶ et al. (1999), com modificações². As avaliações quantitativas foram realizadas pelo método direto (contagem do número total de trofozoítos vivos em câmara de Neubauer) e indireto (método colorimétrico/MTT). Os ensaios incluíram controle positivo (metronidazol) e controle negativo (meio TYI-S-33, água e/ou DMSO).

Análise estatística

Para planejamento fatorial foram consideradas as seguintes variáveis: procedimento extrativo, natureza do solvente e relação de hidromódulo. As variáveis dependentes foram composição química e atividade giardicida. Para os ensaios *in vitro* foram realizadas curvas dose-resposta e cálculo da potência farmacológica. Todos os extratos foram testados em triplicata e os experimentos realizados pelo menos duas vezes. Na avaliação da atividade giardicida *in vitro*, foi empregado teste *t* de Student bicaudal, sendo $p \leq 0,05$, com resultados expressos como concentração inibitória de crescimento (CI_{50}), calculados por regressão linear, empregando o programa *GraphPad Prism* 3.0.

RESULTADOS

Considerando o planejamento fatorial empregado nesse estudo, comprovamos que os extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. ambrosioides* obtidos por maceração e percolação na relação de hidromódulo 1:5, apresentam melhor rendimento (10,6% e 11,8%, respectivamente).

Os resultados dos testes fitoquímicos, para evidenciar a presença de classes de metabólitos secundários, foram avaliados por mudança de coloração, formação de precipitado e aparecimento de espuma (tabela 1).

Estes ensaios para avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos constituintes químicos nos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas de *C. ambrosioides* obtidos por diferentes procedimentos e relações de hidromódulo indicam resultados negativos para cumarinas, heterosídeos cianogê-

nicos, resinas, taninos hidrolisáveis, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, leucoantocianidinas e catequinas. Todos os extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas de *C. ambrosioides* avaliados apresentaram reação positiva para ácidos orgânicos, alcaloides, compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados, esteroides, triterpenoides, flavononóis e flavononas.

Na avaliação da eficácia das variáveis: natureza do solvente, procedimento extrativo e relação de hidromódulo dos extratos de *C. ambrosioides*, constatamos que alcaloides, taninos condensados, esteroides e triterpenoides sofrem influência dessas variáveis em relação a avaliação semi-quantitativa.

A concentração de saponinas na percolação foi constante nas diferentes relações de hidromódulo e solvente. Porém, quando os extratos foram submetidos à maceração e Soxhlet, o extrativo de saponinas sofreu influência do hidromódulo e solvente. Flavononóis e flavonas, obtidos pelos diferentes procedimentos extrativos empregados nesse estudo, sofrem influência do solvente, comprovando que os extratos obtidos com emprego de etanol 70% apresentaram melhores resultados.

Considerando que os extratos aquosos das folhas de *C. ambrosioides* apresentaram resultados menos significativos de rendimento e constituintes químicos quando comparados aos extratos obtidos com etanol a 70%, optou-se nessa etapa do estudo por avaliar atividade giardicida somente com os extratos hidroalcoólicos.

A tabela 2 demonstra os valores de CI_{50} da ação inibitória dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. ambrosioides* obtidos por maceração, percolação e extração por Soxhlet; empregando as relações de droga/solvente 1:5, 1:7 e 1:9, sobre o crescimento dos trofozoítos de *Giardia lamblia*, com quantificação de células pelo método indireto. Os resultados permitem constataremos em todos os extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. ambrosioides* ação inibitória sobre o crescimento de *Giardia lamblia*, indicando resultado giardicida ativo *in vitro*³⁷.

Considerando que nesse estudo, o valor da atividade giardicida (CI_{50} : 220,30 $\mu\text{g/mL}$) do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* obtido segundo metodologia de Amaral² (2007)

foi empregado como valor de referência, os dados da tabela 2 evidenciam que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* obtido por percolação na relação de hidromódulo de 1:5 foi o que apresentou melhor atividade giardíctica (CI₅₀: 198,18 µg/mL).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* obtidos por maceração e por percolação apresentaram valores de atividade giardíctica inferiores ao valor de referência². Constatando, ainda, que todos os extratos obtidos na extração por Soxhlet apresentaram valores de atividade giardíctica menos significativos quando comparados aos demais procedimentos extrativos empregados nesse estudo.

DISCUSSÃO

Diversos fatores podem influenciar na obtenção de extratos vegetais, tais como procedimento extrativo, relação de hidromódulo, natureza do solvente, tempo, temperatura, granulometria do material vegetal, pH e agitação do sistema; sendo necessário, portanto, o desenvolvimento de estudos da avaliação desses fatores visando otimização do método³⁸.

Considerando que o procedimento extrativo deve ser fundamentado na eficiência, estabilidade dos constituintes químicos, tempo e custo operacional²⁹, podemos constatar que os extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. ambrosioides* obtidos por maceração e percolação na relação de hidromódulo 1:5, apresentam maior rendimento. A temperatura associada à extração por Soxhlet pode representar fator que influencia no rendimento dos extratos obtido por esse procedimento.

Os ensaios de avaliação dos constituintes químicos nos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas de *C. ambrosioides* obtidos por diferentes procedimentos extrativos, natureza de solvente e com diferentes relações de hidromódulo permitiram constatar que alguns metabólitos secundários sofrem influência das variáveis em relação à avaliação semi-quantitativa.

Estudos químicos de extrativos dessa espécie têm demonstrado a presença de monoterpenos: (-)-(2*S*,4*S*)-*p*-menta-1(7),8-dieno-2-hidroperóxido; (-)-(2*R*,4*S*)-*p*-menta-1(7),8-dieno-2-hidroperóxido³⁹;

(-)(1*R*,4*S*)-1,4-dihidroxi-*p*-menta-2-eno;(-)(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*)-1,2,3,4-tetrahidróxi-*p*-mentano⁴⁰; ascaridol, limoneno, trans-pinocarveol, ascaridol-glicol, ausatona, β-pineno, mircenol, felandreno, alcanfor, α-terpineol^{41,42}; ρ-cimeno, α-terpineno, iso-ascaridol⁴³; timol, trans-isocarveol⁴⁴; α-terpinol acetato^{45,46,47}; cis-mentadieno-1(7),8-ol-2⁴⁸; pinocarvona, pinocarveol⁴⁹; cis-ascaridol, trans-ascaridol, *p*-cimeno, pinocarvona, α-pineno, geraniol, cânfora, α-terpinil acetato, α-terpineno, α-terpinoleno, Δ-4-careno, timol e carvacrol^{39,43,50,51,52,53,54}; saponinas⁵⁵; flavonoides, terpenos, taninos^{39,56,57,58,59,60,61,62,63} e alcaloides^{48,64}.

Estes resultados são compatíveis aos obtidos neste estudo, comprovando a presença de substâncias terpênicas, alcaloides, taninos condensados, saponinas e flavonoides em todos os extratos avaliados; sendo constatado, ainda, a presença de ácidos orgânicos.

Os resultados da análise química permitem constatar que o solvente foi a variável que mais influenciou no extrativo dos constituintes analisados, obtendo-se melhores resultados com emprego de etanol a 70%. Os extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. ambrosioides* obtidos por percolação na relação de hidromódulo de 1:5 apresentaram resultados mais expressivos de constituintes químicos.

A efetiva atividade giardíctica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. ambrosioides* comprovada nesse estudo pode ser justificada possivelmente pela presença de substâncias das classes dos flavonoides e terpenos (tabelas 1-2).

Trabalho desenvolvido por Calzada⁶⁵ et al. (2006), de avaliação da atividade giardíctica *in vitro* com extrato metanólico de partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* coletadas no México, indicou expressiva atividade giardíctica na espécie.

Considerando que a extração por Soxhlet foi o único procedimento que associou temperatura, essa pode representar variável que influenciou na diferença significativa da atividade giardíctica desses extratos quando comparados aos demais.

Na busca de novas alternativas terapêuticas contra nosologias prevalentes no estado do Maranhão, o Grupo de Produtos Naturais da UFMA tem desenvolvido estudos com produtos naturais, principalmente espécies nativas e/ou exóticas de grande ocorrência na região. Nesse segmento, pesqui-

sas visando avaliar variáveis que possam influenciar na integridade química e atividade biológica têm sido desenvolvidas.

Estudo de padronização de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. (tiúba) comprova que extratos obtidos por processo de maceração com etanol puro e etanol a 70% na relação de hidromódulo 1:5, apresentaram maiores rendimentos extrativos e teores de polifenóis e flavonoides totais⁶⁶.

Estudo pré-clínico de avaliação da atividade giardicida desenvolvido com mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart. (babaçu), constatou que a obtenção dos extratos hidroalcoólicos por percolação na relação de hidromódulo de 1:4 representa o extrato com melhor perfil químico e atividade giardicida; comprovando que essas variáveis influenciam na obtenção dos extratos da espécie⁶⁷.

Estudo de padronização dos extratos de *Stachytarpheta cayenensis* (Rich.) Vahl. (gervão), visando validação da espécie como giardicida, evidenciou que o método extrativo e a relação droga/solvente são variáveis que efetivamente influenciam na atividade anti-*Giardia*⁶⁸.

Em estudo de avaliação de atividade leishmanicida, Moura-Júnior⁶⁹ (2010) constatou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* (velame), obtido por maceração na relação de 1:20 apresentou resultados mais expressivos.

Dessa forma, constata-se a importância dos estudos de padronização dos extratos vegetais visando garantia da integridade dos constituintes químicos e consequentemente da eficácia terapêutica das drogas vegetais com potencial para serem empregadas como matérias-primas na obtenção de fitoterápicos.

CONCLUSÃO

Os ensaios químicos e biológicos permitem evidenciarmos que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* obtido por percolação e maceração representam melhor preparação; comprovando que a natureza do solvente, procedimento de extração e relação droga/solvente representam variáveis que interferem na integridade química e/ou atividade giardicida da espécie em estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à FAPEMA pelas bolsas concedidas e pelo fomento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Rocha MO. *Giardia duodenalis*: axenização e caracterização de três isolados do Brasil, empregando parâmetros biológicos, bioquímicos, imunológicos e moleculares. [Tese de Doutorado]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
2. Amaral FMM. Potencial giardicida de espécies vegetais: aspectos da etnofarmacologia e bioprospecção [Tese de Doutorado]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2007.
3. Gardner TB, Hill DR. Treatment of Giardiasis. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 114-128.
4. Harris JC, Plummer S, Lloyd D. Antigiardial drugs. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 57: 614-619.
5. Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. Microbiol Rev 2001; 14: 150-164.
6. Petri-Jr WA. Therapy of intestinal protozoa. Trends Parasitol 2003; 19: 523-526.
7. Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Lima TCM. Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais. In: Simões COM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004. p.247-262.
8. Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões COM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004. p.289-326.

9. Aragão CFS. Desenvolvimento de metodologias analíticas para padronização de extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl (milona) [Tese de Doutorado]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2002.
10. Marques LC. Pesquisa e desenvolvimento de produtos fitoterápicos no Brasil: avaliação e sugestões. J Bras Fitomed 2007; 5:89-90.
11. Gobbo-Neto L, Lopes N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím Nova 2007; 30: 374-381.
12. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2ª ed. Berlin: Springer; 1996.
13. Collins C, Braga G, Bonato P. Introdução aos métodos cromatográficos. 7ª ed. Campinas: Ed. UNICAMP; 1997.
14. Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC; 1997.
15. Silverstein RG, Brassler GC, Morrill TC. Spectrometric identification of organic compounds. 6ª ed. New York: John Wiley and Sons; 2002.
16. Rêgo TJS. Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão. 2ª ed. São Luís: EDUFMA; 1995.
17. Coutinho DF, Travassos LMA, Amaral FMM. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no Estado do Maranhão- Brasil. Visão Acadêmica 2002; 3:7-12.
18. Silva Júnior ACN. Estudo etnofarmacológico de plantas empregadas no tratamento de parasitoses intestinais em São Luís/MA [Monografia de Graduação]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2006.
19. Patrício F, Costa GC, Pereira PVS, Aragão Filho WC, Sousa SM, Frazão JB, Pereira WS, Maciel MCG, Silva LA, Amaral FMM, Rebêlo JMM, Guerra RNM, Ribeiro MN, Nascimento FR. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. J Ethnopharmacol 2008; 115:313-319.
20. Nascimento FR, Cruz G, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro ESB, Guerra RNM. Ascitic and Solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. Life Sc 2006; 78(22):2650-2653.
21. Cruz GVB, Pereira PVS, Patrício F, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, Aragão Filho WC, Maciel MC, Silva LA, Amaral FMM, Barroqueiro ESB, Guerra RNM, Nascimento FR. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. J Ethnopharmacol 2007; 111:148-154.
22. Pereira WS. *Chenopodium ambrosioides* L.: avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2009.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>.
24. Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu; 1991.
25. Von Hertwig IF. Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem e comercialização. 2ª ed. São Paulo: Ícone; 1991.
26. Costa AF. Farmacognosia. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1994.

27. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Atheneu Editora São Paulo Ltda; 2010.
28. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas: Editora da Unicamp; 1995.
29. Simões COM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC; 2004.
30. Noriega P, Röpke CD, Camilo CM, Freitas PCD, Barros SBM. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. Rev Bras Cienc Farm 2005; 41:261-269.
31. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72: 431-432.
32. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77:487-488.
33. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 1999; 65:337-353.
34. Cedillo-Rivera R, Muñoz O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. J Med Microbiol 1992; 37:221-224.
35. Cedillo-Rivera R, Ramírez A, Muñoz O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. Arch. Med Res 1992; 23:59-61.
36. Calzada F, Cerda-Garcia-Rojas CM, Meckes M, Cedillo-Rivera R, Bye R, Mata R. Geranins A and B, new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. J Nat Prod 1999; 62: 705-709.
37. Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macêdo RO. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. Rev Bras Farmacogn 2006; 16(supl.): 696-720.
38. Soares LAL, González Ortega G, Bassani VL, Petrovick PR. Desenvolvimento tecnológico de solução extrativa aquosa de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. Cad Farm 1998; 14: 21-26.
39. Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J, Aoki T. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. J Nat Prod 2002; 65:509-512.
40. Ahmed AA. Highly oxygenated monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*. J Nat Prod 2000; 63:989-991.
41. De Pascual TJ, Torres BC, Perez MA. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. Rivista Italiana Essenze, Profiumi. Pianta Officinali Aromi Cosmetica Aerosol 1980; 62:123-125.
42. Sagrero-Nieves L, Bartley JP. Volatile constituents from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. J Essent Oil Res 1995; 7:221-223.
43. Cavalli JF, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS, and ¹³C-NMR spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. Phytochem Anal 2004; 15:275-279.
44. Monzote L, Montalvo AM, Almanonni S, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of the Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* Grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. Chemother 2006; 52:130-136.

45. Okuyama E, Umeyama K, Saito Y, Yamazaki M, Satake M. Ascaridole as a pharmacologically active principle of Paico, a medicinal Peruvian plant. *Chem Pharm Bull* 1993; 41:1309-1311.
46. Muhayimana A, Chalchat JC, Garry RP. Chemical composition of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. from Rwanda. *J Essent Oil Res* 1998; 10:690-692.
47. Onocha PA, Ekundayo O, Eramo T, Laakso I. Essential oil constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves from Nigeria. *J Essent Oil Res* 1999; 11:220-222.
48. Pare PW, Zajicek J, Ferracini VL, Melo IS. Antifungal terpenoids from *Chenopodium ambrosioides*. *Biochem Syst Ecol* 1993; 21: 649-653.
49. Umemoto K. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. Containing (-)-pinocarveol as a major component. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1978; 52:149-150.
50. Huang X, Kong L. Study on chemical constituents of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 2002; 33:256-257.
51. Gupta D, Charles R, Mehta VK, Garg SN, Kumar, S. Chemical examination of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from the southern hills of India. *J Essent Oil Res* 2002; 14:93-94.
52. Pino JA, Marbot R, Real IM. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Cuba. *J Essent Oil Res* 2003; 15:213-214.
53. Omidbaigi R, Sefidkon F, Nasrabadi FB. Essential oil content and compositions of *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Essent. Oil Bearing Pl* 2005; 8:154-158.
54. Kasali AA, Ekundayo O, Paul C, Koenig WA, Eshelokun AO, Ige B. 1,2:3,4-diepoxy-p-menthane and 1,4-epoxy-p-menth-2-ene: rare monoterpenoids from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. var *ambrosioides* leaves. *J Essent Oil Res* 2006;18:13-15.
55. Ma WW, Heinsteint PF, McLaughlin JL. Additional toxic, bitter saponins from the seeds of *Chenopodium quinoa*. *J Nat Prod* 1989; 52:1132-1135.
56. Arisawa M, Minabe N, Saeki R, Takakuwa T, Nakaoki T. Studies on unutilized resources. V. Components of the flavonoids in *Chenopodium* genus plants. 1. Flavonoids of *Chenopodium ambrosioides*. *Yakugaku Zasshi* 1971;91:522-524.
57. Bogacheva NG, Kogan LM, Libizov NI. Triterpenoid glycosides from *Chenopodium ambrosioides*. *Khim. Prir. Soedin* 1972; 3:395.
58. Salt TA, Adler JH. Diversity of sterol composition in the family Chenopodiaceae. *Lipids* 1985; 20:594-601.
59. Jain N, Alam MS, Kamil M, Ilyas M, Niwa M, Sakae A. Two flavonol glycosides from *Chenopodium ambrosioides*. *Phytochem* 1990;29:3988-3991.
60. Kamil M, Jain N, Ilyas M. A novel flavone glycoside from *Chenopodium ambrosioides*. *Fitoterapia* 1992; 63:230-231.
61. Gohar AA, Elmazar MMA. Isolation of hypotensive flavonoids from *Chenopodium* species growing in Egypt. *Phytother Res* 1997;11:564-567.
62. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasao F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999; 65:337-353.
63. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 2004;134:3479S-3485S.
64. Galano A, Gruñí A, López P, Ferraro G, Carballo M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *J Ethnopharmacol* 2002; 81:11-16.

65. 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. J Ethnopharmacol 2006; 108: 367-370.
66. Cunha MS, Dutra RP, Batista MCA, Abreu BVB, Santos JR, Neiva VA, Amaral FMM, Ribeiro MNS. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). Cad Pesq 2009; 16(3):31-38.
67. Neiva VA, Santos GMC, Amaral FMM, Nascimento FRF, Barroqueiro EB, Guerra RNM, Ribeiro MNS. Estudos pré-clínicos da atividade anti-*giardia* de *Orbignya phalerata* Mart. e a pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas [CD-ROM]. In: 21 Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão. Resumos. São Luís: Quality Hotel; 2010.
68. Moretti PMC. Padronização dos extratos de *Stachytarpheta cayennensis* (RICH.) Vahl. na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas [Monografia de Curso de Graduação]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2010.
69. Moura Junior LC. *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter*: estudo pré-clínico de atividade leishmanicida e a padronização de extratos [Monografia de Curso de Graduação]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2010.

***Autora para correspondência:**

Prof^a Dra Flavia M M do Amaral

Email: fmman@terra.com.br

Tabela 1- Avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos constituintes químicos nos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. obtidos por maceração, percolação e por extração por Soxhlet com diferentes relações de hidromódulo.

PROCEDIMENTO EXTRATIVO/ EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E AQUOSO/ RELAÇÃO HIDROMÓDULO *																		
Metabólitos secundários	Maceração					Percolação					Extração por Soxhlet							
	EtOH					H ₂ O					H ₂ O				EtOH			
	1:5	1:7	1:9	1:5	1:7	1:9	1:5	1:7	1:9	1:5	1:7	1:9	1:5	1:7	1:9	1:5	1:7	1:9
ácidos orgânicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
alcalóides	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
compostos fenólicos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
heterosídeos cianogênicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
resinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
saponinas	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
taninos condensados	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
esteróides	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
triterpenos	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
antocianinas, antocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chalconas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flavononóis	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
leucocantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catequinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flavononas	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++; reação fortemente positiva; ++; reação moderadamente positiva; +; reação fraca; -; negativo;

* Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa e semi-quantitativa de constituintes químicos realizados em triplicata nos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. obtidos por maceração, percolação e extração de Soxhlet com hidromódulos (proporção droga vegetal:etanol a 70% e droga vegetal:água) de 1:5, 1:7 e 1:9.

Tabela 2-Atividade in vitro contra trofozoítos de *Giardia lamblia* (cepa Portland-1, ATCC 30888), expressos em valores percentuais de CI₅₀^a dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. obtidos por maceração (M), percolação (P) e extração por Soxhlet (S) nas relações de hidromódulo de 1:5, 1:7 e 1:9.

Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i>		Atividade giardicida CI ₅₀ (µg/mL)	
M 1:5		214,16 ± 5,02 ^a	
M 1:7		221,07 ± 4,72	
M 1:9		236,69 ± 5,16	
P 1:5		198,18 ± 4,28	
P 1:7		208,92 ± 4,52	
P 1:9		212,94 ± 4,51	
S 1:5		241,48 ± 4,88 *	
S 1:7		246,32 ± 5,31 *	
S 1:9		262,94 ± 5,62 *	
Valor de referência do extrato hidroalcoólico <i>Chenopodium ambrosioides</i> ^b		220,30 ± 4,67	
Metronidazol ^c		0,22	

a Resultados expressos como média do número de trofozoítos viáveis de *Giardia lamblia*, ± desvio padrão;

b Extrato hidroalcoólico *Chenopodium ambrosioides* L. obtido segundo metodologia de Amaral (2007), empregado como amostra referência desse estudo;

c Fármaco de referência em giardíase.

* p < 0,05 quando comparado a percolação na relação de hidromódulo 1:5.